

CONSTRUÇÃO DE CEPA RECOMBINANTE DE *Mycobacterium bovis* BCG PARA TRATAMENTO DE CÂNCER DE BEXIGA

CAMILA B. BENDER^{1,3}; KARINE R. BEGNINI^{2,3}; LIZIANE P. DA SILVA^{2,3}; JULIETI H. BUSS^{1,3}; TIAGO V. COLLARES^{2,3}; FABIANA K. SEIXAS^{2,3}

¹Universidade Federal de Pelotas, GBiotecnologia – camilabbender@gmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – karibegini@gmail.com, lizianepsilva@gmail.com, julietibuss@hotmail.com, collares.t@gmail.com

³Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular – Laboratório de Biotecnologia do Câncer seixas.fk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A utilização de *Mycobacterium bovis* BCG no tratamento de carcinomas de bexiga representa o maior sucesso no uso de imunoterapias para tratamento de câncer. O câncer de bexiga é o segundo tipo de câncer maligno que mais acomete o trato urinário (SIEGEL, 2015). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer, são estimados 9.670 novos casos de câncer de bexiga para o ano de 2016 (INCA, 2016).

O câncer de bexiga está relacionado com a inibição do gene supressor de tumor p53, deleções no cromossomo 9 e ativação de alguns oncogenes como c-erb-B2, HER-2/neu e H-ras (JUNG, 2000). A forma mais comum como este câncer se apresenta é o carcinoma superficial de bexiga caracterizado por possuir altas taxas de recorrência e predisposição para progredir para tumor músculo invasivo (SYLVESTER et al, 2005). Os tratamentos mais comuns consistem em intervenção cirúrgica, quimioterapia intravesical ou imunoterapia com *Mycobacterium bovis* BCG. (MISRA, 2010).

As propriedades antitumorais de BCG foram observadas pela primeira vez em 1976 por Morales e colaboradores, sendo hoje considerado tratamento padrão ouro para carcinomas *in situ*. Este tratamento foi aprovado em 1990 pela FDA (AMIRKHAH et al, 2009) e baseia-se na geração de uma resposta imune ativa contra抗ígenos associados a tumores (TAAs), promovendo a estimulação do sistema imune através do uso de substâncias que geram resposta biológica (ALDRISH et al, 2010; SHENG, 2011). Quando comparado com quimioterapia e radioterapia, a imunoterapia traz como vantagens a especificidade para as células alvo e menor interferência em outras terapias (SHENG, 2011).

Apesar da sua eficácia terapêutica comprovada, o BCG pode apresentar efeitos colaterais, como infecções e surgimento de tumores intolerantes, resistentes ou recorrentes. Com isso, estudos vêm sendo desenvolvidos na busca por melhorias na eficácia do tratamento e diminuição dos efeitos colaterais da terapia. Modificar geneticamente as propriedades do BCG para criar uma resposta imune mais específica, com expressão de moléculas imunogênicas ou com a inclusão de抗ígenos, constitui abordagem promissora para tratamento de câncer de bexiga (BEGNINI et al, 2015).

A proteína p53 é um fator de transcrição que é considerado um dos componentes principais para manutenção da homeostase celular (ALMAZOV, 2007). Mutações nessa proteína são detectadas em aproximadamente 50% dos tumores humanos e em cerca de 40-50% dos carcinomas de bexiga (SAMUILOV, 2003). A reintrodução da proteína p53 selvagem em linhagens celulares tumorais através de vetores provoca uma modificação do fenótipo tumorigênico, sendo essa estratégia uma nova alternativa para tumores de bexiga (STOKLOSA, 2005).

Com isso, o objetivo do presente trabalho foi construir BCG Pasteur recombinante que expresse a proteína p53 humana visando aumentar a eficiência de imunoterapia em câncer superficial de bexiga.

2. METODOLOGIA

2.1 Cepas bacterianas

Cepas de BCG foram cultivadas em meio 7H9 Middlebrook (Difco Laboratories, USA) suplementado com 10% de OADC (Oleic Acid Albumin Dextrose Complex), 0,2% de glicerol e 0,05% de tween 80 ou em meio sólido 7H10 Middlebrook (Difco Laboratories, USA), contendo 10 % de OADC e 0,2% de glicerol. A cepa de *Escherichia coli* DH5 α foi cultivada em meio Luria Bertani (LB) suplementado com 50 μ g/mL de canamicina a 37°C.

2.2 Construção de rBCG/p53

O vetor de expressão pUS1997 (SEIXAS et al, 2007) foi utilizado para a construção do rBCG/p53. Este vetor possui uma origem de replicação em *E. coli* e outra em *M. bovis*, além de um sitio de múltiplas clonagens. Ele também contém um peptídeo sinal para secreção da proteína p53 e um gene de resistência para o antibiótico canamicina.

A sequência do gene *TP53* humano (codificador da proteína p53) foi sintetizada *in vitro* pela empresa Epoch Life Science. O fragmento gênico foi ligado ao vetor pUS1997 através da utilização de enzimas de restrição e ligação, gerando a molécula pUS1997/p53. Esta molécula foi utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α por choque térmico. A presença do inserto de p53 foi verificada com a utilização de endonucleases de restrição. Os clones bacterianos foram selecionados e propagados *in vitro*, e o DNA plasmideal foi extraído com a utilização do Kit GFXMT Micro Plasmid Prep (Amersham Biosciences, UK).

Moléculas de plasmídeos recombinante pUS1997/p53 foram utilizadas para a transformação de BCG Pasteur competentes e os clones recombinantes foram selecionados em meio contendo o antibiótico canamicina. As colônias recombinantes de BCG (rBCG/p53) foram avaliadas quanto a produção de proteína p53 por *Western blot*, utilizando-se anticorpo monoclonal comercial (Sigma[®]) para proteína p53 humana.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A construção da cepa recombinante foi confirmada por PCR e análise com endonucleases de restrição. As cepas passaram primeiramente por uma triagem, onde de 33 amostras testadas foram obtidas 11 colônias possivelmente recombinantes. Após, foi realizada a digestão dos plasmídeos com endonucleases de restrição e foram confirmados os clones recombinantes (Figura 1) que liberaram o inserto no tamanho esperado.

Por fim, a produção de p53 humana recombinante em cepas de BCG foi confirmada através da detecção da mesma em lisados de cultura bacteriana por *Western blotting* (Figura 2).

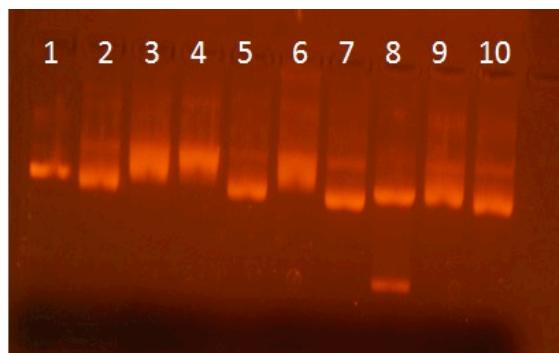


Figura 1: Colônias possíveis recombinantes submetidas à digestão com as endonucleases de restrição *Xba*I e *Hind*III para confirmação da presença do inserto contendo o gene TP53. Coluna 8 apresenta a colônia recombinante onde foi possível observar a liberação do inserto de interesse.

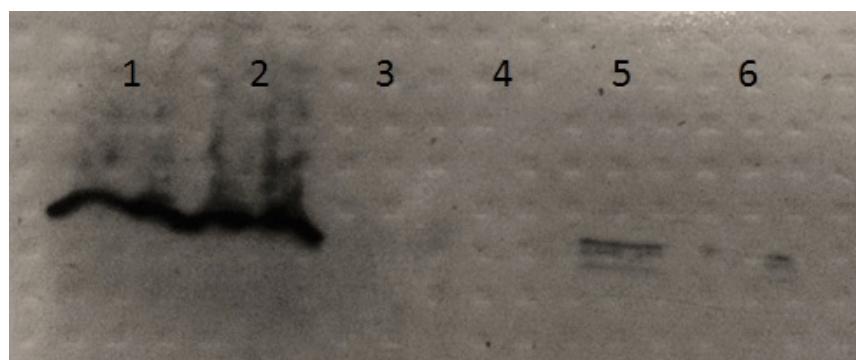


Figura 2: *Western blotting* comprovando a expressão de proteína humana em cepas recombinantes de BCG Pasteur. Colunas 1-2: células humanas de carcinoma de bexiga; colunas 3-4: cepa selvagem de BCG Pasteur; colunas 5-6: cepa rBCG/p53

A utilização do rBCG/p53 pode aliar os efeitos benéficos já conhecidos da BCG na imunoterapia com a terapia gênica pela reintrodução da proteína p53, o que pode acarretar na desestruturação do fenótipo tumorigênico (STOKLOSA, 2005). Além disso, a instilação intravesical do BCG é um alvo ideal para a terapia gênica *in situ*, devido à rapidez e a segurança em sua aplicação (MIYAKE, 2005).

Assim, o desenvolvimento da cepa BCG recombinante rBCG/p53 mostra-se como um potente candidato para a imunoterapia do câncer de bexiga, uma vez que pode ter a capacidade de tornar a terapia mais eficaz. No entanto, mais estudos devem ser realizados para comprovar a sua eficiência.

4. CONCLUSÕES

A cepa de BCG recombinante (rBCG/p53) foi construída com sucesso, sendo possível a detecção da expressão da proteína humana pelas cepas recombinantes. Novos estudos devem ser realizados para comprovar a sua funcionalidade em tratamentos de imunoterapia de câncer de bexiga tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDRICH, J.F.; LOWE, D.B.; SHEARER, M.H.; WINN, R.E.; JUMPER, C.A.; KENNEDY, R.C. Vaccines and immunotherapeutics for the treatment of malignant disease. **Clin.Dev.Immunol.**, New York, 697158, 2010.
- ALMAZOV, V. P.; KOCHETKOV, D. V.; CHUMAKOV, P. M. Use of p53 for Therapy of Human Cancer. **Journal of Molecular Biology (Mosk)**, Moscow, n. 41, v. 6, p. 947-963, 2007
- AMIRKHAH, R.; KHANAHMAD, H.; ABOLHASSANI, M.; POOYA, M.; MOVASSAGH, H.; SHOKRGOZAR, M.A. Improvement of bladder cancer immunotherapy by creating a recombinant Bacille Calmette-Gu'erin which secrets p53 protein. **Med.Hypotheses**, Philadelphia, v. 72, p. 754, 2009.
- BEGNINI, K.R.; BUSS, J.H.; COLLARES, T.; SEIXAS, F.K. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG for immunotherapy in nonmuscle invasive bladder cancer. **Appl Microbiol Biotechnol**.v.99,p.3741-3754,2015.
- INCA – Estimativa 2016, Incidência de Câncer no Brasil. Acessado em 30 de julho de 2016. Disponível em <http://www.inca.gov.br/>
- JUNG, I.; MESSING, E. Molecular mechanisms and pathways in bladder cancer development and progression. **Cancer Control**, Tampa, v. 7, p. 325-334, 2000.
- MISRA, R.; ACHARYA, S.; & SAHOO, S.K. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discovery Today**. V.15, p.842–850. 2010
- SAMUILOV, V.D. Microbial Therapy of Cancer: Induction of Apoptosis, Recombinant Vaccines, and Inhibition of Angiogenesis. **Biochemistry (Moscow)**, Moscow, n. 68, vol. 9, p. 958_962, 2003.
- SEIXAS, F.K; SILVA, E. F.; HARTWIG, D.D.; CERQUEIRA, G.M.; AMARAL,M.; FAGUNDES, M.Q.; DOSSA, R.G.; DELLAGOSTIN, O.A. Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. **VACCINE**, Amsterdam, V.26, P.88-95. 2007.
- SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D; JEMAL,A. Cancer statistics, 2015. **Ca Cancer J. Clin.**, Hodobeken, v. 63, p. 11–30, 2015.
- SIMONS, M.P.; NAUSEEF, W.M.; GRIFFITH, T.S. Neutrophils and TRAIL: insights into BCG immunotherapy for bladder cancer. **Immunol.Res.**, Basel, v. 39, p. 79-93, 2007.
- STOKLOSA T, GOLAB J. Prospects for p53-based cancer therapy. **Acta Biochim Pol.**, Warszawa,v. 52, p. 321–8, 2005.
- SYLVESTER, R.J.; VAN DER MEIJDEN, A.; WITJES, J.A.; JAKSE, G.; NONOMURA, N.; CHENG, C.; TORRES, A.; WATSON, R.; KURTH, K.H. High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. **Urology**,Cleveland, v. 66, p. 90-107, 2005.
- SHENG, W.Y.; HUANG, L. Cancer immunotherapy and nanomedicine. **Pharm.Res.**, New York, v. 28, p. 200-214, 2011.