

Universidade Federal de São Carlos

Daniela Delechiave

**Imunoterapia baseada em Bacillus Calmette-Guérin (BCG) recombinante para o
tratamento de câncer de bexiga em modelo murino**

Sorocaba

2024

Delechiave, Daniela

Imunoterapia baseada em Bacillus Calmette-Guérin (BCG) recombinante para o tratamento de câncer de bexiga em modelo murino / Daniela Delechiave -- 2024. 30f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Ana Carolina Ramos Moreno

Banca Examinadora: Ana Carolina Ramos Moreno, Ana Claudia Lessinger, Nina Mari Gual Pimenta de Queiroz

Bibliografia

1. Imunoterapia. 2. Câncer de bexiga. 3. BCG. I. Delechiave, Daniela. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano - CRB/86979

Universidade Federal de São Carlos

Daniela Delechiave

Imunoterapia baseada em *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) recombinante para o tratamento de câncer de bexiga em modelo murino

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientação: Prof.^a Dr.^a. Ana Carolina Ramos Moreno
Coorientação: Prof.^a Dr.^a. Ana Claudia Lessinger

Sorocaba

2024

Folha de aprovação

Daniela Delechiave

“Imunoterapia baseada em BCG recombinante para o tratamento de câncer de bexigaem
modelo murino”

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos – *campus* Sorocaba

Sorocaba, 01 de fevereiro de 2024.

Orientadora Ana Carolina R. Moreno Dra.
Ana Carolina Ramos Moreno

Coorientadora Prof. Dra. Ana Cláudia Lessinger

Documento assinado digitalmente
gov.br ANA CLAUDIA LESSINGER
Data: 01/02/2024 18:26:56-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Membro 2 Nina Marí Gual Pimenta de Queiroz Dra.

Resumo

O câncer de bexiga o décimo mais incidente e o 13° de maior mortalidade no mundo, sendo o sétimo mais prevalente. Cerca de 75% dos casos diagnosticados de tumor de bexiga são Não-Músculo-Invasivo, e recomenda-se como tratamento a ressecção transuretral seguida por instilação de Bacillus Calmette-Guerin (BCG). Com o objetivo de aumentar o potencial adjuvante da BCG, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma cepa de BCG recombinante (rBCG) que expressa a toxina pertussis S1 detoxificada (rBCG-S1PT). Resultados anteriores do grupo mostraram que camundongos portadores de tumor de bexiga e tratados com rBCG-S1PT apresentaram maior sobrevida do que os camundongos tratados com a BCG nativa. Contudo, pouco se sabe sobre a resposta imunológica associada a essa proteção antitumoral. Neste projeto, nos propusemos a caracterizar o efeito antitumoral promovido pela rBCG-S1PT em modelo murino de tumor de bexiga heterotópico. Para isso, células de carcinoma urotelial murino (MB49) foram implantadas pela via subcutânea no flanco direito de camundongos C57BL-6 fêmeas (dia “zero” - D0), que posteriormente foram tratados com três ciclos de imunoterapia (BCG ou rBCG-S1PT), por via peritumoral/ intratumoral, nos dias 1 (D1), D8 e D15. No decorrer do experimento, o volume tumoral foi aferido para avaliação da progressão tumoral. Sete dias após o último tratamento (D22), os camundongos foram eutanasiados para coleta dos tumores e baço para a avaliação da resposta imunológica destes sítios anatômicos. Assim como observado anteriormente, a cepa rBCG-S1PT apresentou maior potencial de controle tumoral em relação à BCG parental. Por citometria de fluxo, analisamos as populações imunológicas no baço e nos tumores, e observamos uma melhor resposta inflamatória induzida pela rBCG-S1PT em relação ao grupo BCG e ao grupo não tratado, com destaque para: 1) menor frequência de células T reguladoras no baço e no tumor; 2) maior ativação de linfócitos T CD4 e T CD8 no baço e no tumor. 3) maior frequência de células NK maduras e ativadas no baço. Nossos resultados sugerem que a imunoterapia com a rBCG-S1PT modula positivamente a resposta de linfócitos T e células NK, enquanto controla a imunossupressão mediada por células T reguladoras, o que resulta na potencialização do efeito imunoterápico da rBCG-S1PR no controle tumoral.

Câncer de bexiga, Imunoterapia, BCG, rBCG-S1PT, modelo de tumor heterotópico

Abstract

Bladder cancer is the 10th most common and 13th most deadly cancer in the world. Approximately 75% of diagnosed bladder tumors are non-muscle invasive, and transurethral resection followed by instillation of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) is recommended as treatment. To increase the adjuvant potential of BCG, our research group developed a recombinant BCG strain (rBCG) expressing detoxified pertussis toxin S1 (rBCG-S1PT). Previous results from the group showed that mice with bladder tumors treated with rBCG-S1PT had longer survival than mice treated with native BCG. However, little is known about the immune response associated with this anti-tumor protection. In this project, we set out to characterize the anti-tumor effect promoted by rBCG-S1PT in a murine model of heterotopic bladder tumors. To this end, murine urothelial carcinoma cells (MB49) were implanted subcutaneously into the direct flank of female C57BL-6 mice (day "zero" - D0), which were then treated with three cycles of immunotherapy (BCG or rBCG-S1PT) via the peritumoral/intratumoral route on day 1 (D1), D8 and D15. Tumor volume was measured throughout the experiment to assess tumor progression. Seven days after the last treatment (D22), mice were euthanized to collect tumors and spleens to assess the immune response of these anatomical sites. As previously observed, the rBCG-S1PT strain showed greater tumor control potential compared to the parental BCG. Using flow cytometry, we analyzed the immune populations in the spleen and tumors and observed a better inflammatory response induced by rBCG-S1PT compared to the BCG group and the untreated group, with emphasis on 1) a lower frequency of regulatory T cells in the spleen and tumor; 2) a greater activation of CD4 and CD8 T lymphocytes in the spleen and tumor. 3) higher frequency of mature and activated NK cells in the spleen. Our results suggest that immunotherapy with rBCG-S1PT positively modulates the response of T lymphocytes and NK cells while controlling the immunosuppression mediated by regulatory T cells, resulting in the potentiation of the immunotherapeutic effect of rBCG-S1PT in tumor control.

Bladder cancer, Immunotherapy, BCG, rBCG-S1PT, heterotopic tumor model

Lista de ilustrações

Figura 1. Incidência de câncer mundial.....	09
Figura 2. Estadiamentos do câncer de bexiga.....	10
Figura 3. Desenho experimental.....	13
Figura 4. Tabela com os painéis de imunofenotipagem da citometria de fluxo.....	16
Figura 5. Avaliação do volume tumoral dos diferentes grupos experimentais.....	17
Figura 6. Avaliação da frequência de células T reguladoras no baço e tumor dos diferentes grupos experimentais.....	18
Figura 7. Avaliação da frequência e da ativação de células T CD4 no baço e tumor dos diferentes grupos experimentais.....	19
Figura 8. Avaliação da frequência e da ativação de células T CD8 no baço e tumor dos diferentes grupos experimentais.....	20
Figura 9. Avaliação da frequência e da ativação de células NK no baço e tumor dos diferentes grupos experimentais.....	22

Sumário

1. Introdução.....	09
2. Objetivos.....	12
a. Objetivos específicos.....	12
3. Materiais e Métodos:	
a. Modelo Heterotópico de câncer de bexiga em camundongos.....	13
b. Processamento de baço para análise de imunofenotipagem.....	14
c. Processamento do tumor para análise de imunofenotipagem.....	14
d. Citometria de Fluxo.....	15
e. Análise dos resultados adquiridos.....	16
4. Resultados:	
a. Efeito antitumoral das imunoterapias BCG e rBCG.....	17
b. Avaliação do recrutamento de células T reguladoras no baço e tumor.....	18
c. Avaliação da frequência e ativação de linfócitos T CD4 e T CD8 induzidas pelas imunoterapias baseadas em BCG e rBCG.....	19
d. Avaliação da modulação de células Natural Killers após tratamento dos camundongos com imunoterapias baseadas em BCG e rBCG.....	21
5. Discussão.....	23
6. Conclusão.....	25
7. Referências.....	26

1) Introdução

Em 2020, foram diagnosticados 193 milhões de novos casos de câncer, sendo a causa de mais de 10 milhões de mortes pelo mundo. A projeção realizada pela GLOBOCAN é que até o ano de 2040, o número de fatalidades aumente para 32 milhões ¹. O câncer de bexiga está entre os dez mais incidentes, com mais 500 mil novos casos e 1,5 milhão de casos recorrentes em 2020 ^{2,3}. Segundo o INCA, Instituto Nacional de Câncer, eram previstos para o triênio 2023-2025, cerca de 11,3 mil novos casos da doença no Brasil em que para os homens, a incidência é quase quatro vezes maior quando comparado com o sexo feminino⁴.

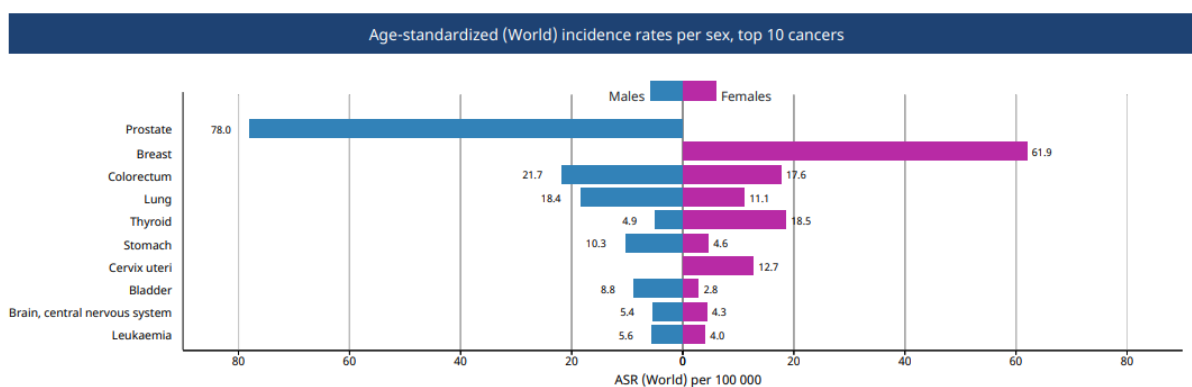


Figura 1. Incidência de câncer mundial. Nesta figura, destacam-se os dez tipos de câncer mais incidentes no mundo, separados por sexo. Fonte: GloboCan2020

Diversos fatores de risco podem aumentar a probabilidade de desenvolver câncer de bexiga. Dentre eles, o tabagismo se destaca como o principal fator de risco, além da exposição constante à produtos químicos, como algumas aminas aromáticas e hidrocarbonetos policíclicos presentes em corantes, tinturas e derivados de petróleo, contaminação por arsênio em água potável ou predisposição genética e ingestão de pouco líquido ⁵. Cabe destacar que a influência do hormônio testosterona também é um fator de risco, o que justifica a maior incidência deste tipo de câncer no sexo masculino.

O câncer de bexiga apresenta diferentes estadiamentos de acordo com o nível de invasão da camada muscular, o que reflete no prognóstico e tratamento de cada paciente. Dentre os casos diagnosticados, aproximadamente 75% são classificados como Não-Músculo-Invasivo - NMIBC (Ta, T1, Tis) e os demais 25%, que por conseguinte apresentam pior prognóstico, são classificados como Músculo-Invasivos - MIBC (T2, T3, T4), como demonstrado na **Figura 2** ⁶.

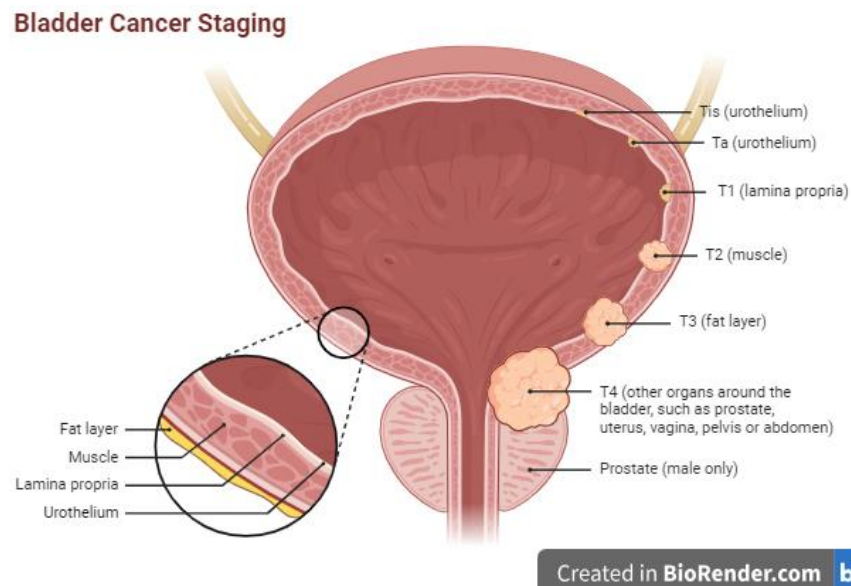


Figura 2. Estadiamentos do câncer de bexiga. Tis: tumor *in situ* (forma plana), Ta: carcinoma papilífero não invasivo, T1: tumor invasor do tecido conjuntivo sub-epitelial, T2: tumor músculo invasivo, T3: tumor invasor do tecido peri-vesical, T4: tumores invasores de demais estruturas como próstata, vagina, útero, parede pélvica ou abdominal. Confidencial.

De forma geral, a recomendação de tratamento para os casos de NMIBC incluem ressecção transuretral parcial, seguida por instilação intravesical de BCG⁷. O Bacillus Calmette-Guérin (BCG) consiste em uma vacina atenuada derivada do *Mycobacterium bovis*, agente causador de tuberculose em bovinos, e foi desenvolvida pelos pesquisadores Leon Calmette e Alphonse Guérin. Desde 1921, a vacina BCG é utilizada em humanos para a proteção contra formas graves de tuberculose⁷.

Sabe-se que o BCG apresenta alto potencial imunogênico devido à composição molecular do seu envoltório bacteriano. Essas moléculas são capazes de se ligar a receptores presentes em diversas células do sistema imunológico, promovendo o estímulo de múltiplas vias de sinalização, que culminam na produção de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-8⁸. Devido ao seu potencial inflamatório, o BCG é utilizado no tratamento de NMIBC há mais de 40 anos. Contudo, apesar da longa experiência clínica com o BCG, o mecanismo do seu efeito terapêutico ainda não está elucidado. Dados da literatura sugerem que as células uroteliais, incluindo as próprias células cancerosas da bexiga, e as células do sistema imunológico desempenham papéis cruciais no efeito terapêutico antitumoral do BCG. O possível envolvimento das células

cancerígenas da bexiga inclui a fixação e a internalização do BCG, a secreção de citocinas e quimiocinas e a apresentação do BCG e/ou dos antígenos tumorais às células do sistema imunológico. Os subconjuntos de células imunológicas que têm um papel potencial na terapêutica com BCG incluem os linfócitos CD4+ e CD8+, células *natural killer*, granulócitos, macrófagos e células dendríticas. A morte celular das células tumorais pode ser mediada pela citotoxicidade direta do BCG à elas, uma vez que o BCG se liga ao urotélio através da fibronectina e da integrina $\alpha 5\beta 1$ e é internalizado pelas células cancerosas da bexiga por macropinocitose ⁹. Após a internalização, as células cancerosas da bexiga aumentam a expressão de MHC classe II e ICAM-1 e secretam citocinas que, juntamente com as células dendríticas, recrutam células imunológicas para o local, resultando em citotoxicidade para as células cancerosas da bexiga, através de vários mecanismos imunológicos ⁹. Esses fenômenos resultam em uma robusta do sistema imunológico. De fato, poucas horas após a instilação de BCG, pode ser detectado um aumento acentuado do número de leucócitos na urina. Estes leucócitos são constituídos principalmente por granulócitos e, em menor grau, por macrófagos e linfócitos. Da mesma forma, pode encontrar-se um influxo de células imunológicas na parede da bexiga após a imunoterapia com BCG. Outra evidência de ativação imunológica é a libertação de uma grande variedade de citocinas e quimiocinas na urina após a imunoterapia com BCG. Histopatologicamente, as biopsias da bexiga pós-tratamento em doentes tratados com BCG revelam erosão do epitélio superficial e inflamação granulomatosa submucosa, com edema e granulomas rodeados por um infiltrado inflamatório ¹⁰.

Ainda que o BCG seja o tratamento padrão mais indicado aos pacientes com NMIBC, o BCG atualmente tem um grande problema de produção por dificuldades regulatórias e falta de incentivo e, conseqüentemente, está em falta no mercado mundial. Por conta disso, em muitos casos são definidas terapias alternativas, com menores taxas de efetividade, como instilação de gentamicina e docetaxel ¹¹. A imunoterapia com BCG também pode estar relacionada a efeitos adversos como febre alta, irritação do tecido da bexiga ou até mesmo complicações mais graves, ainda que sejam mais raras ¹². Esses dados, somados à alta frequência (aproximadamente 30%) de pacientes não respondem ao tratamento com BCG ou se tornam resistentes ao tratamento, reforçam a necessidade de buscar alternativas eficientes para tratamento desta doença ¹¹.

Do ponto de vista biotecnológico, o BCG é considerado um ótimo candidato para carrear antígenos heterólogos e, desta forma, é uma excelente plataforma para o desenvolvimento de novas vacinas. Neste panorama, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma cepa de BCG recombinante (rBCG) que expressa a toxina pertussis S1 desintoxicada (rBCG-S1PT)^{13,14,15,16,17}. A cepa rBCG-S1PT foi capaz de induzir proteção contra infecções por *Bordetella pertussis* em modelos experimentais murinos, com resposta inflamatória Th1 dominante^{13,14,17}. Em modelo clássico de doença pulmonar alérgica induzido por ovalbumina, rBCG-S1PT preveniu respostas imunológicas alérgicas mediadas por células Th2, fato positivamente correlacionado com o aumento de células T produtoras de IFN- γ e a expressão de T-bet no pulmão¹⁸. Devido às propriedades adjuvantes da S1PT, nosso grupo explorou o potencial antitumoral de rBCG-S1PT em modelo ortotópico de carcinoma de bexiga murino. Observou-se que a imunoterapia com BCG e rBCG-S1PT resultou na redução do peso da bexiga, e rBCG-S1PT aumentou a sobrevivência dos camundongos em comparação com o grupo BCG. Um aumento na quantidade de mRNA TNF- α foi observado na bexiga de animais tratados com BCG, enquanto tanto mRNA TNF- α quanto mRNA IL-10 foram observados na bexiga de camundongos tratados com rBCG-S1PT^{15,16}. Contudo, pouco se sabe sobre a resposta imunológica associada a essa proteção antitumoral.

2) Objetivos

O presente estudo teve como objetivo caracterizar os efeitos antitumorais da rBCG-S1PT no tratamento do câncer de bexiga em modelo heterotópico de carcinoma de bexiga murino.

a. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito antitumoral de rBCG-S1PT versus BCG parental pela aferição do volume tumoral em diferentes pontos experimentais;
- Identificar e caracterizar a resposta imunológica induzida pelas diferentes formulações vacinais no baço e nos tumores dos camundongos após três ciclos de imunoterapias.

3) Materiais e Métodos:

a) Modelo Heterotópico de câncer de bexiga em camundongos;

Com o objetivo de caracterizar a resposta imunológica da imunoterapia com rBCG, foram inoculados 1×10^5 de células tumorais uroteliais MB49 em 100 μL de meio RPMI por via subcutânea no flanco direito de camundongos fêmeas C57BL-6 no dia 0 do experimento (D0). No dia seguinte, em D1, foram estabelecidos aleatoriamente, 3 grupos de 10 animais categorizados em: Não tratados (NT), tratados com BCG-Moreau (BCG) e tratados com rBCG-S1PT (rBCG). O experimento teve 22 dias de duração e nos dias D1, D8 e D15 foram aplicadas as imunoterapias nos seus respectivos grupos, por via peritumoral/intratumoral. No decorrer do experimento, os diâmetros tumorais foram aferidos por um paquímetro, o que permitiu o cálculo dos volumes tumorais, como já estabelecido na literatura ¹⁹. No dia 22, todos os animais foram eutanasiados de acordo com o Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEUA N 7301040422) para a retirada do baço e tumor. A massa tumoral de cada animal foi retirada, fotografada e pesada. Tanto o tumor como o baço foram processados com os anticorpos selecionados previamente para a análise da resposta imunológica de células T reguladoras, linfócitos T ativado e células NK ativadas.

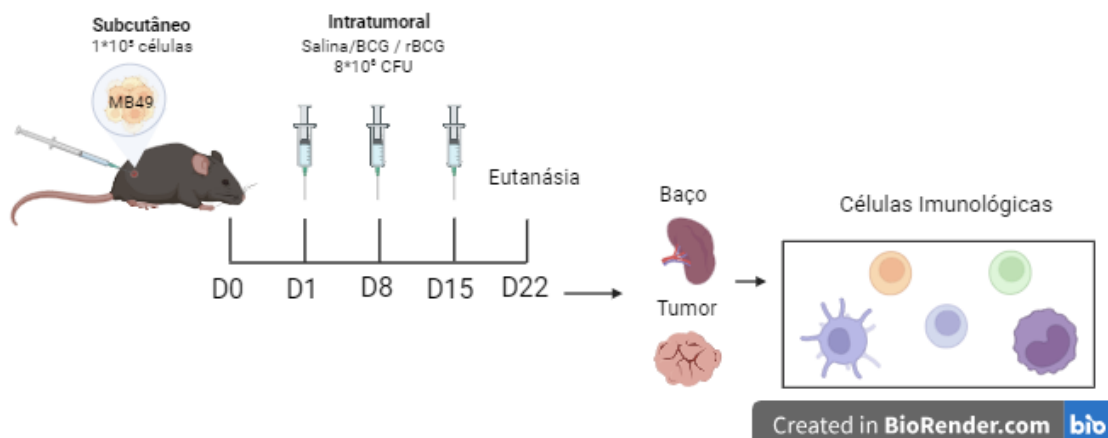


Figura 3. Desenho experimental. Modelo subcutâneo de câncer de bexiga em camundongos fêmeas C57BL-6, e protocolo imunoterapêutico com BCG ou rBCG-S1PT.

b) Processamento de baço para análise de imunofenotipagem;

Após a eutanásia dos animais, os baços foram coletados, mantidos no meio RPMI e em gelo para evitar perda celular. O baço foi macerado com a haste de uma seringa estéril e esse macerado passou por um filtro de 40 µm antes de ser centrifugado a 1300 rpm por 5 minutos a 4°C. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de lise (BD FACS™ Lysing solution) que após seu tempo de ação de 5 minutos, passou por lavagem com meio de cultura puro DMEM e nova centrifugação. Os sedimentos celulares que restaram após esse procedimento foram ressuspensos em 1 mL de meio completo [RPMI, soro fetal bovino (SFB) 10%, aminoácidos essenciais e não essenciais, piruvato de sódio, glutamina, vitaminas]. Desta suspensão, 30 µL foram adicionados em poços de uma placa de 96 poços de fundo U, e o volume foi completado para 100 µL com meio completo. Em seguida, 50µL de meio completo com estímulo anti-CD28 e anti-CD3 foram adicionados por poço, seguido de incubação por 6 horas a 37°C e 5% de CO₂. Passado esse tempo, 50µL de meio completo contendo monensina (BD GolgiStop™ Protein Transport Inhibitor) foram adicionados por poço (concentração de acordo com o especificado pelo fabricante) para viabilizar a marcação de citocinas intracelulares. As placas foram, então, incubadas por até 12 horas a 37°C e 5% de CO₂.

c) Processamento do tumor para análise de imunofenotipagem;

Os animais foram eutanasiados e a massa tumoral localizada no flanco direito de cada animal foi exposta para extração. Depois da pesagem, o tumor foi condicionado em uma placa de 6 poços com 1 mL de meio DMEM puro, em que foi dilacerado com uma tesoura cirúrgica. Em seguida foram adicionados 0,22 U/mL de colagenase em cada poço que deve ficar incubando em estufa rotativa por 1 hora, a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, foram aplicados 10µL de EDTA 0,5M, seguida de incubação por 5 minutos. O macerado tumoral foi homogeneizado e diluído em 4 mL de meio DMEM puro para a realização da filtração com um filtro de poro de 70µm. A solução filtrada foi centrifugada a 1300 rpm por 10 minutos. Depois de descartar o sobrenadante e adicionar 5 mL de meio DMEM puro, soltando o sedimento delicadamente, foi feita uma nova filtração com filtros de poro de 40 µm. Novamente, a solução celular filtrada foi centrifugada por 5 minutos a 1300 rpm e no fim, o sobrenadante pôde ser descartado. O sedimento

restante foi ressuspensão em meio completo (600uL a 1500uL, dependendo do tamanho do tumor) para em seguida ser plaqueados 100 µL por poço em uma placa de 96 poços de fundo U.

Para as placas que serão utilizadas na marcação de linfócitos, foram adicionados os estímulos CD28 (50µL por poço) e CD3 (1µL por poço), seguido de incubação por 6 horas na estufa à 37°C e 5% de CO₂. Para as placas com marcadores de células mieloides foram adicionadas 50 µL de meio completo sem estímulos. Passado esse tempo, 50uL de meio completo contendo monensina (BD GolgiStop™ Protein Transport Inhibitor) foram adicionados por poço (concentração de acordo com o especificado pelo fabricante) para viabilizar a marcação de citocinas intracelulares. As placas foram, então, incubadas por até 12 horas a 37°C e 5% de CO₂.

d) Citometria de Fluxo;

No dia seguinte ao plaqueamento, cada placa foi lavada duas vezes com PBS com 2% SFB e centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm para a adição do mix de anticorpos preparado de acordo com cada painel (elucidados na **Figura 4**). Após 30 minutos de incubação à 4°C, as placas foram novamente lavadas com PBS com 2% de SFB e centrifugadas antes da adição de BD Cytotfix/Cytoperm™ incubadas por 15 minutos a 4°C. Por fim, as placas passaram a ser lavadas com BD Perm/Wash Buffer e centrifugadas para a adição de PBS com 0,5% de PFA. Para a marcação de FoxP3, tanto a permeabilização celular como as lavagens com tampão específico foram feitas com o kit *Transcription Factor Buffet Set* (BD Pharmigen), de acordo com as indicações do fabricante. Após as marcações extracelulares e intracelulares, as amostras foram adquiridas pelo citômetro BD FACS Canto™ II com o software BD FACS Diva 6.1.

Natural Killers		
Anticorpo	Fluorescência	Clone
CD3	PE	17A2
NK1.1	FITC	PI-136
CD27	APC	LG3A10
KLGR1	PerCP-Cy5.5	2F1/KLGR1
CD11b	BV421	M170
IFN- γ	APC-Cy7	XMG1.2
TNF- α	PE-Cy7	MP6-XT22

Linfócito Ativado		
Anticorpo	Fluorescência	Clone
CD3	APC	17A2
CD4	PerCP	GK1.5
CD8a	BV421	53.6.7
CD25	FITC	PC61
CD69	PE	H12F3
IFN- γ	APC-Cy7	XMG1.2
TNF- α	PE-Cy7	MP6-XT22

Célula T Reguladoras		
Anticorpo	Fluorescência	Clone
CD3	APC	17A2
CD4	PerCP	GK1.5
CD8a	BV421	53.6.7
CD25	FITC	PC61
FOXP3	PE	MF14

Figura 4. Tabela com os painéis de imunofenotipagem da citometria de fluxo. Os anticorpos utilizados são da marca Biotend.

e) Análise dos resultados adquiridos.

As análises foram realizadas pelo software FlowJo™, plotadas no programa GraphPad Prism para elaboração dos gráficos. A estatística utilizada foi Two-way ANOVA entre cada indivíduo dos três grupos experimentais comparados entre si, destacando as diferenças estatísticas a partir de $p < 0,05$.

4) Resultados:

a) Efeito antitumoral das imunoterapias BCG e rBCG;

Após os três ciclos de imunoterapia foi possível observar, a partir do 18º dia de experimento (D18), que os animais tratados com a BCG apresentaram uma tendência à menor progressão no volume tumoral quando comparado ao grupo não tratado (NT). Os animais tratados com rBCG, por sua vez, apresentaram um volume tumoral menor do que os animais tratados com BCG ou os animais NT, sendo estatisticamente diferente apenas deste último grupo (**Figura 5A**). No dia da eutanásia, a pesagem dos tumores indicou que o grupo rBCG foi estatisticamente diferente apenas do grupo NT, apesar de manter a tendência de ser menor do que o grupo BCG, indicando o melhor potencial antitumoral da rBCG-S1PT (**Figuras 5B e 5C**). Desta forma, o grupo rBCG controlou de forma mais eficiente a progressão tumoral que os demais e, como esperado, no dia 22 foi possível observar uma menor massa tumoral, como indica a **Figura 5**.

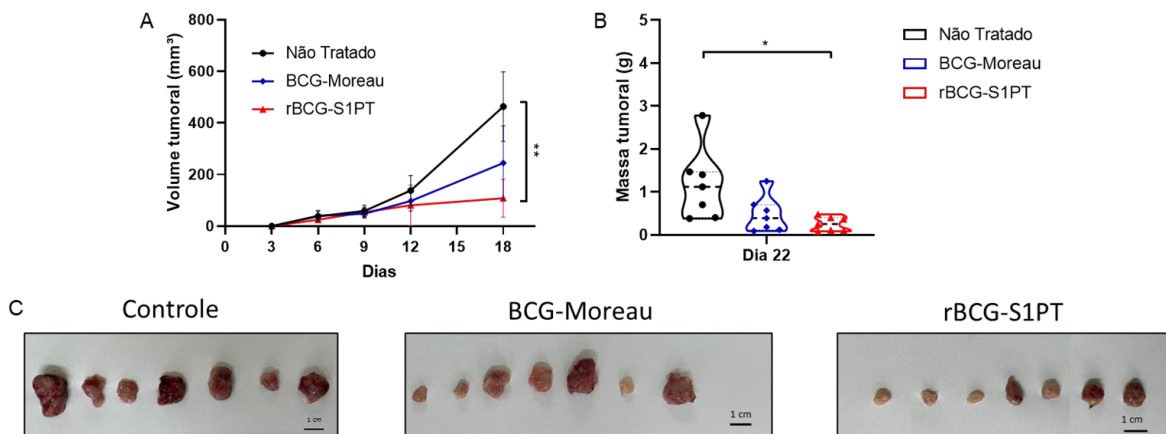


Figura 5. Avaliação do volume tumoral dos diferentes grupos experimentais. A. Evolução do volume tumoral dos três grupos no decorrer do experimento, com significativa diferença no dia 18 entre o grupo Não-Tratado e rBCG-S1PT. **B.** Massa tumoral no dia 22, com diferença entre grupos Não-Tratado e rBCG-S1PT. **C.** Fotos dos tumores de cada grupo experimental no dia da eutanásia (D22), evidenciando os menores diâmetros no grupo tratado com a rBCG-S1PT. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) no teste estatístico Two-way ANOVA.

b) Avaliação do recrutamento de células T reguladoras no baço e tumor;

Nos dois microambientes, baço e tumor, foi observado aumento de células T CD4 nos grupos tratados com BCG e rBCG (**Figuras 6A e 6E**), com significativa diminuição de células T regulatórias CD4+, marcadas por FoxP3, principalmente no grupo tratado com rBCG (**Figuras 6B e 6F**), sendo este significativamente menor do que o grupo BCG. Desta maneira, propõe-se que a vacina recombinante diminui a imunossupressão tanto do microambiente tumoral como no órgão linfoide. Também foi observado a diminuição de células T CD8 no baço para os grupos tratados (**Figuras 6C e 6G**), sendo que no baço há maior infiltrado de células T regulatórias CD8+ nos animais tratados com BCG-Moreau (**Figura 6D**), e menor infiltrado tumoral de células T regulatórias CD8+ nos grupos tratados com BCG e rBCG (**Figura 6H**). A menor quantidade de células T reguladoras encontrada no grupo rBCG inferem que há menor imunossupressão nos animais tratados com essa imunoterapia, o que sugere que a rBCG apresenta maior potencial de induzir um microambiente favorável para a ativação celular.

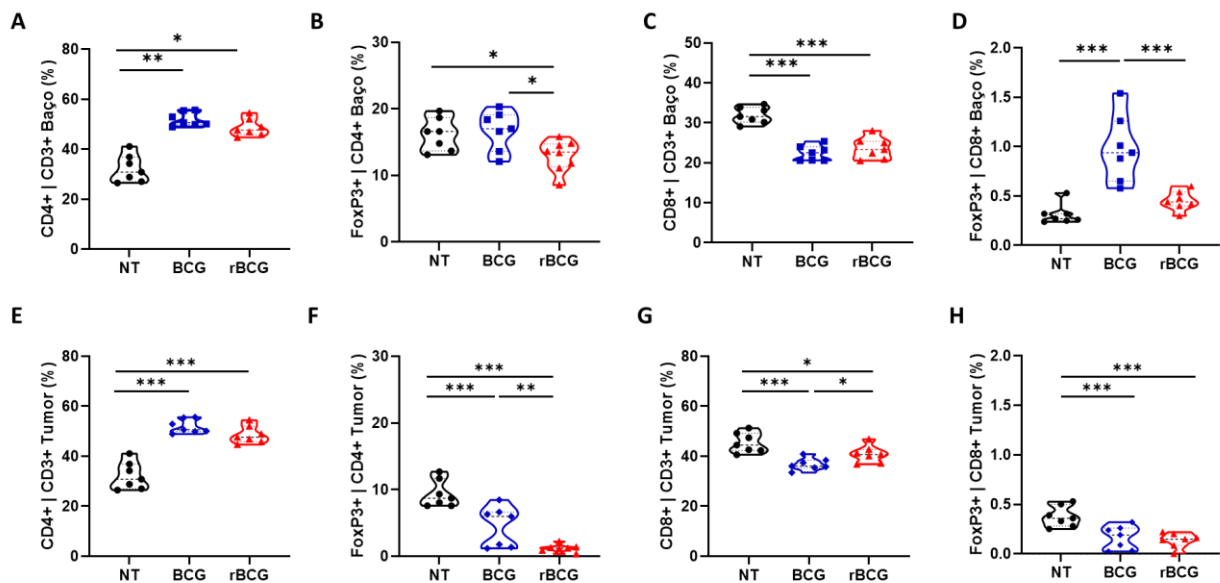


Figura 6. Avaliação da frequência de células T reguladoras no baço e tumor dos diferentes grupos experimentais. A e E. Frequência de células T CD4+. **B e F.** Frequência de células T reguladoras CD4+. **C e G.** Frequência de células T CD8+. **D e H.** Frequência de células T reguladoras CD8+. $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) no teste estatístico Two-way ANOVA.

c) Avaliação da frequência e ativação de linfócitos T CD4 e T CD8 induzidas pelas imunoterapias baseadas em BCG e rBCG;

Nos dois microambientes, baço e tumor, foi observado aumento de células T CD3 apenas no tumor dos grupos tratados com BCG e rBCG (**Figuras 7A e 7F**). Os linfócitos T CD4 foram mais abundantes nos animais tratados quando comparado com os NT rBCG (**Figuras 7B e 7G**). Através da análise da expressão de CD69 (marcador de ativação), é possível observar uma maior expressão de CD69 apenas nos linfócitos T CD4 intratumorais dos grupos tratados (**Figuras 7C e 7H**). Contudo, pela análise da expressão de IFN- γ (**Figuras 7D e 7I**) e TNF- α (**Figuras 7E e 7J**), observou-se uma maior ativação dos linfócitos T CD4 tanto no baço como no tumor dos animais tratados com rBCG, sendo este significativamente maior do que o grupo BCG e o grupo NT. Esses achados corroboram nossa hipótese de que a rBCG é capaz de promover uma maior ativação de linfócitos tanto no baço como no tumor.

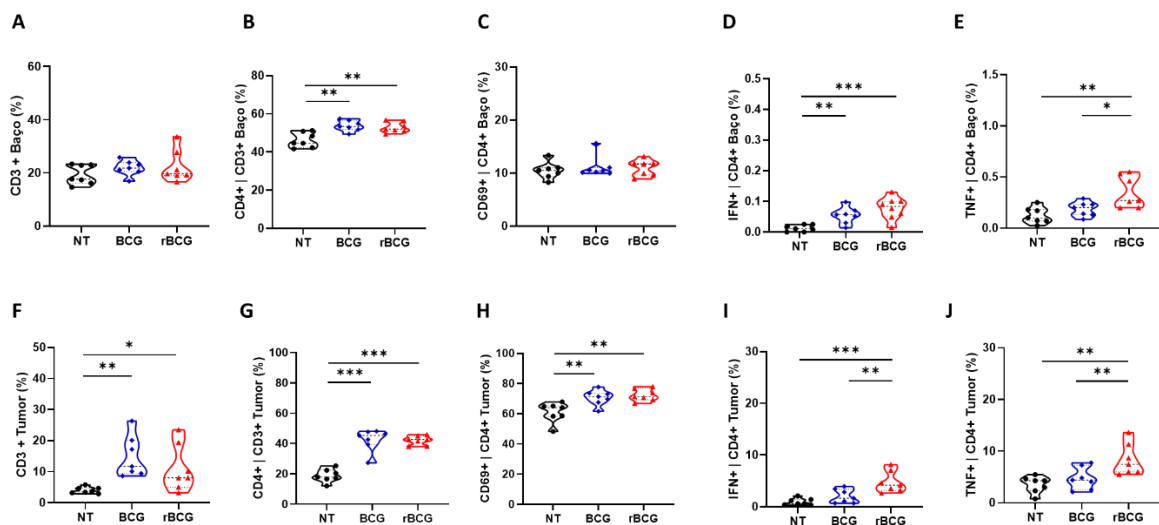


Figura 7. Avaliação da frequência e da ativação de células T CD4 no baço e tumor dos diferentes grupos experimentais. A e F. Frequência de células T CD3+. **B e G.** Frequência de células T CD4+. **C e H.** Frequência de células T CD4+ CD69+. **D e I.** Frequência de células T CD4+ produtoras de IFN- γ . **E e J.** Frequência de células T CD4+ produtoras de TNF- α . p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***) no teste estatístico Two-way ANOVA.

A presença de linfócitos T CD8 no baço e no tumor também foi avaliada, sendo que no órgão linfoide há maior frequência desse grupo celular no grupo NT (**Figura 8A**), porém com menor ativação celular, verificada pela expressão da molécula CD69 (**Figura 8B**) e produção de citocinas (**Figura 8C e 8D**). Nesse contexto, se destaca o potencial de ativação celular induzido pela rBCG, sendo este significativamente maior do que o grupo BCG e o grupo NT (**Figura 8C e 8D**). No infiltrado tumoral não foi observado diferença no recrutamento de populações de linfócitos T CD8 (**Figura 8E**), porém, ocorreu a maior expressão do marcador CD69 no grupo NT em relação aos grupos vacinados (**Figura 8F**). Contudo, pela análise da expressão de IFN- γ (**Figura 8G**) e TNF- α (**Figura 8H**), observou-se uma maior ativação dos linfócitos T CD8 no tumor dos animais tratados com rBCG, sendo a produção de IFN- γ significativamente maior do que o grupo BCG e o grupo NT. Tais resultados sugerem maior ativação dos linfócitos T CD8 quando os animais são tratados com a rBCG.

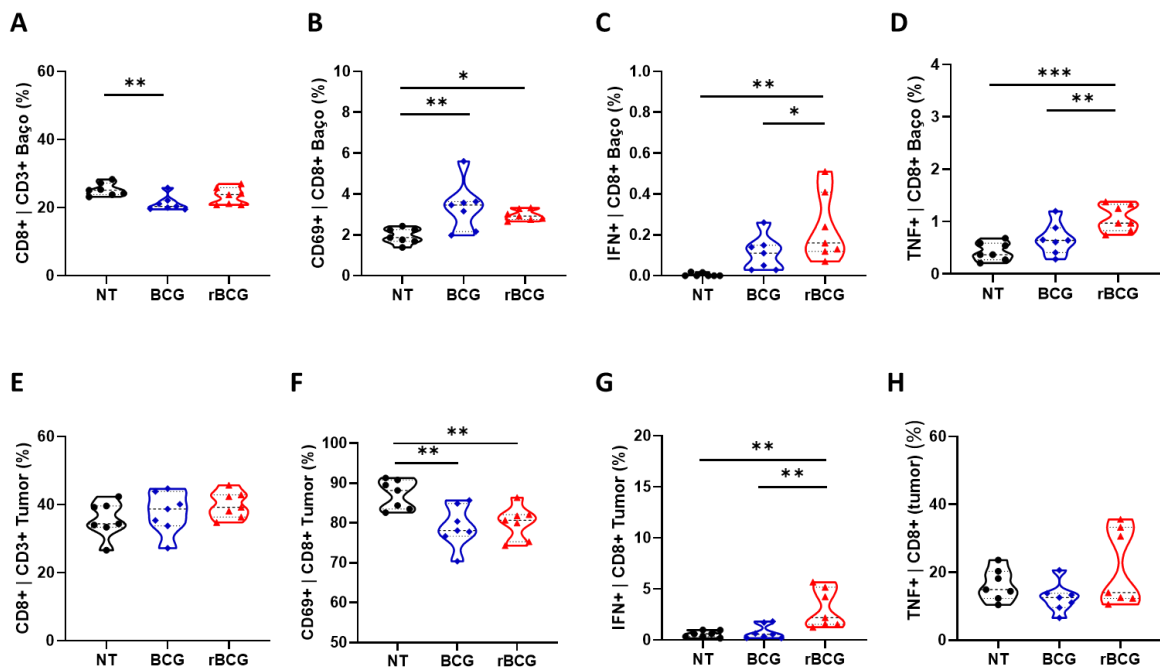


Figura 8. Avaliação da frequência e da ativação de células T CD8 no baço e tumor dos diferentes grupos experimentais. A e E. Frequência de células T CD8+. **B e F.** Frequência de células T CD8+ CD69+. **C e G.** Frequência de células T CD8+ produtoras de IFN- γ . **D e H.** Frequência de células T CD8+ produtoras de TNF- α . p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***) no teste estatístico Two-way ANOVA.

d) Avaliação da modulação de células Natural Killers após tratamento dos camundongos com imunoterapias baseadas em BCG e rBCG.

Através do marcador NK1.1, analisou-se a presença das células NK no tumor e no baço dos camundongos. Observou-se que o tratamento com as imunoterapias aumenta a frequência de células NK totais no baço, com destaque para o grupo BCG, e no tumor, com destaque para o grupo rBCG (**Figura 9A**). A ativação dessas células foi avaliada pela produção de IFN- γ (**Figura 9B**) e TNF- α (**Figura 9C**), onde observa-se um aumento da expressão dessas citocinas apenas no baço dos animais tratados com BCG ou rBCG. O grau de maturação das células NK pode ser avaliada de acordo com a presença dos marcadores CD27, CD11b e KLRG1. Nesse contexto, o grupo NT apresentou maior quantidade de células NK imaturas, evidentes pela presença de CD27 e ausência de CD11b (**Figura 9D**). As células NK passam a maturar e se tornam positivas para ambos os marcadores (CD27+ CD11b+), sendo denominada de NK inflamatória, momento de maior produção de citocinas por essas células. Observou-se maior frequência de células NK inflamatórias no baço dos animais tratados com rBCG, e igual proporção no tumor de todos os grupos experimentais (**Figura 9E**). Contudo, a produção de IFN- γ (**Figura 9F**) e TNF- α (**Figura 9G**) no infiltrado tumoral dos grupos tratados com rBCG foi maior, sendo a produção dessas citocinas significativamente maior do que o grupo BCG e o grupo NT. Com a perda da expressão de CD27, as células atingem um grau de maturação maior. Na análise dessas células, pode-se observar maior frequências de células NK maduras (CD27- CD11b+) no baço dos animais tratados com BCG ou rBCG (**Figura 9H**). Por fim, avaliou-se a expressão do marcador KLRG1, que evidencia o maior grau de maturação das células NK e início da exaustão. Observou-se que apenas os animais tratados com rBCG apresentaram maior frequência dessas células no baço (**Figura 9I**). Esses resultados sugerem uma melhor modulação da resposta mediada por células NK pela rBCG.

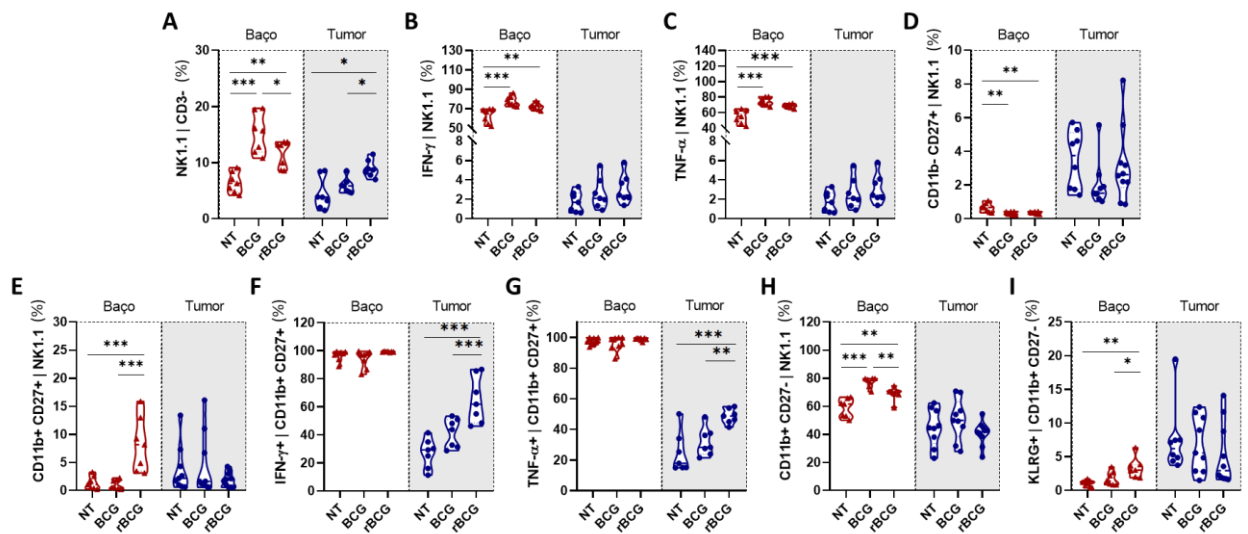


Figura 9. Avaliação da frequência e da ativação de células NK no baço e tumor dos diferentes grupos experimentais. A. Frequência de células CD3⁻ NK1.1⁺. **B.** Frequência de células NK1.1⁺ produtoras de IFN- γ . **C.** Frequência de células NK1.1⁺ produtoras de TNF- α . **D.** Frequência de células CD3⁻ NK1.1⁺ CD27⁺ CD11b⁻. **E.** Frequência de células CD3⁻ NK1.1⁺ CD27⁺ CD11b⁺. **F.** Frequência de células CD3⁻ NK1.1⁺ CD27⁺ CD11b⁺ produtoras de IFN- γ . **G.** Frequência de células CD3⁻ NK1.1⁺ CD27⁺ CD11b⁺ produtoras de TNF- α . **H.** Frequência de células CD3⁻ NK1.1⁺ CD27⁻ CD11b⁺. **I.** Frequência de células CD3⁻ NK1.1⁺ CD27⁻ CD11b⁺ KLRG1⁺.

Discussão

Desde o início do seu uso na imunoterapia do câncer de bexiga, os mecanismos celulares envolvidos na ação antitumoral da BCG vêm sendo investigados. Sabe-se que seu sucesso como agente terapêutico se dá através da estimulação não-específica do sistema imunológico com o aumento de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ no infiltrado tumoral via Th1^{20,21}. Como pôde ser observado no presente estudo, tais citocinas estão presentes em abundância tanto no baço como no infiltrado tumoral dos animais tratados com BCG ou rBCG, sendo fundamentais para o retardo da progressão tumoral.

A adjuvancidade provocada pela imunoterapia da BCG induz o recrutamento de células NK, linfócitos T CD4 e T CD8, que aumentam os níveis de citocinas inflamatórias no infiltrado tumoral. Devido ao seu potencial imunomodulador, o BCG também já foi testado no tratamento de cânceres mais agressivos como melanoma²².

Em estudo no modelo ortotópico com as células tumorais MB49 e camundongos C57BL-6, foi encontrado através da análise de RNA mensageiro que a produção da citocina TNF- α é maior nos animais tratados com rBCG-S1PT do que com a parental, já sugerindo seu maior potencial antitumoral²³. Nesse mesmo estudo, a autora realiza ensaios *in vitro* de co-cultura entre MB49 e esplenócitos de animais previamente imunizados, que resultou em menor viabilidade das células tumorais para aqueles tratados com a rBCG. Nossos resultados corroboram com os resultados explorados anteriormente em que a rBCG retardou a progressão tumoral com maior significância do que a BCG.

Em células mononucleares de sangue periférico de voluntários humanos foi demonstrado que o tratamento das células com a BCG parental como com a rBCG-S1PT foi capaz de induzir maior ativação de linfócitos T CD4 e citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α ²⁴. Os nossos resultados, obtidos pelo modelo heterotópico de câncer de bexiga em camundongos, evidenciam a maior efetividade da rBCG-S1PT na ativação dessa população celular, mas também mostra o papel de outros tipos celulares na produção das citocinas, e evidencia o linfócito T CD8 como célula efetora desta imunoterapia, uma vez que essa população celular se encontra em maior abundância no infiltrado tumoral.

Com o objetivo de esclarecer a funcionalidade das células NK na imunoterapia de BCG, pesquisadores realizaram experimentos *in vitro* e *in vivo* em

camundongos deficientes nessas células, e demonstraram uma ausência da efetividade do controle antitumoral do tratamento ²⁵. Desta forma, é fundamental a investigação da modulação de células NK após o tratamento com BCG ou rBCG. Nossos resultados ressaltam uma importante modulação e ativação de células NK induzida pelo tratamento com a rBCG, o que destaca essa cepa recombinante como uma possível alternativa para o tratamento do câncer de bexiga.

Conclusão

Nossos resultados sugerem que a imunoterapia com a rBCG-S1PT modula positivamente a resposta imunológica no baço e no infiltrado tumoral, com destaque para os linfócitos T e células NK, enquanto controla a imunossupressão mediada por células T reguladoras, o que resulta na potencialização do efeito imunoterápico da rBCG-S1PR no controle tumoral.

Referência

1. GLOBAL Cancer Burden in 2020. **Global Cancer Observatory**, 2020. Disponível em: <https://infogram.com/globocan-2020-1h9j6qg7xdp8v4g>. Acesso em: 28 dez. 2023.
2. ESTIMATED number of prevalent cases (5-year) World. 2020. Disponível em: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Afalse%252C%2522prev%2522%253Atrue%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D. Acesso em: 15 jan. 2024.
3. Bladder Cancer. **Global Cancer Observatory**, 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/30-Bladder-fact-sheet.pdf>. Acesso em: 28 dez. 2023.
4. Câncer. **Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <->. Acesso em: 28 dez. 2023.
5. Bladder Cancer Risk Factors. **American Cancer Society**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/types/bladder-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>>. Acesso em: 28 dez. 2023.
6. Bladder cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, 13 abr. 2017. Acesso em 15 jan. 2024. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.23>

7. Os 100 anos da vacina BCG e as pesquisas do Butantan sobre novas aplicações do imunizante. **Portal do Butantan**. 31 ago. 2021. Disponível em: <https://butantan.gov.br/noticias/os-100-anos-da-vacina-bcg-e-as-pesquisas-do-butantan-sobre-novas-aplicacoes-do-imunizante>. Acesso em: 28 dez. 2023.
8. Vinod V, Vijayrajratnam S, Vasudevan AK, Biswas R. The cell surface adhesins of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiol Res**. Fev. 2020. doi: 10.1016/j.micres.2019.126392.
9. Redelman-Sidi G, Glickman MS, Bochner BH. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer--a current perspective. **Nat Rev Urol**. Mar 2014. 11(3):153-62. doi: 10.1038/nrurol.2014.15.
10. Kustrimovic N, et al. The Urinary Microbiome in Health and Disease: Relevance for Bladder Cancer. **Int J Mol Sci**. Jan. 2024. 31;25(3):1732. doi: 10.3390/ijms25031732.
11. Lenis AT, et al. Bladder Cancer: A Review. **JAMA**. 2020;324(19):1980–1991. doi:10.1001/jama.2020.17598.
12. PAOLO GONTERO et al. The Role of Bacillus Calmette-Guérin in the Treatment of Non–Muscle-Invasive Bladder Cancer. **European Urology**. v. 57, n. 3, p. 410–429, 1 mar. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2009.11.023>.
13. I.P. Nascimento, W.O. Dias, R.P. Mazzantini, E.N. Miyaji, M. Gamberini, W. Quintilio, V.C. Gebara, D.F. Cardoso, P.L. Ho, I. Raw, N. Winter, B. Gicquel, R. Rappuoli, L.C.C. Leite, Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing pertussis toxin subunit S1 induces protection against an intracerebral challenge with live *Bordetella pertussis* in mice. **Infect. Immun**. 68 (2000) 4877–4883. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.4877-4883.2000>

14. I.P. Nascimento, W.O. Dias, W. Quintilio, A.P. Christ, J.F. Moraes, M.D.C. Vancetto, G. Ribeiro-dos-Santos, I. Raw, L.C.C. Leite, Neonatal immunization with a single dose of recombinant BCG expressing subunit S1 from pertussis toxin induces complete protection against *Bordetella pertussis* intracerebral challenge. **Microbes Infect.** 10 (2008) 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.10.010>
15. P.M. Andrade, D.C. Chade, R.C. Borra, I.P. Nascimento, F.E. Villanova, L.C.C. Leite, E. Andrade, M. Srougi, The therapeutic potential of recombinant BCG expressing the antigen S1PT in the intravesical treatment of bladder cancer. **Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.** 28 (2010) 520–525. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2008.12.017>.
16. D.C. Chade, R.C. Borra, I.P. Nascimento, F.E. Villanova, L.C.C. Leite, E. Andrade, M. Srougi, K.L. Ramos, P.M. Andrade, Immunomodulatory effects of recombinant BCG expressing pertussis toxin on TNF-alpha and IL-10 in a bladder cancer model, **J. Exp. Clin. Cancer Res.** 27 (2008). <https://doi.org/10.1186/1756-9966-27-78>.
17. I.P. Nascimento, W.O. Dias, W. Quintilio, T. Hsu, W.R. Jacobs, L.C.C. Leite, Construction of an unmarked recombinant BCG expressing a pertussis antigen by auxotrophic complementation: Protection against *Bordetella pertussis* challenge in neonates, **Vaccine.** 27 (2009) 7346–7351. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.043>.
18. A.P. Christ, D. Rodriguez, J. Bortolatto, É. Borducchi, A. Keller, D. Mucida, J.S. Silva, L.C.C. Leite, M. Russo, Enhancement of Th1 lung immunity induced by recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin attenuates airway allergic disease. **Respir. Cell Mol. Biol.** 43 (2010) 243–252. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2009-0040OC>.
19. Jamile Ramos da Silva et al. Single immunizations of self-amplifying or non-replicating mRNA-LNP vaccines control HPV-associated tumors in mice. **Sci. Transl. Med.** 15, eabn3464(2023). DOI:10.1126/scitranslmed.abn3464

20. ASKELAND, E. J. et al. Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. **Advances in Urology**, v. 2012, p. 1–13, 2012. DOI: 10.1155/2012/181987
21. REDELMAN-SIDI, G.; GLICKMAN, M. S.; BOCHNER, B. H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer- a current perspective. **Nature Reviews Urology**, v. 11, n. 3, p. 153–162, 4 fev. 2014. DOI: 10.1038/nrurol.2014.15
22. BENITEZ, M. L. R. et al. *Mycobacterium bovis* BCG in metastatic melanoma therapy. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 103, n. 19, p. 7903–7916, 12 ago. 2019. DOI: 10.1007/s00253-019-10057-0
23. ANDRADE, P. M. et al. The therapeutic potential of recombinant BCG expressing the antigen S1PT in the intravesical treatment of bladder cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 28, n. 5, p. 520–525, 1 set. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2008.12.017>
24. DUNIA RODRÍGUEZ et al. In vitro Evidence of Human Immune Responsiveness Shows the Improved Potential of a Recombinant BCG Strain for Bladder Cancer Treatment. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 26 jun. 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.01460.
25. BRANDAU, S. et al. NK cells are essential for effective BCG immunotherapy. *International Journal of Cancer*, v. 92, n. 5, p. 697–702, 2001. DOI: 10.1002/1097-0215(20010601)92:5<697::aid-ijc1245>3.0.co;2-z.