

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

**Diego Mota de Souza**

**Efeito da inibição da indoleamina 2,3 dioxigenase associada ao  
BCG sobre células MB49 de carcinoma de bexiga – estudo *in vitro* e  
em modelo animal**

São Paulo

2016

**Diego Mota de Souza**

**Efeito da inibição da indoleamina 2,3 dioxigenase associada ao  
BCG sobre células MB49 de carcinoma de bexiga – estudo *in vitro* e  
em modelo animal**

Dissertação apresentada à Universidade  
Nove de Julho para obtenção do título de  
Mestre em Medicina.

Orientador: Prof. Humberto Dellê

São Paulo

2016

Diego Mota de Souza

“Efeito da inibição da indoleamina 2,3 dioxigenase associada ao BCG sobre células MB49 de carcinoma de bexiga – estudo in vitro e em modelo animal”

Diego Mota de Souza. – São Paulo, 2016.

n° f 61

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Medicina – Universidade Nove de Julho.

Efeito da inibição da indoleamina 2,3 dioxigenase associada ao BCG sobre células MB49 de carcinoma de bexiga – estudo in vitro e em modelo animal

1.indoleamina, 2-3 dioxigenase. 2.câncer de bexiga; 3.1-metil-D-triptofano;



São Paulo, 19 de dezembro de 2016.

**TERMO DE APROVAÇÃO**

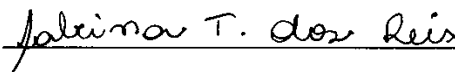
Aluno: **Diego Mota Souza**

Título da Dissertação: **“Efeito da inibição do indolemina 2, 3-dioxigenase associado ao BCG sobre células MB49 do carcinoma da bexiga em estudo in vitro e em modelo animal”**

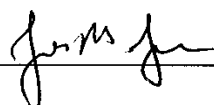
Presidente: Prof. Dr. Humberto Delle



Membro: Profa. Dra. Sabrina Thalita dos Reis



Membro: Prof. Dr. José Pontes Júnior



À minha família que sempre me apoiou e  
contribuiu para mais esta conquista em  
minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Esta é uma longa jornada que tivera início em um laboratório da graduação, em que tínhamos apenas uma caixinha de madeira, um livrinho vermelho que usávamos como ata, além de muita força de vontade, sonhos e alguém em quem pudéssemos nos espelhar.

Primeiramente agradeço a Deus, por permitir que eu concluísse mais uma conquista em minha vida.

Agradeço também a Universidade Nove de Julho – UNINOVE que me abriu as portas, dando-me condições e oportunidades para subir mais um degrau em minha vida acadêmica.

Em especial ao meu orientador professor Humberto Dellê, que me deu a primeira oportunidade rumo à pesquisa científica, aceitando-me como aluno, por sua dedicação e atenção em nos ensinar a arte chamada ciência.

Aos colaboradores Dr. Ivan P. Nascimento, Dr. José Pontes que nos cederam os insumos necessários para nosso projeto, e à veterinária Caroline Tulio, que realizou os exames de ultrassonografia nos animais do experimento, muito obrigado, pois sem estes, seria muito difícil prosseguir com esse projeto.

Agradeço a minha família e principalmente a minha mãe Cida e meu pai Xavier pela compreensão e apoio desde o início, pois mesmo sem entender o que eu fazia no laboratório, sempre estiveram dispostos a me ouvir e me apoiar em tudo. A Juliana, por sua paciência, compreensão e carinho.

Agradeço aos meus colegas do laboratório que mesmo nos momentos de dificuldade me apoiaram tanto nos experimentos, quanto com um ombro amigo. Chrisna, Janaina, Camila Malta, Yves, Rodrigo, Luiz, Cristina, Ana, Maiara, Stefani, Mariana e Marciano. Obrigado pelas risadas, discussões científicas e cafés.

Esta conquista não é só minha, pois os frutos colhidos nesse grupo de pesquisa foram plantados há muito tempo e tanto a colheita quanto o saborear desta conquista é mérito de toda a equipe.

“A ciência nunca resolve um problema sem  
criar pelo menos outros dez”.

(George Bernard Shaw)



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
1.1 Câncer de bexiga (CB).....	14
1.1.1 Epidemiologia .....	14
1.1.2 Patologia.....	14
1.1.3 Diagnóstico e tratamento do CB .....	15
1.1.4 Imunoterapia com BCG para CB (história) .....	17
1.2 Indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO) .....	19
1.2.1 IDO e BCG.....	21
1.3 Modelo murino de CB .....	21
2. OBJETIVOS .....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Cultura de células MB49.....	25
3.2 Viabilidade das células MB49 cultivadas com BCG.....	28
3.3 Imunocitoquímica.....	26
3.4 Imunofluorescência de BCG .....	29
3.5 Imunofluorescência para IDO em células MB49 .....	31
3.6 PCR em tempo real .....	31
3.7 Viabilidade celular através de brometo de MTT .....	33
3.8 Cocultura de células MB49 com células mononucleares .....	34
3.9 Animais .....	35
3.10 Inoculação transuretral de células MB49 .....	38
3.11 Grupos experimentais.....	37
3.12 Tratamentos com BCG e 1-metil-D-triptofano (MT) .....	40
3.13 Avaliação do desenvolvimento tumoral.....	40
3.14 Endpoint durante o acompanhamento dos animais .....	40
3.15 Eutanásia.....	40

3.16 Análise imunohistoquímica .....	40
3.17 PCR em tempo real para análise tumoral .....	40
3.18 Análise estatística .....	40
4. RESULTADOS .....	41
4.1 Estudo <i>in vitro</i> .....	41
4.1.1 Efeito da BCG sobre a viabilidade de células MB49 .....	41
4.1.2 Análise da expressão de IDO em MB49 através de imunocitoquímica.....	42
4.1.3 Análise da incorporação de BCG por células MB49 .....	43
4.1.4 Análise da expressão de IDO em células MB49 incubadas com BCG .....	44
4.1.5 Efeito da inibição da IDO sobre a viabilidade das células MB49 .....	45
4.1.6 Efeito da cocultura de células MB49 com células mononucleares e da exposição ao BCG sobre a expressão de IDO .....	46
4.2 Estudo <i>in vivo</i> .....	48
4.2.1 Efeito da inibição da IDO com MT sobre o crescimento do tumor de bexiga em modelo ortotópico .....	48
4.2.2 Análise da expressão da IDO em tumor de bexiga .....	55
4.2.3 Análise da expressão da IDO em bexiga normal exposta ao BCG .....	59
5. DISCUSSÃO .....	60
6. CONCLUSÃO .....	69
7. REFERÊNCIAS .....	70

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.....16

Figura 2.....26

Figura 3.....36

Figura 4.....36

Figura 5.....41

Figura 6.....42

Figura 7.....42

Figura 8.....43

Figura 9.....44

Figura 10.....45

Figura 11.....45

Figura 12.....46

Figura 13.....47

Figura 14.....52

Figura 15.....52

Figura 16.....53

Figura 17.....53

Figura 18.....54

Figura 19.....55

Figura 20.....56

Figura 21.....56

Figura 22.....57

Figura 23.....58

Figura 24.....59

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.....49

Tabela 2.....51

## LISTA DE ABREVIATURAS

AB - Antibiótico

AgNO<sub>3</sub> - Nitrato de prata

ATCC – American Type Culture Collection

BCG - Bacilo Calmette-Guerin

CB - Câncer de Bexiga

CEUA - Comitê de Ética em Pesquisa com Animais

DMBA - 7,12-dimetilbenzantraceno

FDA - Food and Drugs Administration

IDO - Indoleamina 2,3 dioxigenase.

IIBCG - Imunoterapia intravesical com Bacilo Calmette-Guérin

IL - Interleucina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

INF - Interferon

INFy - Interferon gama

Ky - Quinurenina

MT - 1-metil-D-Triptofano

PBS - Tampão Fosfato-Salino

PCR - Reação de Cadeia de Polimerase

RNA - Ácido Ribonucleico

RTTV - Ressecção transuretral do tumor vesical

SFB - Soro Fetal Bovino

Tis – Tumor *“in situ”*

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TNM - Classificação de Tumores Malignos

Trp - Triptofano

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

## RESUMO

A ressecção transuretral do tumor vesical (RTU), associada à imunoterapia com Bacilo Calmette-Guérin (BCG), é o primeiro passo no tratamento do câncer de bexiga (CB) não invasivo. Embora seja considerada padrão ouro, esta terapêutica parece ter seus benefícios limitados, já que em torno de 50% dos casos recorrem para as formas invasivas no primeiro ano pós RTU, sugerindo que haja algum escape tumoral, mesmo frente à imunoterapia. Levando em consideração que a presença do BCG induz a liberação de interferon-gama, um potente indutor da indoleamina-2,3 dioxigenase (IDO), molécula reconhecida como promotora de escape tumoral, é provável que a IDO tenha participação nos mecanismos desencadeados pela BCG no CB. O objetivo foi verificar o possível envolvimento da enzima IDO em CB, a fim de avaliar sua inibição química com metil-triptofano (MT) como possibilidade terapêutica. Na primeira etapa, ensaios com cultura de células MB49 de CB murino foram realizados. As células foram incubadas com BCG, avaliando-se: viabilidade celular, capacidade de incorporação de BCG e expressão de IDO. Além disso, foi realizada cocultura de células MB49 com células mononucleares e incubação com BCG, a fim de verificar a expressão de IDO. Foi avaliado também o efeito do MT sobre a viabilidade das células MB49. Para a segunda etapa, o modelo de CB ortotópico foi reproduzido, a fim de avaliar o tratamento com MT e BCG. Neste modelo, células MB49 foram inoculadas por via transuretral, sendo o tumor diagnosticado pela presença de hematúria e detecção de massa tumoral por ultrassom. Após estabelecimento tumoral, avaliou-se os tratamentos com MT, BCG e a associação de BCG com MT. Em um período de 35 dias, foram avaliados: sobrevida dos animais, massa e volume tumorais, expressão de IDO e número de linfócitos T intratumorais. Além disso, avaliamos a expressão de IDO em bexiga normal e instilada com BCG. Como resultados *in vitro*, a incubação com BCG diminui a viabilidade de células MB49 e houve internalização do bacilo pelas células. Células MB49 expressam constitutivamente a IDO e a incubação com BCG aumentou essa expressão. Não observamos efeito da BCG em aumentar a expressão de IDO em células mononucleares e em cocultura. Houve diminuição da viabilidade celular ao inibirmos a IDO com MT, porém a associação de MT com BCG não potencializou esse efeito. Com relação aos resultados *in vivo*, as inoculações com 250.000 e 100.000 células MB49 proporcionaram crescimento tumoral exacerbado, levando-nos a diminuir o número para 50.000 células. Mesmo assim, os animais não atingiram o protocolo pré-estabelecido de 35 dias. Não foram observados efeitos dos tratamentos com BCG, MT e BCG+MT sobre os parâmetros propostos. A expressão de IDO está presente em bexiga normal e aumenta significativamente no tumor induzido por MB49. Bexiga normal não tem aumento de IDO após 24 horas de incubação com BCG. Como conclusão, células MB49 expressam IDO em cultura e a incubação com BCG aumenta essa expressão. Anibição da IDO com MT diminui a viabilidade das células MB49. O tumor de células MB49 tem maior expressão de IDO quando comparado à bexiga normal. A ausência de efeito da BCG e do tratamento com MT sobre a evolução dos animais com tumor de células MB49 não descarta a possibilidade destes tratamentos influenciarem o CB, pois neste estudo esse modelo ortotópico foi muito agressivo, oferecendo baixa sobrevida devido a um crescimento tumoral exacerbado.

Palavras-chave: Indoleamina, 2-3 dioxigenase, câncer de bexiga, metil-triptofano.

## ABSTRACT

The transurethral resection of the bladder tumor (TUR), associated with Bacilo Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy, is the first step in the treatment of noninvasive bladder cancer (BC). Although it is considered gold standard, this therapy seems to have limited benefits, since around 50% of the cases return to invasive forms in the first year after TUR, suggesting that there is some tumor escape, even in the presence of immunotherapy. Concerning that the presence of BCG induces the release of interferon-gamma, a potent inducer of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), a molecule recognized as a tumor escape promoter, it is likely that IDO plays a role in the mechanisms triggered by BCG in CB. The objective was to verify the possible involvement of the enzyme IDO in BC, in order to evaluate its chemical inhibition with methyl tryptophan (MT) as a therapeutic possibility. In the first step, assays with culture of MB49 murine cells were performed. Cells were incubated with BCG, evaluating: cell viability, ability to incorporate BCG and expression of IDO. In addition, MB49 cells were cultured with mononuclear cells and incubated with BCG to verify the expression of IDO. The effect of MT on the viability of MB49 cells was also evaluated. For the second step, the orthotopic BC model was reproduced in order to evaluate treatment with MT and BCG. In this model, MB49 cells were transurethrally inoculated, and the tumor was diagnosed by the presence of hematuria and ultrasound tumor mass detection. After tumor establishment, the treatments with MT, BCG and the association of BCG with MT were evaluated. Over a period of 35 days, the animals were evaluated for survival, tumor mass and volume, IDO expression and number of intratumor T lymphocytes. In addition, we evaluated the expression of IDO in normal bladder and instilled with BCG. As *in vitro* results, incubation with BCG decreases the viability of MB49 cells and there was internalization of the bacillus by cells. MB49 cells constitutively express the IDO and incubation with BCG increased this expression. We observed no effect of BCG on increasing IDO expression in mononuclear cells and in coculture. There was a decrease in cell viability by inhibiting IDO with MT, but the association of MT with BCG did not potentiate this effect. Regarding the *in vivo* results, inoculations with 250,000 and 100,000 MB49 cells provided exacerbated tumor growth, leading us to decrease the number to 50,000 cells. Even so, the animals did not reach the pre-established protocol of 35 days. No effects of BCG, MT and BCG + MT treatments on the proposed parameters were observed. IDO expression is present in normal bladder and increases significantly in MB49-induced tumor. Normal bladder does not increase IDO after 24 hours of incubation with BCG. In conclusion, MB49 cells express IDO in culture and incubation with BCG enhances this expression. An inhibition of IDO with MT decreases the viability of MB49 cells. The MB49 cell tumor has higher IDO expression when compared to the normal bladder. The lack of effect of BCG and MT treatment on the evolution of animals with MB49 cell tumor does not preclude the possibility of these treatments influencing CB, since in this study this orthotopic model was very aggressive, offering low survival due to an exacerbated tumor growth.

Keywords: Indoleamine, 2-3 dioxygenase, bladder cancer, methyl-tryptophan.

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Câncer de bexiga (CB)**

#### **1.1.1 Epidemiologia**

Baseado no documento *World cancer report 2014* da International Agency for Research on Cancer (IARC), da organização mundial da saúde (OMS), o câncer ganha importante destaque quando a mortalidade oferecida por esta doença é observada. Estima-se cerca de 20 milhões de novos casos de câncer no mundo para 2020, com cerca de 12 milhões de mortes em decorrência desta (IARC.; 2016).

Dentre estes, o câncer de bexiga (CB) representa grande impacto, sendo o quarto tipo mais comum entre os homens e o oitavo como causa de morte nos Estados Unidos (Siegel et al., 2016).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que ocorram 9.670 novos casos de câncer de bexiga no Brasil em 2016, sendo 7.200 homens e 2.470 mulheres, representando cerca de 3.642 mortes neste ano em decorrência desta doença (INCA., 2016). O aumento da incidência normalmente é acompanhada com a idade, em que 9 entre 10 diagnósticos ocorre após os 55 anos, sendo diagnosticado em média aos 73 anos de idade (American Cancer Society., 2016).

#### **1.1.2 Patologia**

A ocorrência do CB normalmente está associada a fatores de risco que incluem a exposição ocupacional a agentes carcinogênicos e ao tabaco, que neste último compreende cerca de 50% dos casos de CB, sendo este o principal fator de risco para esta neoplasia (Cumberbatch et al., 2016).



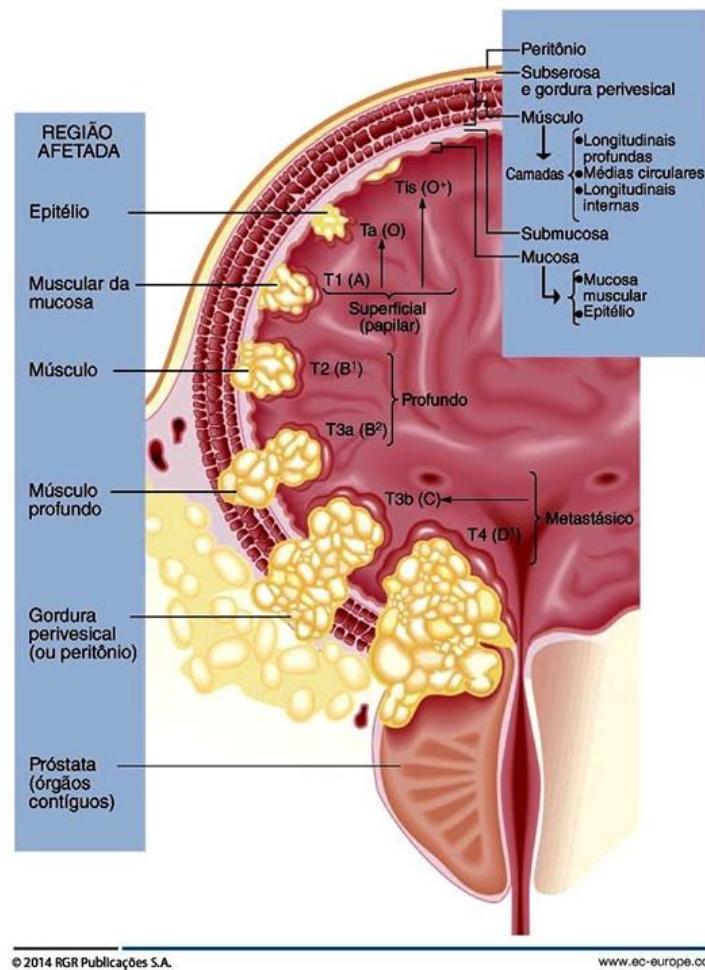
Tumores que não invadem a musculatura da bexiga são classificados como Ta (carcinoma papilífero não-invasivo), T1 (tumor que invade o tecido conjuntivo subepitelial) ou Tis (carcinoma *in situ*). Quando este invade outras estruturas é classificado em T2, tumor que invade o músculo; T3, tumor que invade tecido perivesical; e T4, tumor que invade estruturas como próstata, útero, vagina, parede pélvica ou abdominal (Figura 1). Conforme a disseminação em linfonodos ou metástase, obedecem a Classificação de Tumores Malignos (TNM) (American Cancer Society., 2016).

### **1.1.3 Diagnóstico e tratamento do CB**

O diagnóstico do paciente com suspeita de CB é realizado após coleta de biópsia da região anormal observada através de cistoscopia, sendo esta enviada para diagnóstico e estadiamento tumoral. (American Cancer Society., 2016).

Os tumores não invasivos geralmente são diagnosticados nas classificações Ta, T1 ou Tis (Figura 1) (Sextonet al., 2010). A RTTV é o primeiro passo no tratamento do CB não invasivo (CBNI). Em estudo publicado em 2010, Williams e colaboradores enfatizam que cerca de 45% dos casos submetidos a RTTV irão recorrer em até 1 ano para as formas invasivas (T2, T3 e T4), sugerindo estar relacionado a tumores microscópicos e/ou remanescente de células tumorais (Williams et al.; 2010).

## Câncer de bexiga ■



**Figura 1.** Ilustração morfológica e de estadiamento do câncer de bexiga urinária. Obtido de NeoUro. <http://neouro.com.br/tratamentos/cancer-de-bexiga/>.

Nesse caso, a imunoterapia intravesical com Bacilo Calmette-Guérin (IIBC) é amplamente utilizada afim de reduzir a recorrência de tumores ressecados (Sexton et al., 2010; Patel et al., 2015). Mesmo sendo considerado como padrão ouro, este tratamento parece ter seus benefícios limitados, já que em até 50% dos casos submetidos ao IIBC recorrem para as formas invasivas em um ano após RTU (Newton et al., 2014; Askeland et al., 2012; Zlotta et al., 2009; Malmstrom et al., 2009; Saint et al., 2003; Fernandez-Gomez et al., 2007; Sylvester et al., 2006).

#### 1.1.4 Imunoterapia com BCG para CB (história)

No final do século 19, William Coley, baseados na observação de que alguns pacientes com câncer apresentavam remissão inesperada da doença, quando desenvolviam certos tipos de infecções bacterianas, iniciou experimentos e de forma deliberada, infectou pacientes diagnosticados com câncer com diversas bactérias. No entanto, esta prática poderia trazer consequências drásticas, como infecções bacterianas graves, já que viviam em uma época em que não se havia descoberto os antibióticos. Baseando-se neste conceito, Coley e colaboradores acabaram usando injeções de bactérias mortas através de calor, sendo esta então conhecida como toxinas de Coley (Hoption Cann et al., 2003).

Em 1919 Albert Calmette e Camille Guérin, após 230 cultivos realizados durante 11 anos, desenvolveram uma *cepa* de *Mycobacterium bovis* que não era capaz de causar a doença da tuberculose, batizada então como bacilo de Calmette-Guérin (Luca and Mihaescu., 2013).

Em estudos clínicos realizados nos anos 60, foi observado que bebês vacinados com BCG tinham uma baixa incidência de Leucemia, o que chamou a atenção para o uso desta vacina para outros tipos de cânceres (Rosenthal et al., 1972). Em meados dos anos 70, o urologista Dr. Jean deKernion foi pioneiro com o relato do uso da BCG com sucesso em melanoma de bexiga, no entanto tivera a proposta para o aprimoramento da IIBCG negada pela “Comissão de proteção ao ser humano”, alegando ser um procedimento muito arriscado (deKernion et al., 1975). Morales e colaboradores demonstraram no Instituto Nacional do Câncer, em 1976, a redução dos tumores de bexiga em 9 pacientes tratados com BCG, elegendo a IIBCG como padrão ouro para

tratamento pós RTTV em CBNI (Morales et al., 1976). Em 1980, Dr Donald Lamm publicou o primeiro estudo controlado, defendendo que o uso da BCG intravesical reduzia os tumores em CB, porém o uso desta somente fora autorizado em 1990 pela “Food and Drugs Administration” (FDA) (Lamm., 1992).

A vacina é aplicada no lúmen da bexiga em ciclos repetidos somente após a terapia inicial de RTTV (Bohle et al., 2003). De forma convencional, é utilizada na dose de 40 mg a 120 mg de BCG , que são reconstituídos em 50 ml de solução salina e instilado na bexiga através de um cateter transuretral. A solução com BCG deve permanece por duas horas dentro da bexiga, sendo administrada em 6 doses semanais, seguidas de 3 doses semanais no 3º e 6º mês, e então 3 doses semanais a cada 6 meses até o 36º mês. Apesar de sua eficácia, a terapia intravesical com BCG não está livre de complicações graves podendo desenvolver infecções causadas pela bactéria.

O BCG quando utilizado nesse contexto ativa respostas imunológicas que culminam no combate às células neoplásicas (Riemensberger et al., 2002). Após a administração intravesical desta vacina, uma vasta gama de citocinas e interleucinas (IL) foram detectadas na urina, interferon gama (INF- $\gamma$ ) da proteína 10, que estimula as colônias de macrófagos, fatores de necrose tumoral (TNF-alfa), IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, além de outros fatores que estabelecem uma complexa resposta imunológica a infecção, assim como a regressão do tumor (Fleischmann et al., 1989; Watanabe et al., 2003).

Entretanto, as respostas frente ao tratamento imunológico são complexas, parecendo este ter estratégias de escape, justificado pelas altas

taxas de recorrência pós IBCG, fazendo se necessária intervenção médica por meio da cistectomia (Newton et al., 2014).

Estudos têm demonstrado que a maioria dos cânceres humanos sintetiza uma enzima chamada indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), apontando a molécula como um fator protetor ao câncer por garantir um “escape imunológico”, ou seja, aquisição de tolerância imunológica ao tecido neoplásico (Platten et al., 2012).

## **1.2 Indoleamina 2, 3-dioxigenase (IDO)**

A IDO é uma enzima imunomoduladora, com importante papel em proteger o tecido embrionário contra o sistema imune materno. Classicamente conhecida pelo seu papel na via de degradação do triptofano (Trp), emergiu recentemente com importante papel nas células T como indutor de tolerância imunológica. Estudos realizados por Munn e colaboradores demonstraram a modulação positiva na expressão de IDO em células trofoblásticas e através da administração de 1-metil-D-Triptofano (MT), um inibidor químico da IDO, camundongos fêmeas rejeitam o feto através de linfócitos T alorreativos (Munn et al., 1998). O mesmo grupo evidenciou através de experimentos “*in vitro*”, que macrófagos expressando IDO inibem a proliferação de linfócitos T através da depleção do triptofano (Munn et al., 1998).

Este mecanismo imunomodulador promovido pela IDO ainda não está completamente elucidado, porém sugere-se que a depleção do Trp seja o seu principal mecanismo, já que este é essencial para síntese proteica e consequentemente para proliferação celular, mais especificamente dos linfócitos T (Munn et al., 1998).

Em estudos recentes, evidenciou-se que este mecanismo imunomodulador promovido pela IDO também ocorre de forma indireta através da ação dos catabólitos resultantes da depleção do Trp, mais especificamente derivados da quinurenina. Terness e colaboradores demonstraram em estudos “*in vitro*”, que é possível inibir a proliferação de linfócitos T através de células dendríticas expressando IDO, potencializando este efeito com a adição de derivados da quinurenina (Terness et al., 2002). Estes efeitos não se limitam somente a inibição da proliferação, mas também a indução de apoptose em linfócitos T, além de suprimirem tímócitos aloreativos “*in vitro*” (Fallarino et al., 2002).

Em estudos utilizando transplante de pele, a administração destes catabólitos da quinurenina promoveram a sobrevida do enxerto, sugerindo a supressão de linfócitos T aloreativos (Bauer et al., 2005).

A IDO é expressa predominantemente na placenta e em órgãos linfoides (Yoshida et al., 1980; Munn et al., 1980), podendo ser encontrada em outros órgãos, sugerindo que seu efeito imunomodulador ocorra de forma específica. Encontrada também em macrófagos ativados (Hu et al., 1995), participa de mecanismos anti-microbianos, associados a baixas concentrações de Trp promovida pela IDO (Nagineni et al., 1996; Pfefferkorn., 1984; Bodaghi et al., 1999; Byrne et al., 1986).

Estudos têm demonstrado que alguns tipos de câncer expressam IDO, apontando a enzima como um fator protetor ao câncer, favorecendo um pior prognóstico ao paciente (Platten., 2012).

Embora a IDO esteja sendo estudada em diversos tipos de câncer, apenas um estudo relatou a expressão da IDO em carcinoma de bexiga

urinária, porém não houve descrição de quais células estariam produzindo IDO, bem como os efeitos da IDO sobre este tipo de câncer (Uyttenhove., 2003).

### **1.2.1 IDO e BCG**

Sabe-se que o mais potente indutor da IDO é o INF- $\gamma$ , sugerindo uma provável relação entre IDO e BCG, já que a exposição à IBCG induz a produção de INF- $\gamma$  (Newton et al., 2014).

Tanner e colaboradores demonstraram a atividade da IDO induzida pela vacinação com um antígeno específico da *Mycobacterium tuberculosis*, o antígeno 85A, correlacionando esta com a modulação positiva de INF- $\gamma$  plasmático dos indivíduos vacinados (Tanner et al., 2014).

Mesmo sem evidências na literatura que correlacionem a IDO com tratamento IBCG pós RTTV, existem fortes evidências desta relação em quadros de depressão. Em estudos com animais expostos ao BCG, estes desenvolveram alterações comportamentais, justificadas pelo aumento de INF- $\gamma$ , com consequente aumento da IDO cerebral, que neste último promove a depleção do Trp, aminoácido essencial no anabolismo da serotonina (Moreau et al., 2005; Vijaya et al., 2014).

### **1.3 Modelo murino de CB**

Para indução de tumor de bexiga, normalmente são utilizados três modelos animais, podendo estes ser por indução através de substâncias carcinogênicas, inoculação de células humanas ou implantação de xenoenxerto em camundongos imunodeficientes (camundongo nude) e o modelo singênico

com a utilização de camundongos imunocompetentes (Günther et al., 1999). A indução carcinogênica por meio de substâncias químicas torna-se desfavorável, pois o procedimento pode levar até 11 meses, podendo este também gerar outros focos tumorais primários (Soloway., 1975; Williams and Murphy., 1976). O transplante de fragmentos de tumor ou a inoculação de células tumorais humanas em camundongos nude torna-se inviável para este estudo, já que estes são atímicos, característica que inviabiliza uma resposta T helper, sendo esta essencial a IBCG.

Ratliff demonstrou que as respostas induzidas na IBCG, enfatizando a necessidade de uma resposta timo dependente na ação antitumoral induzida pelo tratamento, reforçando assim a necessidade da utilização de um modelo imunocompetente (Ratliff., 2000).

O local de escolha para inoculação, assim como a linhagem celular, pode influenciar tanto o desenvolvimento, quanto a terapêutica a ser utilizada (Kasman and Voelkel-Johnson., 2013). Neste contexto, o modelo murino ortotópico de inoculação de células MB49 é amplamente utilizados. A linhagem celular advinda de camundongos C57BL/6 foi inicialmente induzida por 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), desenvolvendo assim um modelo imunocompetente, associado a uma linhagem celular com características similares ao CBNI humano, sendo assim um modelo que melhor representa as respostas imunológicas induzidas pelo BCG (Ratliff., 2000), podendo esta ser inoculadas tanto no espaço subcutâneo, quanto na própria bexiga urinária, que neste ultimo torna se essencial para estudos com tratamento IBCG (Summerhayes and Franks., 1979; Chade et al., 2008; Günther et al., 1999; Kasman and Voelkel-Johnson., 2013).



Chen e colaboradores, demonstraram a similaridade imunogênica entre as linhagens celulares MB49 e T24 (Tumor de bexiga humano). Comparando a expressão imunológica destas em modelo animal frente ao tratamento IBCG, elegendo o modelo murino com células MB49 como uma excelente ferramenta para estudos relacionados ao tratamento no CB (Chen et al., 2009).

## 2. OBJETIVOS

O objetivo foi verificar o possível envolvimento da enzima IDO em CB, a fim de avaliar sua inibição com MT como possibilidade terapêutica adjuvante ao BCG.

Mais detalhadamente, os objetivos foram:

- Verificar se células MB49 em cultura expressam IDO e se a interação das células com BCG influencia a expressão de IDO;
- Verificar o efeito do MT sobre a viabilidade das células MB49;
- Analisar a expressão de IDO em bexiga normal e em tumor de bexiga ortotópico de células MB49;
- Analisar a influência do BCG sobre a expressão de IDO em tumor de bexiga;
- Analisar o efeito do MT, associado ou não ao BCG, sobre o crescimento tumoral e sobre o infiltrado de linfócitos T.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

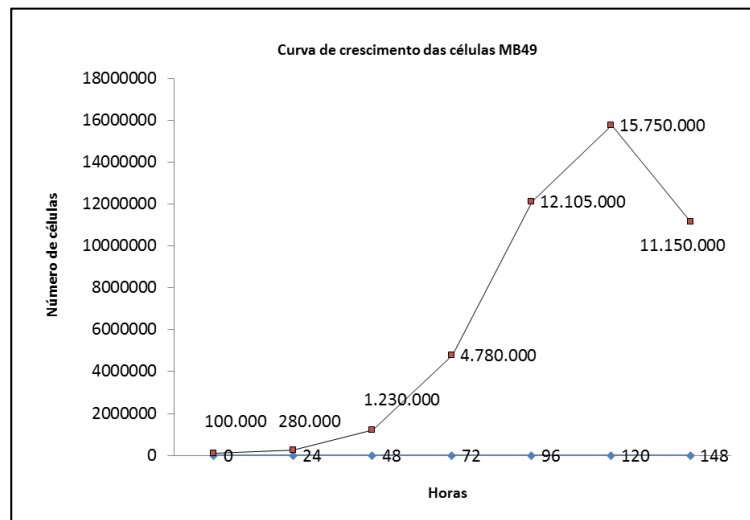
#### 3.1 Cultura de células MB49

Foi utilizada a linhagem celular MB49, que são células de carcinoma de bexiga de camundongos C57BL/6. Estas células foram doadas pelo Dr. Ivan P. Nascimento do Instituto Butantã, e mantidas em cultura no Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular da Universidade Nove de Julho – UNINOVE.

As células MB49 foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com antibióticos (50 U/ml penicilina e 0,05 mg/ml estreptomicina) (Sigma Chemical Company, St Louis, MO), 2 mmol/L L-guatamina, além de soro fetal bovino (SFB) 10%. Foram mantidas sob condições adequadas em estufa com temperatura de 37° C e CO<sub>2</sub> a 5%.

Para determinar a taxa de crescimento das células MB49, realizamos ensaio de curva de crescimento. Células MB49 foram cultivadas e após atingirem confluência de aproximadamente 80%, foram tripsinizadas e aliquotadas em 6 garrafas de 25 cm<sup>3</sup> como descrito acima. Cada garrafa foi subcultivada com 1X10<sup>5</sup> células. Para estabelecimento da taxa de crescimento, foram tripsinizadas a cada 24 horas e contadas através do método de *azul de tripan* em *câmara de Neubauer*.

A partir dos dados apresentados na figura 2, definimos qual o melhor período para utilização da células tanto para os experimentos *in vitro* e *in vivo*.



**Figura 2.** Curva de crescimento das células MB49.

### 3.2 Viabilidade das células MB49 cultivadas com BCG

Para avaliar o efeito direto da BCG sobre células MB49, foram realizadas incubações de MB49 com BCG durante 24 horas e 48 horas. As células foram incubadas em placa de 24 poços e divididas em grupos (n=3) nas proporções de 100:1, 10:1, 1:1 e 0,01:1 UFC de BCG por célula MB49.

Método de análise: Após o tempo proposto, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer.

### 3.3 Imunocitoquímica

Imunocitoquímica foi realizada para analisar a expressão de IDO em células MB49. As células foram suavemente lavadas utilizando tampão Fosfato-Salino (PBS), e, em seguida, fixadas durante 10 minutos uma solução

de paraformaldeído 4% em PBS. Para o bloqueio da peroxidase endógena, foi preparada uma solução 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (em metanol) e as células incubadas durante 30 min, cobertas da luz. As células foram incubadas com anti-IDO (MAB5412; Merck Millipore, Billerica, MA) a 4° C durante 12 horas. Para completar a sanduíche, as células foram incubadas com os reagentes LSAB + System-HRP (K0690; Dako Co, Dinamarca), por 30 minutos em cada fase, intercaladas por um banho em PBS, por 5 minutos para remoção dos componentes não ligados à fase anterior (Dako; K0690 Co, Dinamarca). Finalmente, foi utilizado o substrato-cromógeno DAB, diluído em tampão específico, fornecido pelo fabricante, por 20 minutos, protegidos da luz, para completar a reação (K346811; Dako Co, Dinamarca). As células foram então, contracoradas com Hematoxilina (Dako; CS700 Co, Dinamarca), por 5 minutos, para a evidenciação dos núcleos celulares, desse modo, facilitando a visualização e evidenciação celular.

*Método de análise:* Essa foi uma análise qualitativa, apenas para verificar se células MB49 expressam IDO constitutivamente. Células coradas em marrom foram consideradas positivas para IDO.

### **3.4 Imunofluorescência de BCG**

A partir dos experimentos de viabilidade, foi estabelecido o uso de 1:1 UFC de BCG por célula MB49. Os bacilos de BCG foram marcados com um *cell tracker* fluorescente vermelho (PKH26GL, código 106K0477, Sigma-Aldrich), conforme protocolo sugerido pelo fabricante. Células MB49 foram incubadas com BCG por um período de 24 horas e a aquisição das imagens foi

feita utilizando-se o microscópio de fluorescência Zoe™ Fluorescente Cell Imager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Método de análise: Para evidenciação da internalização do bacilo, foi feita a sobreposição das imagens adquiridas com filtro branco e filtro vermelho de um mesmo campo. Esta foi uma análise qualitativa.

### **3.5 Imunofluorescência para IDO em células MB49**

Para analisar a expressão da IDO na presença do BCG, utilizamos imunofluorescência como ferramenta quantitativa. Células MB49 foram incubadas com BCG marcadas conforme item anterior. Para a marcação específica da IDO, as células MB49 foram fixadas em paraformaldeído a 4% em PBS durante 15 minutos a 37°C e, em seguida, mantido em PBS contendo 0,5% de albumina de soro bovino e 0,1% de Triton X-100. Foi utilizado o anticorpo primário monoclonal Anti-IDO conjugado com PE (01:25; Clone # 700838, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN), e incubado durante 2 horas a 37°C. A marcação por fluorescência foi detectada utilizando o aparelho Zoe™ Fluorescente Cell Imager (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). A marcação por imunofluorescência do BCG foi feita da conforme descrito no item (anterior).

Método de análise: Imagens foram adquiridas usando-se filtro branco, filtro vermelho (para identificação do BCG) e filtro verde (para identificação de células positivas para IDO). Foi realizada sobreposição das imagens para

imunolocalizarmos a presente de IDO e BCG, concomitantemente. Esta foi uma análise qualitativa.

### **3.6 PCR em tempo real**

PCR em tempo real foi realizada para avaliar a expressão da IDO como ferramenta quantitativa em células MB49. Os primers específicos para IDO de camundongo foi confeccionado utilizando-se o *Primer-Blast* do NCBI (National Center for Biotechnology Information). Foram eles: sense 5'-GGTCTTGACGCTCTACT-3' e antisense 5'-TATTGCTGTTCCCTACTG-3').

Para a extração de RNA total de células foi utilizado o kit PureLink RNA Mini kit (Invitrogen, CA, USA), conforme protocolo indicado pelo fabricante. Para a transcriptase reversa, foi utilizada a enzima SuperScript III (Invitrogen, Califórnia, EUA), enquanto que para a PCR em tempo real foi usado o kit SYBR Green (Invitrogen, Califórnia, EUA). Ciclos (40) de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e curva de melting foram realizados no equipamento 7500™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Califórnia EUA). Como housekeeping, foi utilizado o gene beta-actina (sense 5' – GCAGCTCAGTAACAGTCCGCCT - 3' e antisense 5' - AGGAGTACGATGAGTCCGGCCC – 3').

Método de análise: a análise quantitativa foi realizada utilizando-se a fórmula do delta-delta CT.

### **3.7 Viabilidade celular através de brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT)**

As células em confluência de 70% foram tripsinizadas e subcultivadas em placa de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^4$  MB49 por poço. Após 24 horas em crescimento, foram deixadas por mais 24 horas em *starvation*. Foram divididas em grupos controle (n=8), células que não recebera tratamento, MT (n=4), células que receberam apenas o tratamento com MT, BCG (n=4), células que receberam apenas o tratamento com BCG e BCG+MT, células que receberam ambos os tratamentos, MT e BCG. Os estímulos foram realizados por um período de 24 horas. Após o tempo proposto o meio de cultura foi relirado e substituído por MTT em todos os grupos. Estas foram incubadas por 3 horas. Foi retirado todo o conteúdo dos poços com auxílio de uma pipeta multicanal. Para exposição dos cristais de *E,Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan*, adicionamos Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO) para expor os cristais formados pelo MTT.

Método de análise: foi realizada a leitura da absorbância a 620 nm com auxílio de um leitor de placas (Anthos 2020, Eugendorf, Austria). Os resultados estão expressos em densidade óptica.

### **3.8 Cocultura de células MB49 com células mononucleares**

Células mononucleares foram extraídos de um baço de camundongo fêmea C57BL/6. O tecido foi triturado com o auxílio de um bisturi 4,0 e lavado em PBS. Em seguida, o homogenato foi ressuspensionado em 4 mL de PBS, sendo acrescido de 3 mL de Ficoll-Paque (Invitrogen, Califórnia, EUA). Após centrifugação a 400 G por 30 minutos, as células mononucleares foram coletadas, lavadas em RPMI e cultivadas com meio RPMI. As células foram distribuídas em placa de 6 poços, respeitando-se: monocultura de células



mononucleares 4.000.000 células por poço; monocultura de células MB49 2.000.000 células por poço; e cocultura de células mononucleares e células MB49 4.000.000 e 2.000.000, respectivamente. As incubações foram de 24 horas. Nas coculturas, as células MB49 foram expostas ao BCG (1:1) por 24 horas, o sobrenadante foi removido, e as células mononucleares introduzidas nos poços contendo MB49 aderidas. Ao término, RNA foi extraído conforme descrito anteriormente.

### **3.9 Animais**

Foram utilizados 41 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 (*mus musculus*, Rodentia, Mammalia), selecionados entre seis a oito semanas de vida. Estes animais são criados no biotério central da Universidade Nove de Julho com o propósito de pesquisa científica.

Os animais foram acondicionados sob condições normais, alocados em mini-isoladores com água e alimentação *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEUA) da Universidade Nove de Julho.

### **3.10 Inoculação trasuretral de células MB49**

Para a inoculação nos animais, as células em confluência de aproximadamente 80% foram tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultura sem L-glutamina, SFB e AB, na concentração de  $5 \times 10^2$  por microlitro. A viabilidade foi determinada através da exclusão por *azul de tripan*, onde a viabilidade celular foi de no mínimo 90%. Foram inoculados 100 µL desta solução, contendo as células. Inicialmente, realizamos inoculação com 250.000

células (n=7), pois é o número encontrado na literatura (Andrade *et al.*, 2010). Entretanto, pelo alto índice de mortalidade, optamos por baixar o número para 100.000 (n=6) e posteriormente para 50.000 (n=21).

O procedimento iniciou com a anestesia do animal através de injeção intraperitoneal de uma solução a base de cloridrato de cetamina 10% e cloridrato de xilazina 2%, alcançando, respectivamente, as concentrações de 100 mg/kg e 10 mg/kg. Após sedação, o animal foi transferido para uma base cirúrgica aquecida, onde permaneceu sob regime anestésico, sendo administrado rebote anestésico a cada 40 minutos até o fim do procedimento.

Para o procedimento de cateterização transuretral, primeiramente, verificamos a responsividade do animal, para então darmos início a este passo. Foi utilizado um cateter estéril de polietileno 24 G sem agulha, que após ser lubrificado com gel hidrossolúvel, foi delicadamente introduzido, inicialmente em um ângulo de 45°, da calda em direção à cabeça, onde após ultrapassar a porção pélvica, foi alinhado em menor ângulo no sentido longitudinal do corpo do animal. Com auxílio de uma pipeta de 200 µl, retiramos por sucção a urina que efluir naturalmente, que neste caso, caracterizará o posicionamento correto do cateter na bexiga urinária, garantindo assim o espaço volumétrico necessário para os próximos passos. Para o procedimento de lesão urotelial, utilizamos 10 µl de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) 0,3 M, que primeiramente foi inserido no cateter, a qual foi instilado com auxílio de uma seringa de 1 mL. Comprimindo o êmbolo a partir da marca de 100 µL, este foi infundido pela pressão exercida através do ar comprimido, permanecendo no lúmen intravesical por 10 segundos, garantindo assim uma lesão controlada, assim como um sítio de implantação apropriado as células MB49. Após o tempo

proposto o conteúdo foi lavado por pelo menos 3 vezes com PBS, afim de remover qualquer resíduo que pudesse interferir na integridade celular a ser implantada. Após este processo efetuamos a instilação da alíquota de 100 µL com  $5 \times 10^4$  de células no cateter e infundimo-las assim como o método descrito anteriormente. O animal permaneceu anestesiado, com a alíquota celular mantida no lúmen intravesical por 60 minutos, bastando deixar o êmbolo da seringa pressionado a partir da marca de 100 µL. Terminado o tempo proposto, o animal permaneceu em pós-operatório com temperatura controlada e hidratação. O mesmo ficou em observação por um período entre 30 a 60 minutos.

### 3.11 Grupos experimentais

Apenas animais com tumor mensurável por ultrassom após 5 dias da inoculação foram incluídos no estudo, sendo tratados e acompanhados da seguinte maneira:

- **Veículo (n=6):** animais que receberam apenas veículo (tanto para BCG como para MT) durante um período de 28 dias, após 7 dias da inoculação das células MB49;
- **BCG (n=5):** animais que receberam BCG e veículo para MT durante um período de 28 dias, após 7 dias da inoculação das células MB49;
- **MT (n=5):** animais que receberam MT e veículo para BCG durante um período de 28 dias, após 7 dias da inoculação das células MB49;

- **BCG + MT (n=5):** animais que receberam BCG e MT durante um período de 28 dias, após 7 dias da inoculação das células MB49;

A cada 3 dias foi verificado o peso dos animais, bem como a presença de hematúria macroscópica. O ultrassom foi realizado nos dias 7 e 21 para avaliação e acompanhamento da progressão tumoral.

O protocolo compreende o acompanhamento dos animais por um período de 35 dias, de acordo com estudo previamente publicado do grupo do Butantã que nos doou as células MB49 e o BCG (Andrade et al., 2010).

Para verificar a possibilidade da BCG influenciar a expressão de IDO em bexiga sem tumor, realizamos a lesão urotelial em 6 animais, sendo que 3 receberam a BCG e todos foram eutanasiados com 24h pós-estímulo.

### **3.12 Tratamentos com BCG e 1-metil-D-triptofano (MT)**

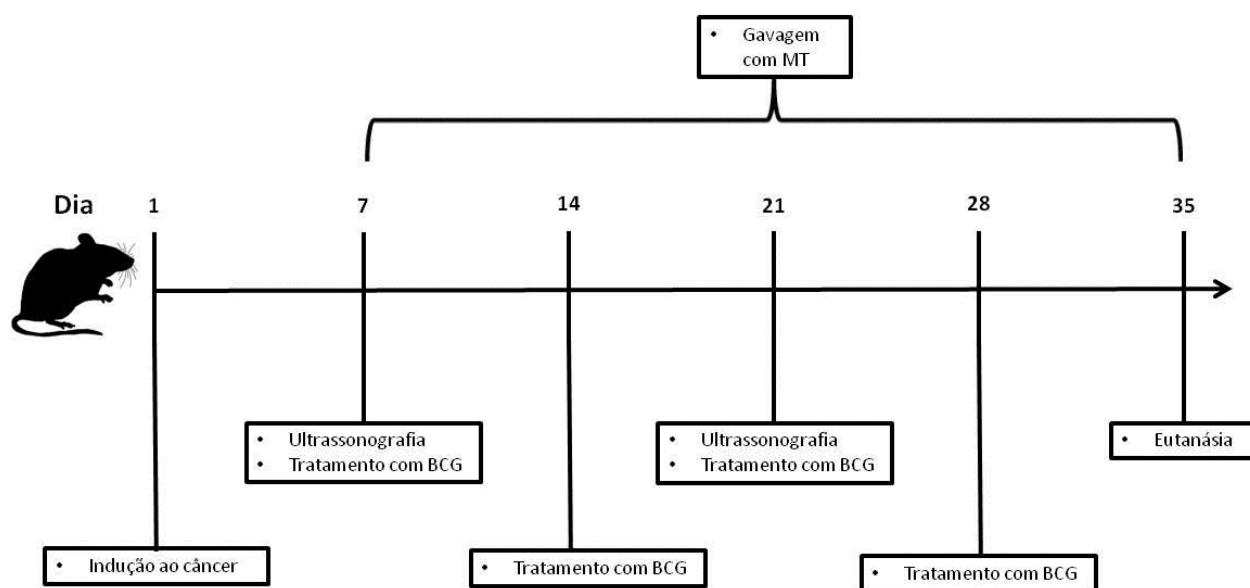
Após 7 dias da inoculação com as células MB49, os animais que tiveram tumor mensurável, foram acompanhados por mais 28 dias, sendo submetidos aos procedimentos periódicos com instilação transuretral com BCG e gavagem de MT. No grupo controle, os animais receberam apenas o veículo respectivo aos tratamentos, PBS para BCG e óleo de milho para MT. O BCG (Cepa Moreau, doado gentilmente pelo Dr. Ivan P. Nascimento do Instituto Butantã, São Paulo, Brasil) foi instilado nos dias 14, 21 e 28, após mensuração do tumor no que ocorreu no dia 7, na concentração de  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia (UFC) ressuspenso em 100uL BPS, permanecendo por 60 minutos no lumen vesical a cada aplicação. Este procedimento foi realizado no mesmo regime anestésico utilizado para inoculação. Já o MT (1-Methyl-D-tryptophan,

cat. 452483, Sigma-Aldrich) será administrado por via oral (gavagem) na concentração de 100 mg/Kg, sendo administrado diariamente até o fim do regime experimental. Este foi dissolvido em óleo de milho pouco antes da administração.

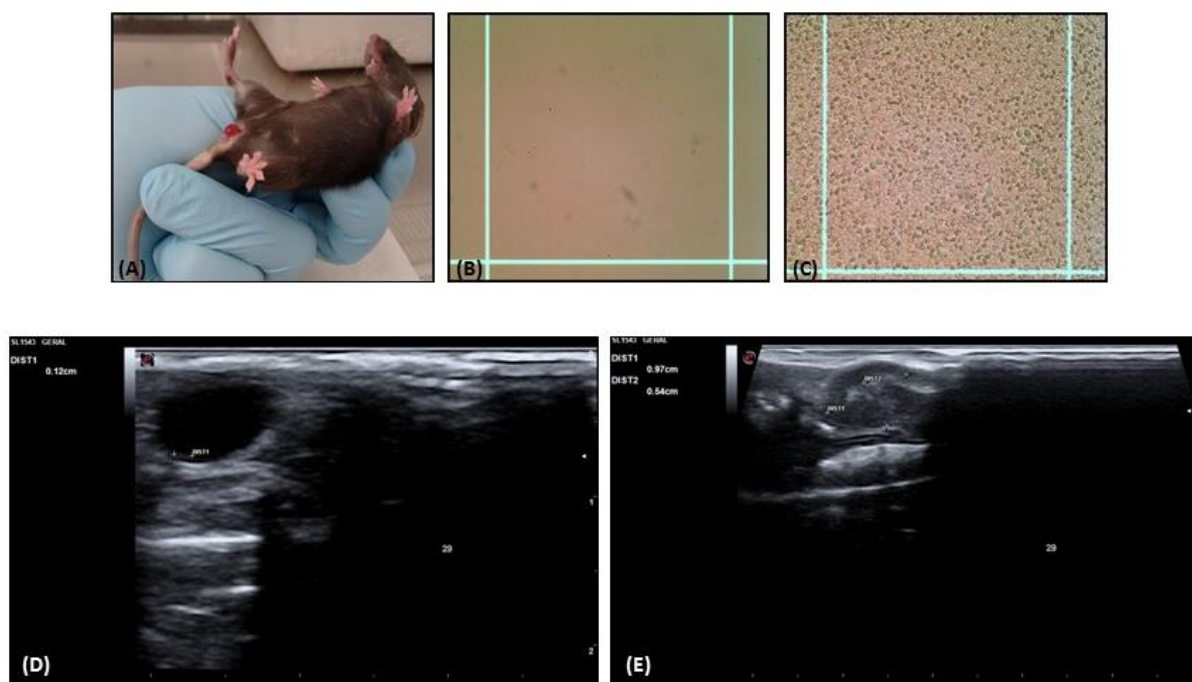
### **3.13 Avaliação do desenvolvimento tumoral**

Atualmente, um dos métodos mais sensíveis para a avaliação da localização e do crescimento tumoral é através da marcação das células neoplásicas antes da infusão, o que pode ser feito utilizando-se um corante fluorescente ou vetores que induzem expressão de moléculas que possibilitam a emissão de fluorescência. No entanto, estas técnicas são caras por conta dos equipamentos que capturam as imagens e dos reagentes. Portanto, a ultrassonografia surge como uma atraente ferramenta para avaliação *in vivo* do crescimento tumoral, sendo amplamente utilizada para avaliação de crescimento tumoral em camundongos que receberam células tanto pela via intramural como pela via transuretral (Jäger et al., 2014; Jäger et al., 2013; Chan et al., 2012; Dobek and Godbey., 2011; Chan et al., 2009; Patel et al., 2010).

Para este procedimento, contamos com o apoio da Dra. Caroline Correa de Tullio Augusto Roque, veterinária com ampla experiência em pesquisa básica, assim como no diagnóstico clínico por imagem em animais de pequeno porte. O aparelho de ultrassom utilizado foi o MyLabTouch (102810020, Esaote Healthcare).



**Figura 3.** Tratamentos e ultrassonografia realizados durante o protocolo experimental.



**Figura 4.** Hematúria e ultrassonografia como ferramentas para o diagnóstico do tumor induzido pela inoculação das células MB49. Hematúria macroscópica positiva (A), hematúria microscópica negativa (B), hematúria microscópica positiva (C), ultrassom de positividade para tumor de células MB49 em estágio inicial (D) e ultrassom de positividade para tumor de células MB49 em estágio avançado (E).

### **3.14 Endpoint durante o acompanhamento dos animais**

Embora o termo endpoint signifique um objetivo a ser alcançado dentro de um estudo clínico, em experimentação animal este termo significa o momento em que se deve intervir para evitar o sofrimento animal, nem que esta intervenção seja a eutanásia, conforme definição original publicada pelo Canadian Council on Animal Care (CCAC) em 1998: *“Endpoint is defined as the point at which an experimental animal's pain and/or distress is terminated, minimized or reduced, by taking actions such as killing the animal humanely, terminating a painful procedure, or giving treatment to relieve pain and/or distress”* (CCAC Guidelines, 1998). O endpoint adotado foi a eutanásia, a partir de perda de peso acima ou igual a 10% do peso no início do protocolo e/ou prostração com pelo eriçado.

### **3.15 Eutanásia**

Para a eutanásia, os animais foram anestesiados para o procedimento de eutanásia, que foi realizada com quetamina e xilazina, pela via intraperitoneal, nas doses de 300 mg/Kg e 30 mg/Kg, respectivamente. Estas doses equivalem a três vezes a dose anestésica convencional, usadas como forma de eutanásia.

O animal foi imobilizado em decúbito dorsal para assim ser feita uma incisão vertical até a altura do processo xifoide. Em cortes paralelos foram retirados o osso esterno e parte das costelas, para assim ter acesso à cavidade torácica. Com auxílio de uma agulha de 23G acoplada em uma seringa de 1ml com EDTA, efetuamos a punção ventricular no coração. Estas foram

congeladas em amostras de sangue total e fração plasmática para análises de biologia molecular.

Em seguida, foi coletada a bexiga urinária deste animal, devendo ser congeladas imediatamente em nitrogênio líquido, e em seguida armazenadas no freezer -80°C. Para as amostras destinadas a histologia, foram coletadas em formol tamponado 10x, permanecendo por no mínimo 48 horas, para então serem submetidas aos processos de inclusão, emblocamento e cortes histológicos.

### **3.16 Análise Imunohistoquímica**

Imunohistoquímica foi utilizada para avaliação de IDO e linfócitos T (CD3<sup>+</sup>).

As secções de tecido advindos de tumor de bexiga, foram parafinizadas, cortadas com uma espessura de 4 µm e fixadas a lâminas de vidro para histologia. As lâminas foram mantidas por 30 minutos dentro de estufa à temperatura de 60°C e submetidas ao processo de desparafinização e reidratação

Para a remoção da parafina e reidratação do tecido, as lâminas passaram por baterias constituídas por banhos em 3 fases de xilol, por 9 minutos cada, seguidas de 2 banhos em álcool absoluto, e 2 banhos em álcool 96% por 5 e 3 minutos, respectivamente.

Após a remoção do álcool através de um banho em água destilada por 5 minutos, os tecidos foram submetidos à irradiação com micro-ondas, por 15 minutos, em tampão de citrato, para aumentar a recuperação antigênica e mantidos em temperatura ambiente, por 20 minutos para esfriarem.



A seguir, os cortes foram mergulhados em uma solução de bloqueio de peroxidase endógena, composto por metanol e Peróxido de hidrogênio (concentração final de 3%) protegidos da luz, por 30 minutos e após lavagem em PBS, tiveram os cortes isolados com o uso de PAP Pen, e submetidas à bloqueios endógenos de avidina e biotina, por 15 minutos cada, com lavagens em PBS entre as etapas.

Para aumentar o bloqueio de ligações inespecíficas, as amostras foram submetidas a um último bloqueio composto por 6% de leite reidratado (Nestlé Brasil LTDA, São Paulo, Brasil). Os seguintes Anticorpos foram utilizados como anticorpos primários: CD3 anti-rabbit (ab16669, abcam, Cambridge, Reino Unido) e anti-ido (MAB5412; Merck Millipore, Billerica, MA) Todos os anticorpos foram diluídos 1:100. Para completar o sanduíche, as secções foram incubadas com reagentes LSAB + System-HRP (K0690; Dako Co, Dinamarca). Finalmente, o substrato-cromógeno DAB foi usado para completar a reação (K346811; Dako Co, Dinamarca).

A análise quantitativa das células positivas para cd3 foi conduzida de forma cega, contadas sob ampliação microscópica x400 e os resultados são expressos com o número de células positivas por campo.

### **3.17 PCR em tempo real para análise tumoral**

PCR em tempo real foi realizada para avaliar a expressão da IDO como ferramenta quantitativa em tumores de células MB49. Os primers específicos para IDO foram descritos anteriormente, bem como o método de PCR em tempo real. A diferença nesta fase é que a extração de RNA foi realizada pelo

método Trizol (Invitrogen, CA, USA), por tratar-se de tecido. Para tanto, seguimos o protocolo conforme recomendação do fabricante.

Método de análise: a análise quantitativa foi realizada utilizando-se a fórmula do delta-delta CT.

### **3.18 Análise estatística**

Para análise estatística, a comparação entre os períodos de análise, foram utilizados os testes ANOVA One-way com pós-teste ou t-Student não pareado. A significância estatística foi considerada a partir do  $p < 0,05$ . Os resultados foram representados pela média  $\pm$  erro padrão.

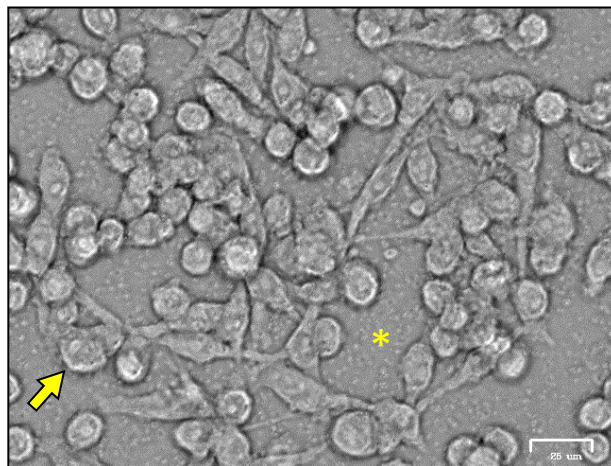
## 4. RESULTADOS

Os resultados foram divididos em duas seções, uma *in vitro* e a outra *in vivo*.

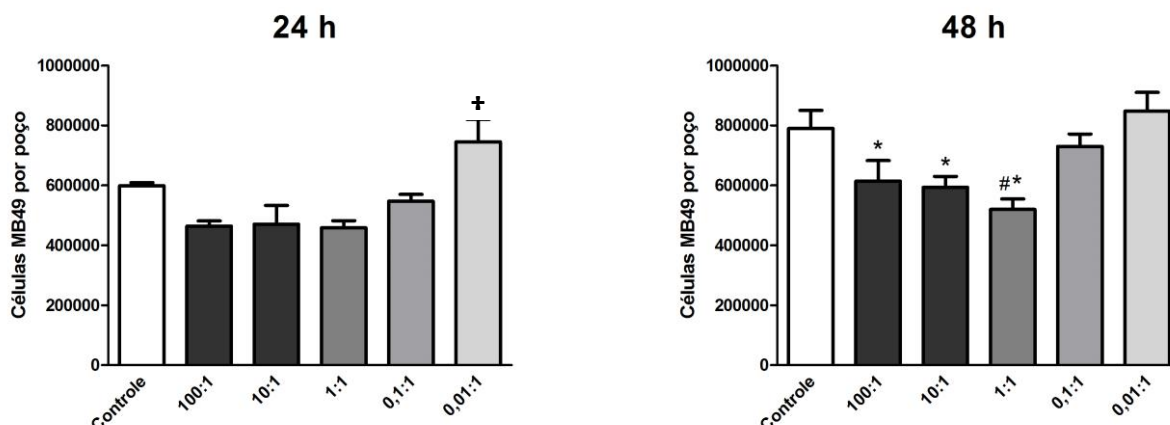
### 4.1 Estudo *in vitro*

#### 4.1.1 Efeito da BCG sobre a viabilidade de células MB49

Para avaliar o efeito direto da BCG sobre células MB49, foram realizadas incubações de MB49 com BCG durante 24 horas e 48 horas. A Figura 5 ilustra as células MB49 incubadas com BCG. A incubação com 100:1, 10:1 e 1:1 UFC de BCG por célula MB49 tiveram efeito em diminuir o número de células MB49 em ambos os períodos de incubação (Figura 6). A incubação com 0,01:1 UFC de BCG por célula MB49 aumentou o número de células MB49 após 24 horas (Figura 6).



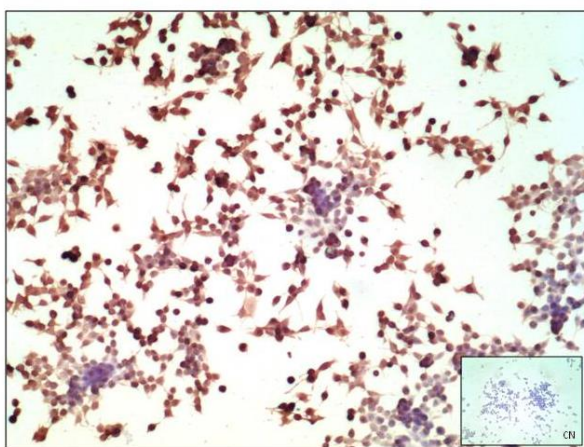
**Figura 5.** Incubação de células MB49 com BCG. Microscopia óptica invertida. A seta indica célula MB49 e o asterisco indica uma área intercelular com inúmeros bacilos.



**Figura 6.** Efeito da incubação de células MB49 com BCG. Controle (sem BCG), 100:1 UFC de BCG por MB49, 10:1 UFC de BCG por MB49, 1:1 UFC de BCG por MB49 e 0,01:1 UFC de BCG por MB49. †  $p < 0,05$  vs. todos os outros grupos; \*  $p < 0,05$  vs. Controle; #  $p < 0,05$  vs. 0,1:1 e 0,01:1.

#### 4.1.2 Análise da expressão de IDO em MB49 através de imunocitoquímica

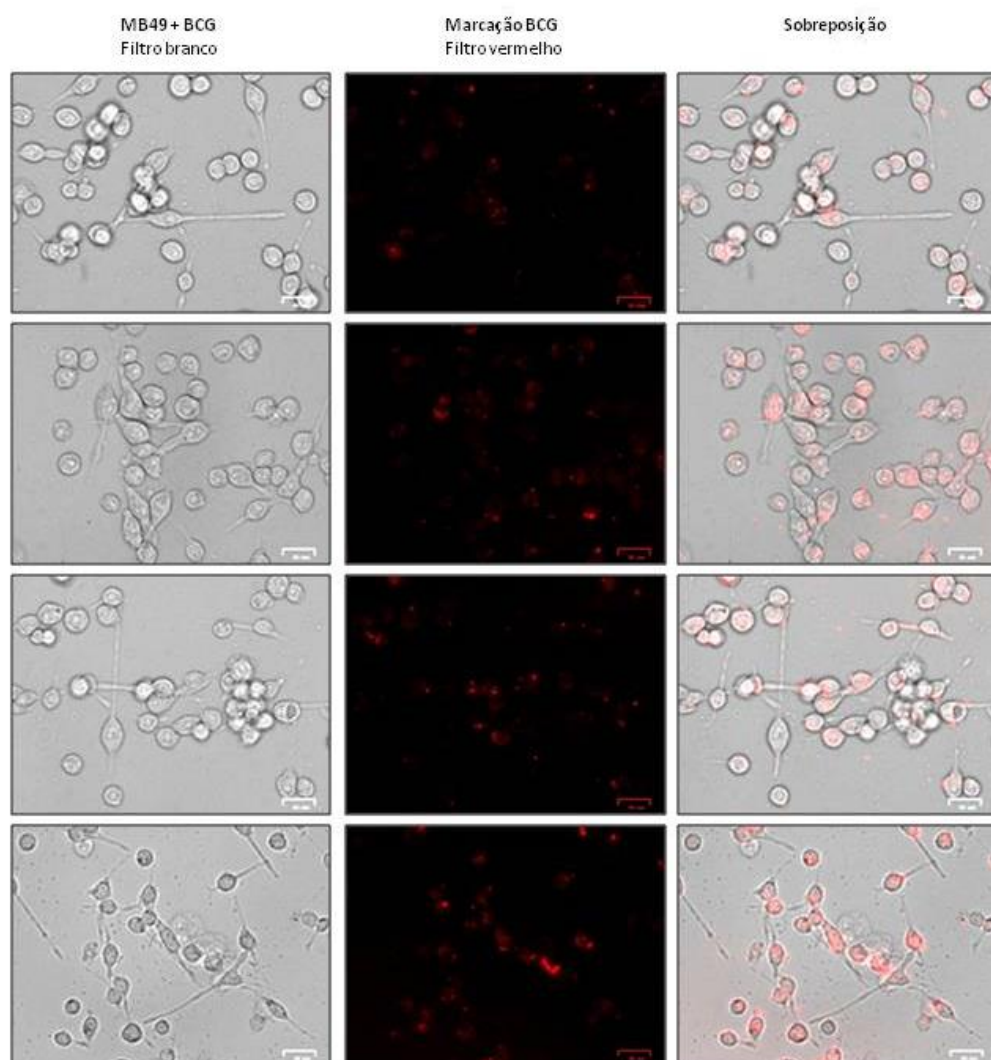
Para verificar se a IDO é produzida constitutivamente pelas células MB49, realizamos imunocitoquímica para IDO após subcultivo. Conforme podemos observar na Figura 7, as células MB49 produzem IDO, porém há subpopulações que são negativas para IDO.



**Figura 7.** Imunocitoquímica para IDO a partir de cultura de células MB49. Microscopia óptica com magnificação de 100X. O controle negativo foi realizado com a omissão do anticorpo anti-IDO (canto inferior direito).

#### 4.1.3 Análise da incorporação de BCG por células MB49

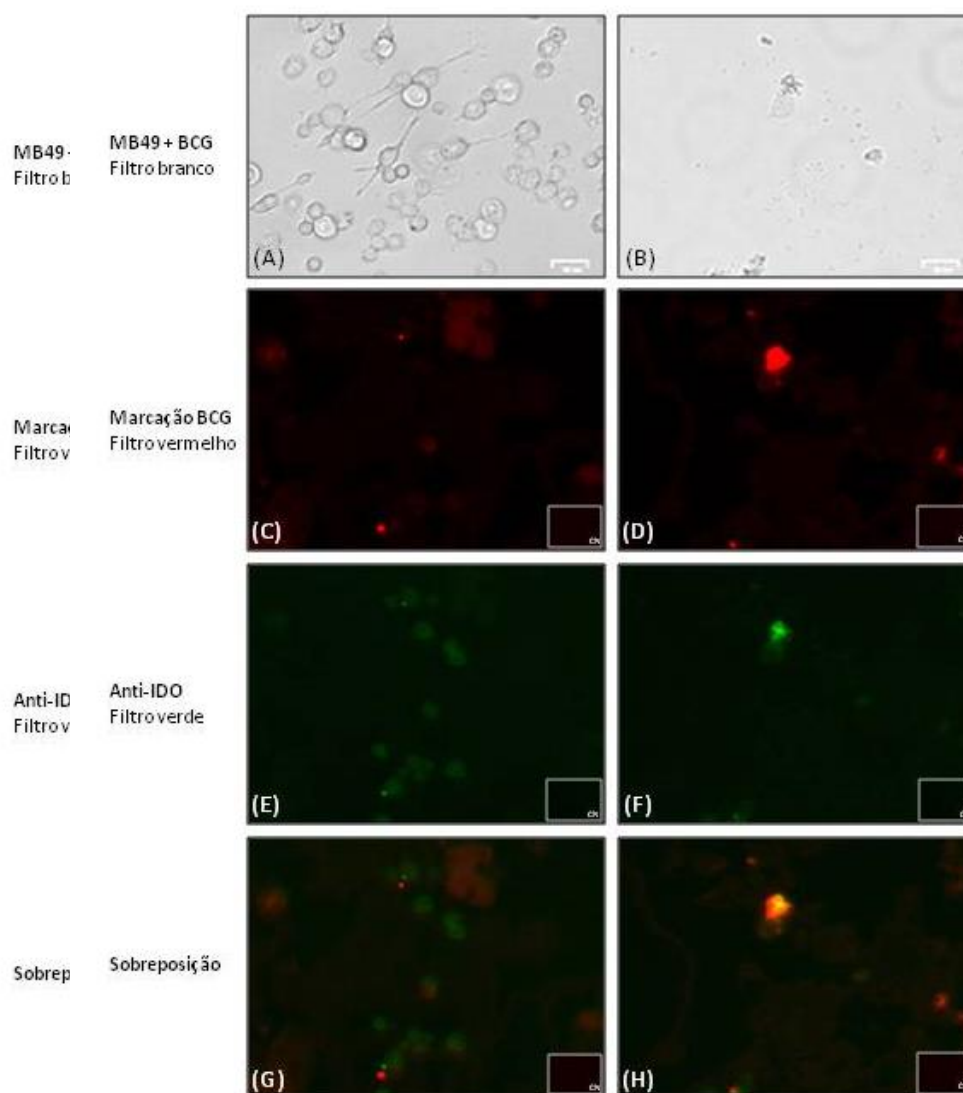
Para verificar se os bacilos estavam exercendo efeito direto sobre as células MB49, avaliamos a endocitose dos bacilos por meio de fluorescência. Os bacilos foram marcados com fluoróforo vermelho. Após 24 horas de incubação, pudemos observar que os bacilos foram endocitados pelas células MB49. A Figura 8 ilustra este fenômeno.



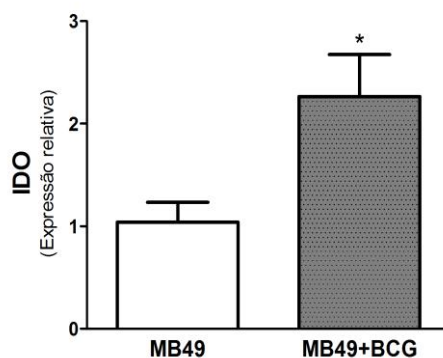
**Figura 8.** Imunofluorescência para identificação de BCG (vermelho). Na coluna da esquerda, há imagens de células MB49 incubadas com BCG, extraídas com filtro branco. Na coluna do meio, imagens capturadas com filtro vermelho, evidenciando-se os bacilos em vermelho. Já na coluna da direita, os bacilos aparecem no interior das células MB49, a partir da sobreposição de imagens.

#### 4.1.4 Análise da expressão de IDO em células MB49 incubadas com BCG

Para analisar a expressão de IDO na presença de BCG, utilizamos imunofluorescência como ferramenta qualitativa e PCR em tempo real como ferramenta quantitativa. Conforme demonstrado na Figura 9, alguns pontos positivos para o bacilo (vermelho) coincidiram com marcação para IDO (verde). Quanto ao PCR em tempo real, a presença de BCG levou a um aumento na expressão de IDO (Figura 10) (expressão relativa de  $1,04 \pm 0,19$  no MB49 e  $2,27 \pm 0,41$  no MB+BCG;  $p < 0,05$ ).



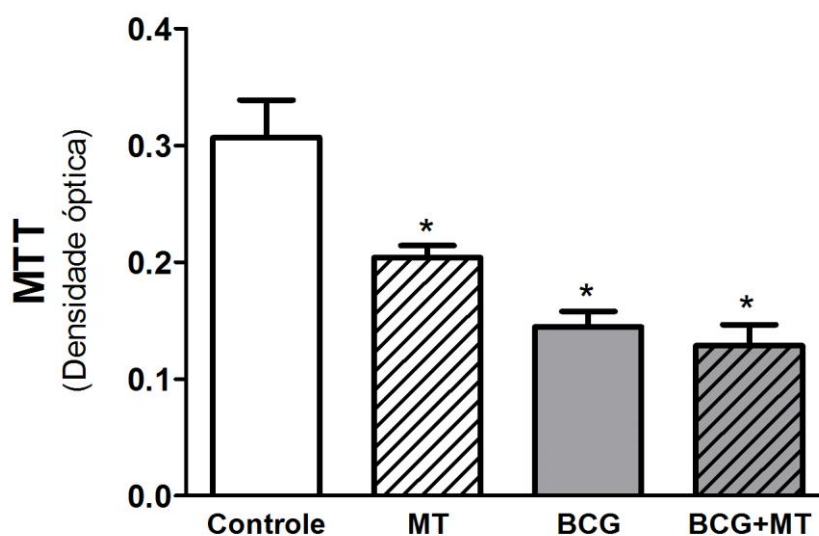
**Figura 9.** Imunofluorescência para identificação de BCG (vermelho) e de células positivas para IDO (verde). Imagens de células MB49 incubadas com BCG (1:1) (A e B), imagens capturadas com filtro vermelho para destaque dos bacilos (C e D), Imagens capturadas com filtro verde para destaque da IDO (E e F) e imagens sobrepostas (filtro vermelho + filtro verde) (G e H). Há pontos em comum para ambas marcações (G e H).



**Figura 10.** PCR em tempo real para IDO (n=3 cada situação).  
\*  $p < 0,05$  vs. MB49.

#### 4.1.5 Efeito da inibição da IDO sobre a viabilidade das células MB49

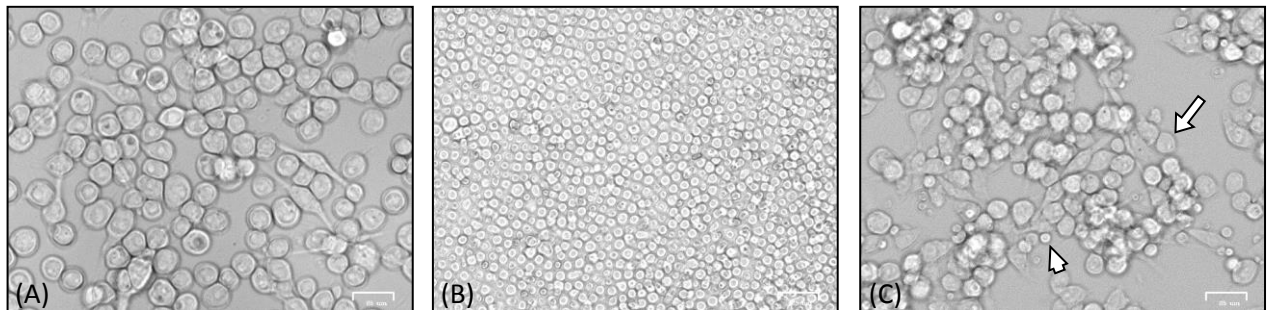
Nesta fase, tratamos células MB49 com o inibidor da IDO (MT), incubadas ou não com BCG. Conforme demonstrado na Figura 11, o tratamento com MT diminuiu a viabilidade das células ( $0,20 \pm 0,01$  OD no MT vs.  $0,31 \pm 0,09$  no Controle;  $p < 0,05$ ), bem como a incubação com BCG ( $0,14 \pm 0,01$  DO;  $p < 0,05$  vs. Controle). A associação de MT com BCG não potencializou a queda da viabilidade das células MB49 ( $0,13 \pm 0,02$  DO;  $p < 0,05$  vs. Controle).



**Figura 11.** Análise da viabilidade celular pelo método MTT. **Controle**, células MB49 sem tratamento com MT e sem incubação com BCG (n=8). **MT**, células MB49 tratadas com MT (n=8). **BCG**, células MB49 incubadas com BCG (50:1) (n=4). **BCG+MT**, células MB49 incubadas com BCG e tratadas com MT (n=4). \*  $p < 0,05$  vs. Controle.

#### 4.1.6 Efeito da cocultura de células MB49 com células mononucleares e da exposição ao BCG sobre a expressão de IDO

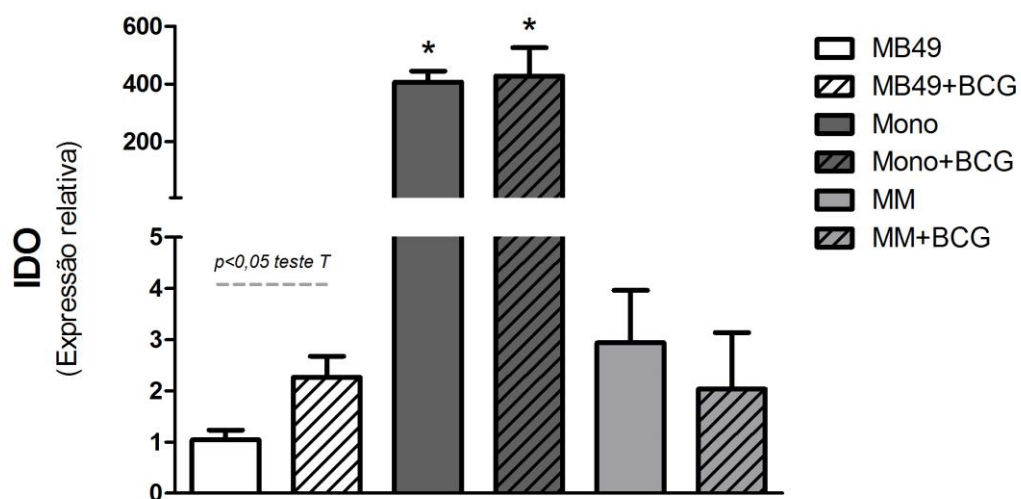
Para analisar um possível efeito da BCG sobre a expressão da IDO em células MB49 e em células mononucleares, realizamos cocultura. A Figura 12 ilustra a cultura pura de células MB49, a cultura pura de células mononucleares e a cocultura.



**Figura 12.** Imagem representativa de cultura de MB49 (A), de cultura de células mononucleares isoladas de baço de camundongo (B) e de cocultura de células MB49 com mononucleares (C). A seta aponta para uma célula MB49 e a cabeça da seta aponta para uma célula mononuclear, em cocultura.



A partir da análise por PCR em tempo real, pudemos observar que a incubação com BCG aumentou a expressão de IDO em cultura pura de células MB49, porém não alterou a expressão de IDO em cultura de células mononucleares e em cocultura (Figura 13).



**Figura 13.** PCR em tempo real para análise da expressão de IDO a partir de cultura pura de células MB49, cultura de células mononucleares de baço de camundongo (Mono) e cocultura de células MB49 e células mononucleares (MM). Triplicata cada situação. \*  $p < 0,05$  vs. MB49, MB49+BCG, MM e MM+BCG.

## **4.2 Estudo *in vivo***

### **4.2.1 Efeito da inibição da IDO com MT sobre o crescimento do tumor de bexiga em modelo ortotópico**

A primeira etapa da fase *in vivo* foi estabelecer o modelo murino ortotópico de tumor de bexiga. Conforme descrito nos Materiais e Métodos, iniciamos o estudo inoculando 250.000 células MB49 pela via intravesical, inclusive já com os tratamentos propostos no estudo. De 7 animais inoculados, 6 foram diagnosticados com tumor de bexiga após inoculação de células MB49. Como podemos observar na Tabela 1, todos os seis animais inoculados com 250.000 células alcançaram o *endpoint*. A principal causa foi a perda de peso, acompanhada de prostração. Três animais foram à óbito, sendo 2 por conta de excesso de anestésico durante o procedimento de ultrassonografia. Devido ao fato de todos os animais terem alcançado o *endpoint*, nós passamos a utilizar 100.000 células na inoculação intravesical, ao invés de 250.000 células. Dos 6 animais inoculados, 5 foram diagnosticados com tumor de bexiga. Conforme podemos observar na Tabela 1, todos os 5 animais diagnosticados com tumor de bexiga atingiram o *endpoint*, tendo como principal causa a perda de peso e prostração.

**Tabela 1.** Primeira fase do estudo *in vivo* com a inoculação de 250.000 e 100.000 células MB49 para estabelecer o modelo murino de tumor de bexiga ortotópico.

<b>Caso</b>	<b>nº células inoculadas</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Tempo até diagnóstico tumoral (dias)</b>	<b>Dias com tumor</b>	<b>Tempo até o Endpoint (dias)</b>	<b>Motivo Endpoint</b>
1	250.000	Controle	7	8	15	Perda de peso
2	250.000	Controle	7	16	23	Óbito
3	250.000	MT	7	8	15	Overdose anestésica no procedimento US
4	250.000	MT	7	8	15	Overdose anestésica no procedimento US
5	250.000	BCG	7	11	18	Perda de peso
6	250.000	BCG+MT	7	23	30	Perda de peso
7	100.000	Controle	21	14	35	Perda de peso
8	100.000	Controle	7	14	21	Perda de peso e prostração
9	100.000	MT	7	20	27	Óbito
10	100.000	BCG	7	19	26	Óbito
11	100.000	BCG+MT	7	15	22	Perda de peso e prostração

Por conta do número baixo de animais e pelo fato dos animais não terem chegado a completar o protocolo de 35 dias, não tivemos como observar efeitos relacionados aos tratamentos nesta fase do estudo. Assim, mais uma vez adaptamos o protocolo, diminuindo o número de células a serem inoculadas pela via intravesical, ou seja, realizamos a inoculação com 50.000 células MB49.

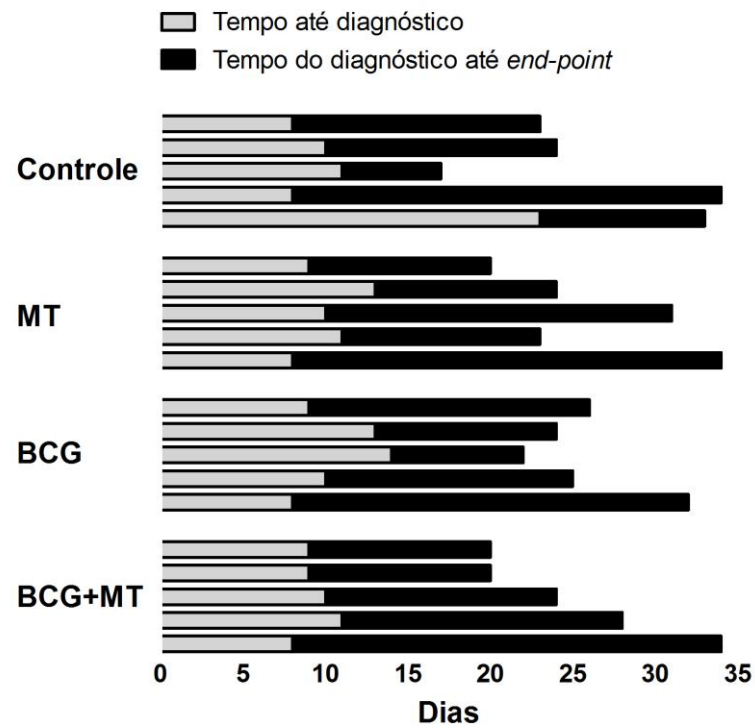
Dos 23 animais inoculados com 50.000 células, apenas 3 não tiveram tumor confirmado e, portanto, não entraram no protocolo. A Tabela 2 apresenta os dados detalhados dos animais. Dos 20 animais que seguiram com o

protocolo, todos alcançaram *endpoint* e, portanto, não completaram o protocolo de 35 dias. Não houve diferença estatística entre os grupos com relação ao tempo até o diagnóstico, tempo com tumor e tempo até o *endpoint* (a partir da inoculação) (Tabela 2 e Figura 14). Também não observamos diferença na massa e volume dos tumores (Tabela 2 e Figuras 16 e 17). Houve metástase em 2 casos, casos estes tratados com BCG+MT (não houve diferença quando realizado Qui-quadrado).

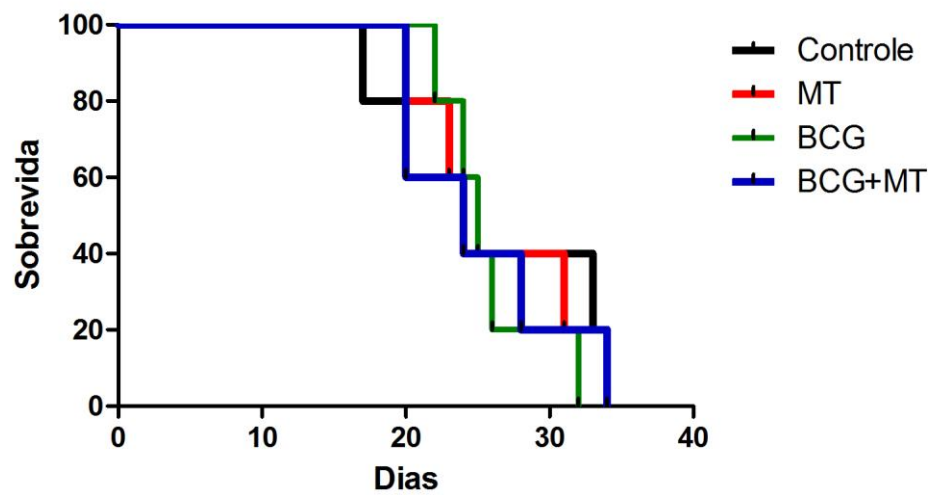
A Figura 18 ilustra os achados histológicos, onde podemos observar a formação de uma massa tumoral de células MB49, a qual infiltra em tecido muscular liso da bexiga. Há importantes áreas de necrose, acompanhada de infiltrado inflamatório.

**Tabela 2:** Dados dos animais inoculados com 50.000 células MB49 e distribuídos nos diferentes grupos.

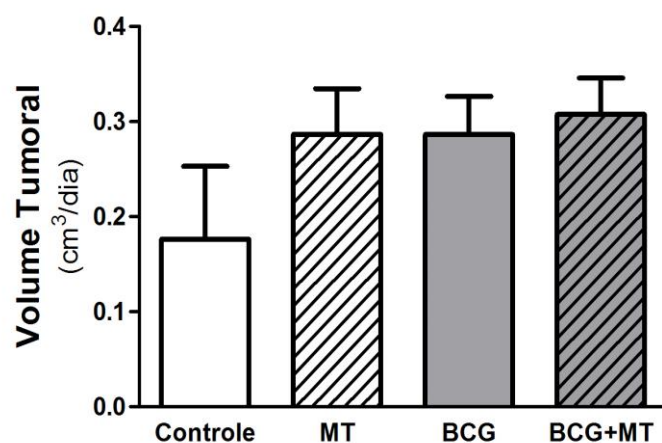
<b>Caso</b>	<b>nº células inoculadas</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Tempo até diagnóstico tumoral (dias)</b>	<b>Tempo com tumor (dias)</b>	<b>Tempo até <i>Endpoint</i> (dias)</b>	<b>Motivo <i>Endpoint</i></b>	<b>Massa tumoral* (mg/dia)</b>	<b>Volume tumoral* (cm3/dia)</b>
1	50.000	Controle	23	10	33	Perda de peso e prostração	9,58	0,1314
2	50.000	Controle	8	26	34	Óbito	24,09	0,0349
3	50.000	Controle	11	6	17	Perda de peso e prostração	9,82	0,0044
4	50.000	Controle	10	14	24	Perda de peso e prostração	24,63	0,3309
5	50.000	Controle	8	15	23	Perda de peso e prostração	46,17	0,3803
6	50.000	MT	8	26	34	Perda de peso e prostração	3,91	0,1200
7	50.000	MT	11	12	23	Perda de peso e prostração	30,70	0,2794
8	50.000	MT	10	21	31	Perda de peso e prostração	23,23	0,3658
9	50.000	MT	13	11	24	Perda de peso e prostração	33,25	0,3958
10	50.000	MT	9	11	20	Óbito	-	0,2720
11	50.000	BCG	8	24	32	Óbito	27,63	0,3881
12	50.000	BCG	10	15	25	Perda de peso e prostração	14,88	0,2592
13	50.000	BCG	14	8	22	Perda de peso e prostração	5,50	0,1739
14	50.000	BCG	13	11	24	Perda de peso e prostração	18,92	0,2423
15	50.000	BCG	9	17	26	Perda de peso e prostração	29,69	0,3683
16	50.000	BCG+MT	8	26	34	Perda de peso e prostração	16,91	0,2124
17	50.000	BCG+MT	11	17	28	Perda de peso e prostração	50,14	0,3909
18	50.000	BCG+MT	10	14	24	Perda de peso e prostração	27,17	0,2850
19	50.000	BCG+MT	9	11	20	Óbito	9,60	0,3420
20	50.000	BCG+MT	9	11	20	Perda de peso e prostração	10,50	-



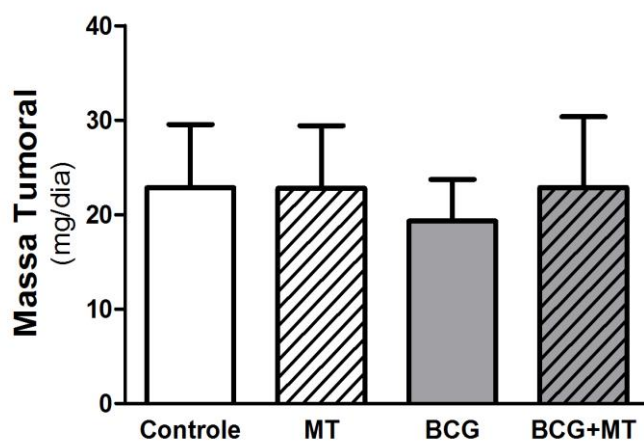
**Figura 14.** Tempo da inoculação até o diagnóstico do tumor vesical e tempo até o *endpoint* dos animais.



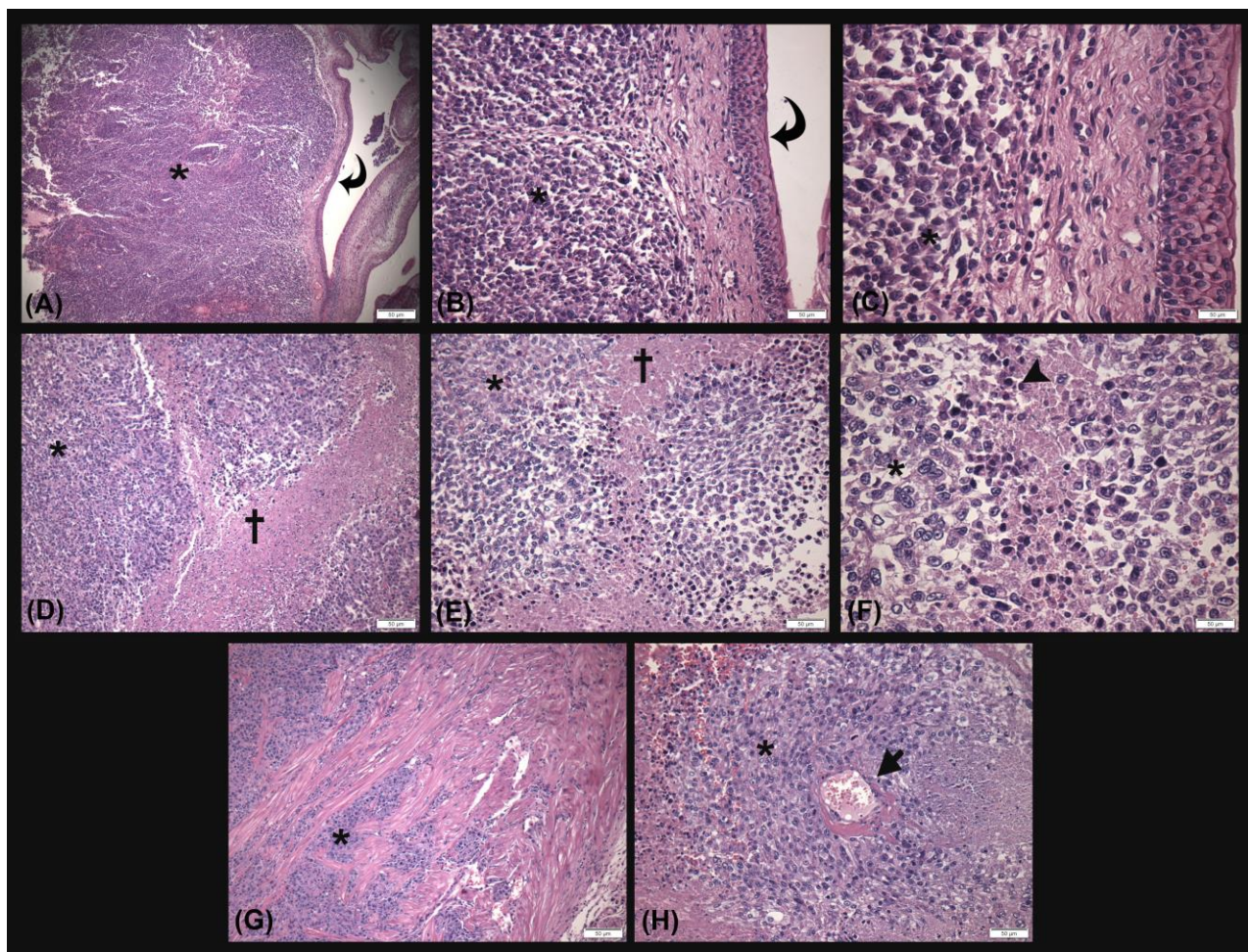
**Figura 15.** Sobrevida dos animais representada em gráfico Kaplan Meier.



**Figura 16.** Volume dos tumores colhidos no dia do *endpoint*. O volume foi aferido com paquímetro, sendo dividido pelo tempo (dias) até o *endpoint*. Cinco animais por grupo.



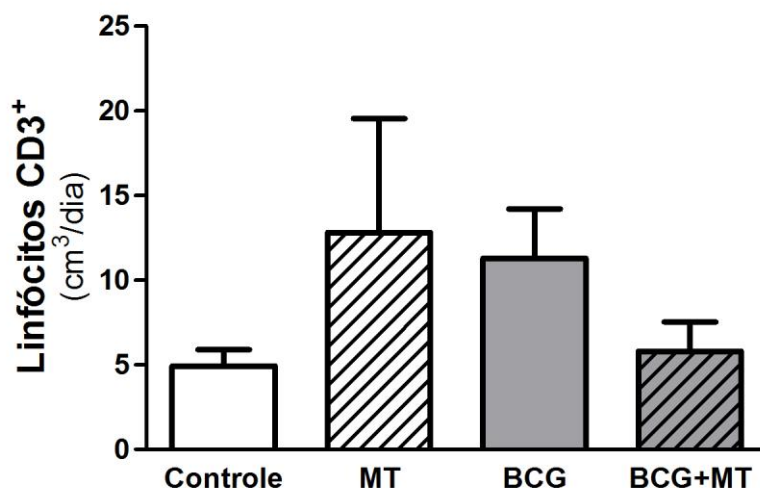
**Figura 17.** Massa dos tumores colhidos no dia do *endpoint*. A massa foi aferida em balança analítica, sendo dividida pelo tempo (dias) até o *endpoint*. Cinco animais por grupo.



**Figura 18.** Tumor formado por células MB49 (asterisco) com urotélio preservado (seta curva). Há presença de áreas com necrose (cruz) e células inflamatórias (cabeça de seta). As células MB49 infiltraram a musculatura lisa vesical (G) e induziram a formação de vasos tumorais (seta, H). Magnificação de 40X (A, D e G), 200X (B, E e H) e 400X (C, F).



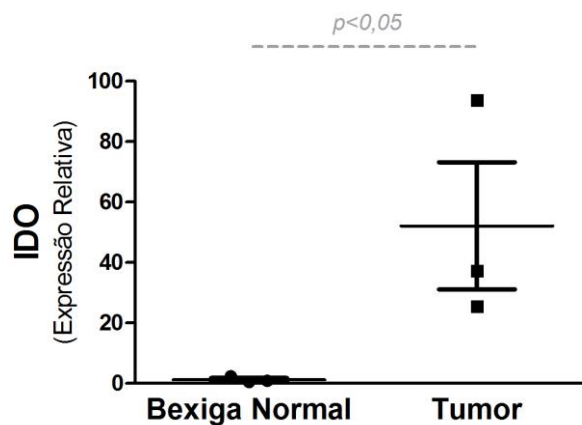
Até o momento, conseguimos realizar imunohistoquímica para linfócitos T (CD3), porém ainda não identificamos diferença estatística (n total de 15) (Figura 19).



**Figura 19.** Número de linfócitos T CD<sup>+</sup> por campo (aumento de 400X). Para esta análise, foram analisados 50 campos de cada caso.

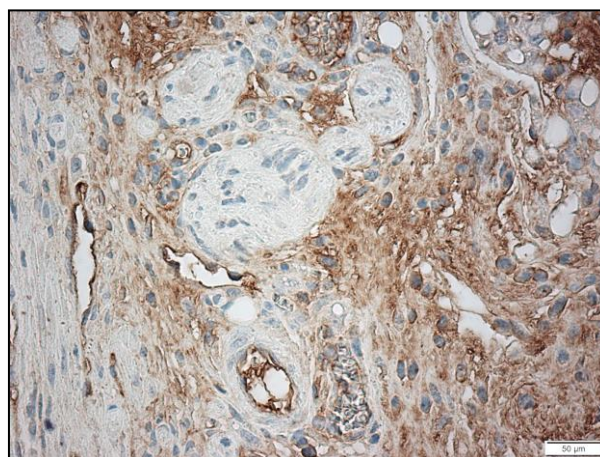
#### 4.2.2 Análise da expressão da IDO em tumor de bexiga

Para responder se tumor de bexiga expressa IDO, assim como havíamos observado em células MB49 no estudo *in vitro* (e em células T24, dados não apresentados nessa dissertação), comparamos a expressão de IDO em tumor de bexiga vs. tecido vesical normal. Foi possível constatar que bexiga normal expressa IDO e o tumor tem uma expressão significativamente maior (Expressão relativa de  $1,24 \pm 0,56$  na bexiga normal vs.  $52,14 \pm 21,06$  no tumor;  $p < 0,05$ ) (Figura 20).



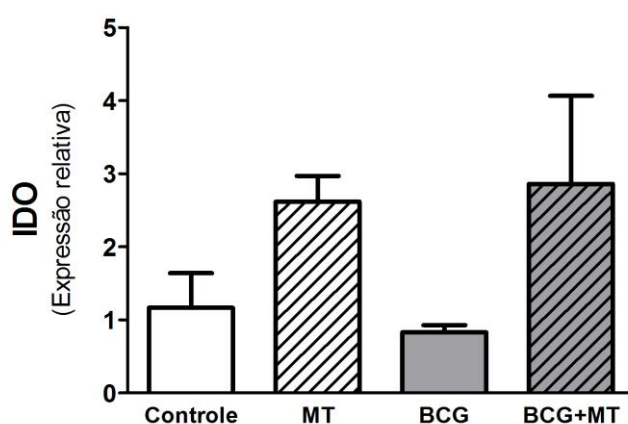
**Figura 20.** Expressão de IDO em bexiga normal e em tumor de bexiga induzido com inoculação de células MB49.

Ao realizarmos imunohistoquímica para IDO, observamos marcação para IDO em células MB49, porém a marcação não é homogênea. Novos experimentos estão sendo realizados com outros anticorpos anti-IDO para a confirmação do perfil de marcação intratumoral (Figura 21).



**Figura 21.** Imunohistoquímica para IDO em tumor formado por células MB49. A marcação aparece com coloração acastanhada. Magnificação de 200X.

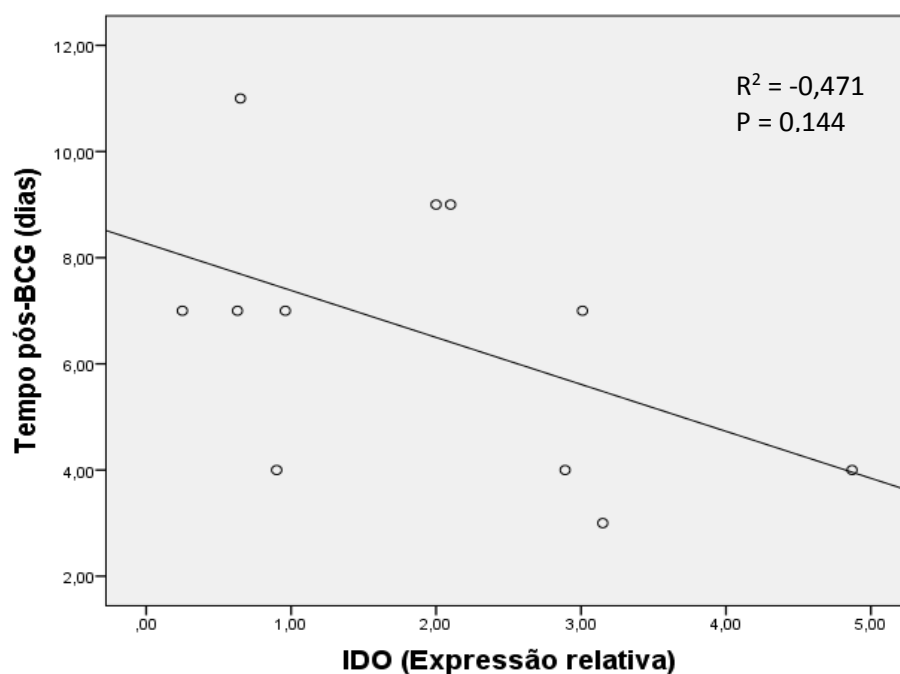
Quando analisamos a expressão de IDO nas amostras dos animais inoculados com 50.000 células, não observamos diferença estatística entre os grupos (Expressão relativa de  $1,17 \pm 0,47$  no Controle,  $2,62 \pm 0,35$  no MT,  $0,83 \pm 0,10$  no BCG e  $2,86 \pm 1,20$  no BCG+MT).



**Figura 22.** Expressão de IDO em tumor de bexiga entre os diferentes grupos.

Como os animais atingiram o *endpoint* em dias variados do protocolo de acompanhamento, pensamos na possibilidade do tempo entre a última exposição ao BCG (convencionalmente administrado semanalmente) e o *endpoint* ter influência sobre a expressão de IDO. Embora a análise de correlação (Spearman) não tenha demonstrado diferença estatística, o coeficiente de correlação entre o tempo entre a

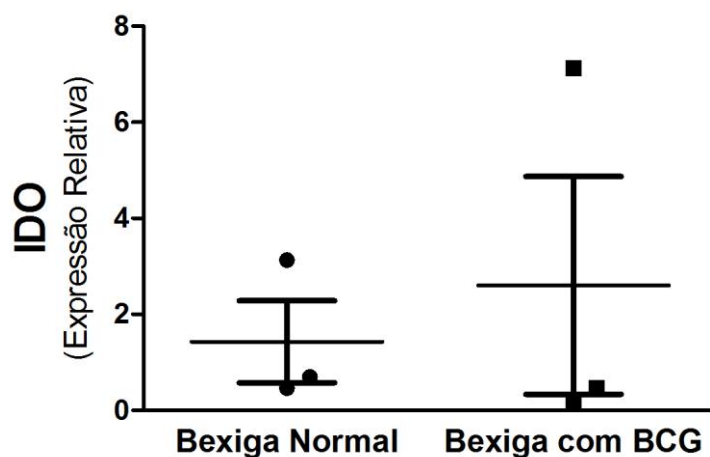
última exposição ao BCG e o *endpoint* foi negativo (-0,471), conforme ilustrado na Figura 23.



**Figura 23.** Correlação (Spearman) entre o tempo entre a última exposição ao BCG e o *endpoint* dos animais tratados com BCG (animais do grupo BCG e BCG+MT).

#### 4.2.3 Análise da expressão da IDO em bexiga normal exposta ao BCG

Realizamos mais um experimento para responder se a exposição da bexiga normal ao BCG levaria a uma maior expressão de IDO em 24 horas pós-exposição. Conforme demonstrado na Figura 24, não houve diferença significativa.



**Figura 24.** Análise da expressão de IDO em bexiga normal (n=3) e bexiga normal exposta ao BCG (n=3) após 24 horas da exposição.

## 5. DISCUSSÃO

Quando o câncer urotelial de bexiga é diagnosticado em estágio não invasivo, tem como terapia inicial a ressecção transuretral, porém até 45% dos casos ressecados recorrem em até um ano (Williams et al.; 2010). Para casos em que a ressecção foi realizada, a IBCG é amplamente utilizada. Instilada no lúmen vesical, a imunoterapia atua com efeito imunomodulador na diminuição da recorrência do tumor pós ressecção. Mesmo considerada padrão ouro, a IBCG parece ter falhas, já que recorrem para as formas de câncer invasivas. Assim, embora a instilação com IBCG seja uma importante terapia coadjuvante, é possível que a presença do bacilo não seja suficiente para destruir as células tumorais remanescentes ou desencadeie mecanismos pró-tumorais. Neste contexto, idealizamos este estudo na tentativa de demonstrar uma relação entre IBCG e a enzima IDO, uma enzima que tem sido associada com escape tumoral frente ao sistema imune.

A IDO já foi descrita em diversos tipos de tumores (Platten et al.; 2012), porém há pouco estudo em tumor de bexiga. Em estudo publicado no ano passado, Yang e colaboradores mostraram a correlação positiva entre a IDO e a progressão tumoral no carcinoma urotelial de bexiga, sugerindo esta como um possível indicador prognóstico ou até mesmo alvo terapêutico (Yang et al.; 2015).

Ainda não se sabe quais os mecanismos, bem como as células responsáveis pelo aumento da expressão da IDO no câncer de bexiga. Sabendo-se que o INF- $\gamma$  é um potente indutor da IDO, propõe-se uma possível relação entre a IDO e a IBCG. Mesmo sem citações na literatura que correlacionem a IDO com a IBCG pós RTTV, existem fortes evidências desta relação no quadro de depressão. Moreal e colaboradores mostraram em um estudo publicado em 2014 que camundongos inoculados com BCG no peritônio desenvolviam alterações comportamentais

justificadas pelo aumento do INF- $\gamma$ , com consequente aumento da IDO cerebral e depleção do trp, um aminoácido essencial para o anabolismo da serotonina (Moreal et al.; 2014). Da mesma forma, o mecanismo proposto no nosso estudo é que a IBCG aumente a síntese local de INF- $\gamma$ , que por sua vez induz o aumento da expressão da IDO e esta por sua vez esteja envolvida em mecanismos já citados na literatura de proteção e consequente progressão do tumor de bexiga tratado com BCG.

Nesse estudo, foram utilizados modelo *in vitro* e *in vivo*. Modelos em cultura celular podem nos fornecer informações pontuais sobre as respostas frente ao tratamento com BCG, já os modelos animais nos fornecem informações frente a um sistema complexo de forma fisiopatológica, trazendo resultados muito próximos à clínica humana.

O primeiro passo foi estabelecer a curva de crescimento da linhagem MB49 em nosso laboratório. Através deste, determinamos que o melhor período para utilização das células seria entre 72 e 96 horas do subcultivo, pois a partir de 120 horas as células entram na fase de declínio, podendo desta forma prejudicar os resultados.

O efeito da BCG sobre a viabilidade das células MB49 foi determinado através da incubação de células MB49 com diferentes concentrações de UFC de BCG. A diminuição da viabilidade vista em ambos os períodos de incubação (24 e 48 horas) nos grupos com 100:1, 10:1 e 1:1 UFC de BCG, corrobora os dados da literatura, porém não apresentou diferença significativa entre os grupos citados. Por apresentarem resultados entre grupos parecidos, elegemos a concentração de 1:1 para os próximos experimentos. Já a incubação com 0,01:1 UFC de BCG por célula

MB49 aumentou o número de células MB49 após 24 horas, fazendo necessário novos experimentos para melhor compreensão dos mecanismos que levaram ao aumento da viabilidade das células neoplásica em cultura, podendo este auxiliar em melhoria no tratamento com IBCG.

A análise qualitativa da expressão de IDO em células MB49 por imunocitoquímica mostrou positividade de forma constitutiva na grande maioria das células, porém com algumas subpopulações que não expressam a enzima. O mesmo fenômeno foi encontrado com células T24 de carcinoma de bexiga (dados do nosso laboratório ainda não publicados). Infelizmente, até o momento, não há na literatura estudo que tivesse explorado essa diferença de expressão de IDO em subpopulações de uma linhagem tumoral específica.

A análise de internalização do BCG nas células MB49 foi realizada pela sobreposição das imagens das células MB49, em que somente o bacilo BCG foi marcado com fluoróforo na cor vermelha. Quando sobrepostas, as imagens mostraram que os bacilos foram internalizados, garantindo assim o mecanismo imunológico proposto pela IBCG. Este estudo foi importante apenas para demonstrar que nossas células MB49 eram hábeis na interação com os bacilos a ponto de internalizá-los. Estudo realizado por Becich e colaboradores mostrou através de imunocitoquímica e microscopia eletrônica a internalização do BCG em células T24 (carcinoma de bexiga humano) e MBT-2 (carcinoma de bexiga de camundongo) (Becich et al.; 1991). Utilizando-se de esferas multicelulares, simulando pequenos tumores malignos e benignos, Durek e colaboradores mostraram que somente as esferas de células tumorais malignas foram capazes de internalizar o BCG (Durek et al.; 1999). Descrevendo este evento como macropinocitose, Redelman-Sidi e colaboradores mostraram que a internalização do



BCG é um evento variável entre as células tumorais, sendo dependentes da ativação de vias paralelas às vias oncogênicas, podendo estas estarem ligadas a pacientes resistentes a IBCG (Redelman-Sidi et al.; 2013). Huang e colaboradores demonstraram que a diminuição da enzima PTEN esta relacionada tanto com a progressão tumoral, quanto com a diminuição da internalização do BCG por células de câncer de bexiga, sendo esta ultima necessária para o sucesso na IBCG (Huang et al.; 2012).

A análise qualitativa da expressão de IDO em células MB49 incubadas com BCG foi realizada utilizando apenas o grupo 1:1 UFC de BCG como descrito anteriormente, já que não apresentaram diferenças relativas entre os grupos. Para avaliar a expressão da IDO em células MB49 incubadas com BCG, as células foram marcadas por imunofluorescência na cor verde, já os bacilos BCG na cor vermelha como descrito anteriormente. Quando as imagens dos mesmos campos mostrando os bacilos e as células foram sobrepostas, mostraram áreas em comum para ambas as marcações, sugerindo que a expressão da IDO poderia estar associada à célula MB49 ou ao bacilo BCG. Quanto à análise quantitativa, utilizamos PCR em tempo real, em que foi possível evidenciar o aumento relativo da expressão da IDO no grupo incubado com BCG. Este resultado aconteceu possivelmente através do mecanismo proposto de indução por INF- $\gamma$ . Experimentos futuros para a quantificação de INF- $\gamma$ , assim como a estimulação com INF- $\gamma$  serão realizados para confirmação deste mecanismo.

Para avaliar o efeito da inibição da IDO em cultura celular, utilizamos a técnica de MTT. Os resultados mostraram que quando comparados com o controle, os grupos MT e BCG tiveram redução significativa na viabilidade celular. No grupo BCG+MT, houve diminuição quando comparado ao controle, mas não foi mais

intenso do que as monoterapias. Infelizmente, não há na literatura estudos que demonstrem tal efeito do MT para compararmos com nossos resultados.

Para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na expressão da IDO *in vitro* simulamos o efeito imunológico sistêmico esperado através de cocultura de MB49 com células mononucleares. Como descrito nos experimentos anteriores, submetemos agora as células MB49 em cocultura com mononucleares aos efeitos do BCG. A expressão foi avaliada de forma quantitativa através de PCR em tempo real, em que mostrou novamente que células MB49 incubadas com BCG tem a expressão da IDO aumentada quando comparado ao controle, porém tanto as células mononucleares sozinhas ou em cocultura com células MB49, não tiveram aumento na expressão da IDO quando incubadas com BCG. Como este mecanismo para avaliação da expressão da enzima IDO em cocultura de células MB49 com células mononucleares ainda não havia sido evidenciado, talvez o período de 24 horas de incubação não tenha sido o suficiente para a ativação das células mononucleares, fazendo-se necessário novos experimentos com períodos maiores de incubação, além da utilização de substâncias como phorbol ionomicina na ativação das células mononucleares. Higuchi e colaboradores em experimento para inibição do crescimento de células t24 cultivaram estas em cocultura com células mononucleares por um período de 72 hora (Higuchi et al.; 2009).

São descritos diversos modelos experimentais, porém para nosso estudo foi estabelecido o modelo murino singênico ortotópico com a linhagem celular MB49. Esta linhagem possui características bem conhecidas e citadas na literatura, mostrando serem bem próxima a dos tumores humanos (Ratliff., 2000).

Baseado na literatura iniciamos a fase experimental “*in vivo*” com a indução do tumor de bexiga nos animais com  $2,5 \times 10^4$  células MB49 (Andrade et al.; 2010). Dos 7 animais inoculados, apenas 1 falhou à indução tumoral, compreendendo cerca de 86% de sucesso neste procedimento. Todos os animais com diagnóstico positivos, tiveram este comprovado até o sétimo dia pós-indução tumoral. Entretanto, nesta primeira fase, mesmo havendo embasamento na literatura quanto ao número de células utilizadas, nenhum dos animais completou o protocolo de 35 dias, sendo que 1 dos animais veio a óbito. Um novo grupo de 6 animais foi inoculado com  $1 \times 10^5$  células por animal. Com 83% de sucesso no procedimento, 5 dos animais apresentaram tumor positivo, . Destes, apenas um dos animais teve o diagnosticado somente no 21º dia pós indução tumoral, sendo o único deste grupo a chegar ao fim do protocolo. O restante dos animais apresentaram prostração e perda de peso com consequente eutanásia, sendo que 2 destes vieram a óbito antes mesmo da identificação destes sinais de sofrimento.

Por conta do número baixo de animais e pelo fato dos animais não terem completado o tempo proposto do protocolo, não tivemos como observar os efeitos relacionados aos tratamentos nesta fase do estudo. Assim, mais uma vez adaptamos o protocolo, diminuindo o número de células a serem inoculadas, ou seja, realizamos a inoculação com  $5 \times 10^4$  células. Dos 23 animais inoculados, apenas 3 não tiveram tumor confirmado e, portanto, não entraram no protocolo. O diagnóstico destes ocorreu em média no 10º dia pós-inoculação transuretral. A taxa percentual de implantação neste último grupo foi de 87%, mostrando que mesmo diminuindo o numero de células inoculadas por animal, este se manteve com boa taxa de implantação tumoral. Dos 20 animais que entraram no protocolo, 4 vieram à óbito. Nenhum dos animais completou o protocolo. Não houve diferença estatística

entre os grupos com relação ao tempo até o diagnóstico, tempo com tumor e tempo até a eutanásia. Da mesma forma, não observamos diferença na massa e volume dos tumores. Estes resultados podem ser justificados talvez pela agressividade do tumor, que levou boa parte dos indivíduos a serem eutanasiados antes do fim do protocolo, criando assim grande variabilidade dos dados inter e entre grupos. Confrontando nossos resultados com a literatura, Gunther e colaboradores foram pioneiros com o uso deste modelo ortotópico e eles demonstraram a eficácia BCG em aumentar a sobrevida dos animais quando inoculados com  $1 \times 10^5$  células MB49 (Gunther et al., 1999). A sobrevida do grupo controle foi semelhante ao que encontramos no nosso estudo, porém nosso grupo que recebeu BCG como controle positivo de sucesso de tratamento não foi semelhante ao grupo destes pesquisadores. Neste mesmo estudo de Gunther e colaboradores, há a demonstração de que a sobrevida dos animais é maior com a inoculação de  $1 \times 10^4$  células quando comparada à inoculação com 50.000 (Gunther et al., 1999), sugerindo que façamos mais uma adaptação no nosso protocolo para tentarmos detectar um possível efeito do MT sobre esta condição. Como Gunther e colaboradores demonstraram que a BCG aumentava significativamente a sobrevida dos animais inoculados com  $1 \times 10^5$  células, ficamos seguros em avaliar com a inoculação de  $5 \times 10^4$ . Faremos novas adaptações para os próximos experimentos.

O tecido tumoral destes animais foi avaliado por microscopia, onde foi possível observar a formação da massa tumoral de células MB49, a qual infiltra em tecido muscular liso da bexiga. Também é possível observar grandes áreas de necrose acompanhada de infiltrado inflamatório, que neste ultimo torna-se essencial para resposta imune promovida pela IIBCG.

Até o momento, conseguimos realizar imunohistoquímica para linfócitos T (CD3), porém ainda não identificamos diferença estatística. No entanto, novos casos estão sendo realizados para evidênciação desta população celular.

Para responder se tumor de bexiga expressa IDO, assim como havíamos observado em células MB49 no estudo *in vitro* (e em células T24, dados não apresentados nessa dissertação), comparamos através de PCR em tempo real a expressão de IDO em tumor de bexiga (casos  $2,5 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$ ) vs. tecido vesical normal. Foi possível constatar que bexiga normal expressa IDO e o tumor tem uma expressão significativamente maior, dados que reforçam a hipótese de que a IBCG modula de forma indireta o aumento da expressão da IDO na bexiga ressecada. Porém, novas análises para INF- $\gamma$  serão realizadas para mostrar relação entre a IBCG e o aumento da expressão da IDO correlacionando-a com a progressão tumoral e consequentemente um pior prognóstico deste paciente.

Ao realizarmos imunohistoquímica para IDO no tecido tumoral, observamos marcação para IDO em células MB49, porém a marcação não é homogênea, fazendo necessário novos experimentos para confirmação da proteína no tecido, já que a mesma fora confirmada por meio da expressão do RNAm na PCR em tempo real.

No entanto, quando analisamos a expressão de IDO nas amostras dos animais inoculados com  $5 \times 10^4$  células, não observamos diferença estatística entre os grupos. Supomos que possa existir relação entre o tempo da última exposição ao BCG (convencionalmente administrado semanalmente) e a data que foi feita a eutanásia ter influência sobre a expressão de IDO, embora o coeficiente de relação (Spearman) tenha dado negativo entre estes.

Para melhor entender os mecanismos envolvidos na superexpressão da IDO, realizamos mais um experimento para responder se a exposição da bexiga normal ao BCG levaria a uma maior expressão de IDO. Os resultados desse experimento corroboram os dados da literatura (Durek et al.; 1999), mostrando que tanto a bexiga normal exposta ao BCG, quanto a bexiga normal exposta apenas ao veículo utilizado para reconstituição da BCG, não tiveram alterações relativas significativas na expressão da IDO.

Portanto, concluímos que a linhagem MB49 expressa de forma constitutiva a IDO, assim como a exposição desta ao BCG, induz a superexpressão desta enzima. Quanto à inibição química da IDO através do MT sobre cultura de células MB49, mostrou diminuição da viabilidade celular quando tratamento isolado, mas quando associado ao BCG não mostrou diferença relativa aos tratamentos isolados. No modelo “*in vivo*”, o tratamento com BCG foi capaz de aumentar a expressão da IDO em tumor de bexiga, mas não em tecido vesical normal, mesmo com lesão urotelial. Já o efeito do tratamento sistêmico com MT sobre o crescimento tumor, além do efeito sobre o infiltrado linfocítico tumoral, mostraram-se inconclusivos, fazendo necessário novos testes.

## 6. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos no presente estudo, concluímos que:

- Células MB49 expressam IDO em cultura e a interação com BCG aumenta essa expressão;
- A inibição da IDO com MT diminui a viabilidade das células MB49 em cultura, semelhantemente ao BCG;
- Tumor de bexiga ortotópico de células MB49 tem uma expressão de IDO significativamente maior quando comparado a tecido vesical normal;
- Embora os tratamentos com BCG e MT não tenham influenciado a evolução dos animais portadores de tumor de células MB49, não podemos descartar a possibilidade destes tratamentos exercerem efeitos sobre os tumores, pois no estudo o modelo foi muito agressivo, impedindo um acompanhamento mais longo.

## 7. REFERÊNCIAS

American Cancer Society. Bladder Cancer Detailed Guide. 2015.

Andrade PM, Chade DC, Borra RC, Nascimento IP, Villanova FE, Leite LC, Andrade E, Srougi M. The therapeutic potential of recombinant BCG expressing the antigen S1PT in the intravesical treatment of bladder cancer. *Urol Oncol*. 2010.

Askeland EJ, Newton MR, O'Donnell MA, Luo Y. Bladder Cancer Immunotherapy: BCG and Beyond. *Adv Urol*. 2012;2012:181987. doi: 10.1155/2012/181987. Epub 2012 Jun 20.

Bauer TM, Jiga LP, Chuang JJ, Randazzo M, Opelz G, Terness P. Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo. *Transpl Int*. 2005;18:95-100.

Bodaghi B, Goureau O, Zipeto D, Laurent L, Virelizier JL, Michelson S. Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *J Immunol*. 1999;162:957-64.

Bohle A, Jocham D, Bock PR. Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol* 2003;169:90–5.

Byrne GI, Lehmann LK, Landry GJ. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infect Immun*. 1986;53:347-51.

Chade DC, Andrade PM, Borra RC, Leite KR, Andrade E, Villanova FE, Srougi M. Histopathological characterization of a syngeneic orthotopic murine bladder cancer model. *Int Braz J Urol*. 2008 Mar-Apr;34(2):220-6; discussion 226-9.

CCAC Guidelines. The CCAC guidelines on: choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing were developed by the ad hoc subcommittee on endpoints of the CCAC Guidelines Committee, 1998.

Chan ES, Patel AR, Hansel DE, Larchian WA, Heston WD. Sunitinib malate provides activity against murine bladder tumor growth and invasion in a preclinical orthotopic model. *Urology*. 2012 Sep;80(3):736.e1-5. doi: 10.1016/j.urology.2012.04.038. Epub 2012 Jun 5. PubMed PMID: 22676953.

Chan ES, Patel AR, Smith AK, Klein JB, Thomas AA, Heston WD, Larchian WA. Optimizing orthotopic bladder tumor implantation in a syngeneic mouse model. *J Urol*. 2009 Dec;182(6):2926-31. doi: 10.1016/j.juro.2009.08.020. Epub 2009 Oct 20. PubMed PMID: 19846165.



Chen F, Zhang G, Cao Y, Hessner MJ, See WA. MB49 murine urothelial carcinoma: molecular and phenotypic comparison to human cell lines as a model of the direct tumor response to bacillus Calmette-Guerin. *J Urol*. 2009 Dec;182(6):2932-7.

deKernion JB, Golub SH, Gupta RK, Silverstein M, Morton DL. Successful transurethral intralesional BCG therapy of a bladder melanoma. *Cancer*. 1975 Nov;36(5):1662-7.

Dobek GL, Godbey WT. An orthotopic model of murine bladder cancer. *J Vis Exp*. 2011 Feb 6;(48). pii: 2535. doi: 10.3791/2535. PubMed PMID: 21339722; PubMed Central PMCID: PMC3197410.

Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 9:1069-77, 2002.

Fernandez-Gomez J, Solsona E, Unda M, et al. Prognostic factors in patients with non-muscle-invasive bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guerin: multivariate analysis of data from four randomized CUETO. *Eur Urol*. 2008 May;53(5):992-1001. Epub 2007 Oct 15.

Fleischmann JD, Toossi Z, Ellner JJ, Wentworth DB, Ratliff TL, Imbembo AL. Urinary interleukins in patients receiving intravesical Bacillus Calmette-Guerin therapy for superficial bladder cancer. *Cancer* 1989;64:1447–54.

Gonzalo V, Castellví-Bel S, Balaguer F, Pellisé M, Ocaña T, Castells A. [Epigenetics of cancer]. *Gastroenterol Hepatol*. 2008 Jan; 31(1):37- 45.

Grønbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS*. 2007 Oct; 115(10):1039-59.

Günther JH, Jurczok A, Wulf T, Brandau S, Deinert I, Jocham D, Böhle A. Optimizing syngeneic orthotopic murine bladder cancer (MB49). *Cancer Res*. 1999 Jun 15;59(12):2834-7.

Hoption Cann SA, van Netten JP, van Netten C. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgrad Med J*. 2003 Dec;79(938):672-80.

Hu B, Hissong BD, Carlin JM. Interleukin-1 enhances indoleamine 2,3-dioxygenase activity by increasing specific mRNA expression in human mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res*. 1995;15:617-24.

INCA, 2016. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

International Agency for Research on Cancer / World Health Organization. World Cancer Report - 2014.

Jäger W, Moskalev I, Janssen C, Hayashi T, Awrey S, Gust KM, So AI, Zhang K, Fazli L, Li E, Thüroff JW, Lange D, Black PC. Ultrasound-guided intramural inoculation of orthotopic bladder cancer xenografts: a novel high-precision approach.

PLoS One. 2013;8(3):e59536. doi: 10.1371/journal.pone.0059536. Epub 2013 Mar 26.

Jäger W, Moskalev I, Janssen C, Hayashi T, Gust KM, Awrey S, Black PC. Minimally invasive establishment of murine orthotopic bladder xenografts. *J Vis Exp*. 2014 Feb 11;(84):e51123.

Kasman L, Voelkel-Johnson C. An orthotopic bladder cancer model for gene delivery studies. *J Vis Exp*. 2013 Dec 1;(82):50181.

Kobayashi T, Owczarek TB, McKiernan JM, Abate-Shen C. Modelling bladder cancer in mice: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer*. 2015 Jan;15(1):42-54. doi: 10.1038/nrc3858. Review. PubMed PMID: 25533675.

Lamm DL. Optimal BCG treatment of superficial bladder cancer as defined by American trials. *Eur Urol*. 1992;21(2):12-16, 1992.

Luca S; Mihaescu T. History of BCG Vaccine. *Maedica (Buchar)*. 2013 Mar; 8(1): 53–58.

Malmstrom PU, Sylvester RJ, Crawford DE, et al. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guerin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2009;56:247–56.

Cumberbatch MG, Rota M, Catto JW, La Vecchia C. Catto a, Carlo La Vecchia c. The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *Eur Urol*. 2016 Sep;70(3):458-66.

Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol*. 1976 Aug;116(2):180-3.

Moreau M, Lestage J, Verrier D, Mormede C, Kelley KW, Dantzer R, Castanon N. Bacille Calmette-Guérin inoculation induces chronic activation of peripheral and brain indoleamine 2,3-dioxygenase in mice. *J Infect Dis*. 2005 Aug 1;192(3):537-44. Epub 2005 Jul 1. PubMed PMID: 15995970.

Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of Allogeneic Fetal Rejection by Tryptophan Catabolism. *Science* 21:1191-3, 1998.

Nagineni CN, Pardhasaradhi K, Martins MC, Detrick B, Hooks JJ. Mechanisms of interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in human retinal pigment epithelial cells. *Infect Immun*. 1996;64:4188-96.

Newton MR, Askeland EJ, Andresen ED, Chehval VA, Wang X, Askeland RW, O'Donnell MA, Luo Y. Anti-interleukin-10R1 monoclonal antibody in combination with bacillus Calmette-Guérin is protective against bladder cancer metastasis in a murine orthotopic tumour model and demonstrates systemic specific anti-tumour immunity. *Clin Exp Immunol*. 2014 Jul;177(1):261-8. doi: 10.1111/cei.12315.

Patel AR, Chan ES, Hansel DE, Powell CT, Heston WD, Larchian WA. Transabdominal micro-ultrasound imaging of bladder cancer in a mouse model: a validation study. *Urology*. 2010 Apr;75(4):799-804.

Patel SG, Cohen A, Weiner AB, Steinberg GD. Intravesical therapy for bladder cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2015 Apr;16(6):889-901.

Pfefferkorn ER. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81:908-12.

Platten M, Wick W, Van den Eynde BJ. Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion. *Platten Cancer Res*. 2012 Nov 1;72(21):5435-40.

Ratliff TL. Role of animal models in understanding intravesical therapy with bacille Calmette-Guérin. *Clin Infect Dis*. 2000 Sep;31 Suppl 3:S106-8.

Siegel, RL; MPH, Miller, KD; Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016 Jan-Feb;66(1):7-30. doi: 10.3322/caac.21332. Epub 2016 Jan 7.

Riemensberger, J.; Bohle, A. & Brandau, S. (2002). IFN-gamma and IL-12 but not IL-10 are required for local tumour surveillance in a syngeneic model of orthotopic bladder cancer. *Clin Exp Immunol*, 127,1, (Jan, 2002), 20-6, 0009-9104 (Print) 0009-9104.

Rosenthal, MD, PhD; Ray G. Crispen, PhD; Margaret G. Thorne; Nancy Piekarski; Nijole Raisys; Philip G. Rettig, JD; BCG Vaccination and Leukemia Mortality; *JAMA*. 1972; 222(12):1543-1544.

Saint F, Salomon L, Quintela R, et al. Do prognostic parameters of remission versus relapse after *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) immunotherapy exist? Analysis of a quarter century of literature. *Eur Urol* 2003;43:351–60.

Sexton WJ, Wiegand LR, Correa JJ, Politis C, Dickinson SI, Kang LC. Bladder cancer: a review of non-muscle invasive disease. *Cancer Control*. 2010 Oct; 17(4):256-68.

Soloway M. S. Single and combination chemotherapy for primary murine bladder cancer. *Cancer (Phila.)*, 36: 333-340, 1975.

Summerhayes IC, Franks LM. Effects of donor age on neoplastic transformation of adult mouse bladder epithelium in vitro. *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)*, 62: 1017-1023, 1979.

Sylvester RJ, van der Meijden AP, Oosterlinck W, et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials. *Eur Urol* 2006;49:466–5.

Tanner R, Kakalacheva K, Miller E, Pathan AA, Chalk R, Sander CR, Scriba T, Tameris M, Hawkridge T, Mahomed H, Hussey G, Hanekom W, Checkley A, McShane H, Fletcher HA. Serum indoleamine 2,3-dioxygenase activity is associated with reduced immunogenicity following vaccination with MVA85A. *BMC Infect Dis*. 2014 Dec 3;14(1):660. [Epub ahead of print].

Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 196:447-57, 2002.

Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*. 2003 Oct;9(10):1269-74.

Vijaya Kumar K, Rudra A, Sreedhara MV, Siva Subramani T, Prasad DS, Das ML, Murugesan S, Yadav R, Trivedi RK, Louis JV, Li YW, Bristow LJ, Naidu PS, Vikramadithyan RK. *Bacillus Calmette-Guérin* vaccine induces a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI)-resistant depression like phenotype in mice. *Brain Behav Immun*. 2014 Nov;42:204-11.

Watanabe E, Matsuyama H, Matsuda K, Ohmi C, Tei Y, Yoshihiro S, Ohmoto Y, Naito K. Urinary interleukin-2 may predict clinical outcome of intravesical bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for carcinoma in situ of the bladder. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:481–6.

Williams PD, Murphy GP. Experimental bladder tumor induction, propagation, and therapy. *Urology*. 1976 Jul;8(1):39-42.

Yoshida R, Nukiwa T, Watanabe Y, Fujiwara M, Hirata F, Hayaishi O. Regulation of indoleamine 2,3- dioxygenase activity in the small intestine and the epididymis of mice. *Arch Biochem Biophys*.1980;203:343-51.

Zlotta AR, Fleshner NE, Jewett MA. The management of BCG failure in non-muscle-invasive bladder cancer: an update. *Can Urol Assoc J*. 2009 Dec;3(6 Suppl 4):S199-205.

Stewart, B. W.; Wild, C. P. (Ed.). *World Cancer Report: 2014*. Lyon: IARC, 2014.

Williams SK, Hoenig DM, Ghavamian R, Soloway M. Intravesical therapy for bladder cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2010 Apr;11(6):947-58. doi: 10.1517/14656561003657145.