

LEONARDO OLIVEIRA REIS

Bacilo Calmette-Guerin (BCG) e Enterotoxina B do *Staphylococcus aureus* (EBS) no Tratamento do Câncer não Músculo Invasivo de Bexiga Urinária de Ratos

**Campinas
2011**

Unidade BECL
T/UNICAMP
Cutter R277b
V. Ed.
Tombo BC 93181
Proc. 16-180-2011
C DX
Preço R\$ 11,00
Data 23/11/2011
Cód. tit. 815653

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

R277b

Reis, Leonardo Oliveira, 1978-
Bacilo calmette-guerin (BCG) e enterotoxina B do
Staphylococcus aureus (EBS) no tratamento do câncer
não músculo invasivo de bexiga urinária de ratos. /
Leonardo Oliveira Reis. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Ubirajara Ferreira
Coorientador: Valéria Cagnon Quitete
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Imunoterapia. 2. Vacina. 3. BCG. 4. Câncer. 5.
Bexiga. I. Ferreira, Ubirajara. II. Quitete, Valéria
Cagnon. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Anti-angiogenic effects of the superantigen staphylococcal enterotoxin B and bacillus calmette-guerin immunotherapy in the non-muscle invasive bladder cancer.

Palavra-chave em inglês:

Immunotherapy

Vaccine

BCG

Cancer

Bladder

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Doutor em Ciências da Cirurgia

Banca examinadora:

Ubirajara Ferreira [Orientador]

Valéria Cagnon Quitete [Coorientador]

Marcus Vinícius Sadi

Leopoldo Alves Ribeiro Filho

Fernandes Denardi

Laura Sterian Ward

Data da defesa: 23-09-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Titulação correta:

Doutor em Ciências

Profª Drª Ilka de Fátima S. Ferreira Boim
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia
FCM/UNICAMP
Matrícula 059170

Banca Examinadora da Defesa de Doutorado
LEONARDO OLIVEIRA REIS

Orientador: Prof. Dr. Ubirajara Ferreira

Membros:

1. Prof. Dr. Ubirajara Ferreira -

2. Prof. Dr. Marcus Vinicius Sadi -

3. Prof. Dr. Leopoldo Alves Ribeiro Filho -

2. Prof. Dr. Fernandes Denardi -

3. Profa. Dra. Laura Sterian Ward -

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23/09/2011

Dedico este trabalho...

...à minha filha Helena que me inspira e à minha esposa Gláucia que tem acreditado nos meus sonhos...

...e aos meus pais João e Lizeth que me deram o alicerce...

“...o fogo queima e consome a madeira, mas forja o aço...; ...não tenha medo, SONHE, planeje, persevere, trabalhe duro e seja paciente...; ...transforme os obstáculos em degraus...”

Leonardo O. Reis

“...é belo modelar uma estátua e dar-lhe vida. Mas é sublime modelar uma inteligência e dar-lhe a liberdade...”

Victor Hugo

Agradecimentos

Ao orientador, Prof. Dr. Ubirajara Ferreira e à Co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Valéria H.A. Cagnon Quitete, que me conduziram no caminho de crescimento pessoal e intelectual, pelos ensinamentos, suporte e tolerância.

Ao amigo, Prof. Dr. Wagner José Fávaro pelo apoio e inúmeras contribuições. Ao Prof. Dr. Athanase Billis pelas valiosas contribuições e pelas análises histopatológicas. Ao Prof. Dr. Lísias Nogueira Castilho e ao Prof. Dr. Gilberto de Nucci pelas pertinentes considerações no exame de qualificação. À Sr^a. Sueli Chaves pela gentileza da revisão editorial.

Aos membros da banca titulares e suplentes, Prof. Dr. Marcus Vinícius Sadi, Prof. Dr. Leopoldo Alves Ribeiro Filho, Prof. Dr. Fernandes Denardi, Prof^a Dr^a Laura Sterian Ward, Prof. Dr. Marcos Tobias Machado, Prof. Dr. Wagner Eduardo Matheus e Prof. Dr. André Deeke Sasse.

À Comissão de Pós Graduação, ao Departamento de Cirurgia, à Disciplina de Urologia e aos colegas da Divisão de Urologia Oncológica.

À FAEPEX FCM-UNICAMP pelo auxílio que tornou possível a execução deste trabalho.

Sumário

<i>Símbolos, Siglas e Abreviaturas</i>	<i>viii</i>
<i>Resumo</i>	<i>x</i>
<i>Summary</i>	<i>xii</i>
<i>1.Introdução</i>	<i>14</i>
1.1. Carcinoma de Bexiga Urinária e Modelo Experimental (instilação intravesical de carcinógeno em roedores)	14
1.2. Imunoterapia no Câncer de Bexiga Urinária	18
1.3. Regulação da Angiogênese	20
1.4. Proliferação e Apoptose	24
<i>2. Justificativa e Objetivos</i>	<i>28</i>
2.1 Justificativa	28
2.2.Objetivos específicos	29
<i>3.Materiais e Métodos</i>	<i>30</i>
3.1. Animais e Procedimento Experimental	30
3.2. Análises Histopatológicas	32
3.3. Imunomarcção dos Antígenos: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), Metaloproteinase de Matriz 9 (MMP-9), Endostatina, Receptor do Fator de Crescimento Homólogo à Insulina 1 (IGFR-1) e Ki-67	33
3.4. Contagem de Células Ki-67 Positivas e Determinação do Índice Proliferativo	34
3.5. Detecção de Apoptose e Determinação do Índice Apoptótico	35
3.6. Extração de Proteínas e <i>Western Blotting</i>	36
3.7. Análises Estatísticas	37
<i>4. Publicações</i>	<i>38</i>
4.1.Trabalho: Anti-Angiogenic Effects of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) and BacillusCalmette-Guerin (BCG) Immunotherapy in the Superficial Bladder Cancer	38
4.2. Artigo: Anti-Angiogenic Effects of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B and Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy in the Non-muscle invasive Bladder Cancer	41

5. Discussão.....	65
6. Conclusões.....	75
7. Referências Bibliográficas.....	76
8. Anexos	91
8.1. Aprovação da Comissão de Ética	91
8.2. Direitos Autorais.....	92

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

BSA	Albumina soro bovino
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
CBNMI	Câncer de bexiga urotelial não músculo invasivo
CB	Carcinoma da bexiga urinária
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEMIB/UNICAMP	Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas
TdT	Deoxynucleotidyl transferase
DAB	Diaminobenzidina
EBS	Enterotoxina B do <i>Staphylococcus aureus</i>
GMCSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
HIF-1	Fator indutor de hipóxia
IGF	Fator de crescimento homólogo à insulina
HRP	Horseradish peroxidase
IA	Índice apoptótico
IP	Índice proliferativo
IU	Infecção urinária
IFN	Interferon
IL	Interleucinas

LAK	<i>Leukocyte-activated killer</i>
MMPs	Metaloproteinases
MHC	Moléculas de histocompatibilidade maior
MNU	N-metil-N-nitrosouréia
NK	Natural killers
IGFBPs	Proteínas ligantes de IGF
IP-10	Proteína-10 interferon-induzida
RCT	Receptor da célula T
IGFR-1	Receptor de fator de crescimento homólogo à insulina-1
SAg	Superantígenos
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gelelectrophoresis</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline with Tween</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling
UFC	Unidades formadoras de colônia

Resumo

O tratamento do câncer de bexiga urotelial não músculo invasivo (CBNMI) com Bacilo Calmette-Guerin (BCG) tem efeito comprovado na redução de recidiva tumoral, embora ocorram efeitos colaterais de intensidades variadas, desde sintomas irritativos leves até reação sistêmica grave e o impacto na progressão tumoral seja controverso. Neste cenário a enterotoxina B do *Staphylococcus aureus* (EBS) destaca-se como alternativa promissora na terapêutica do CBNMI. Assim, os objetivos principais do presente estudo foram comparar e caracterizar os efeitos morfológicos, antiangiogênicos e o balanço entre proliferação e apoptose das imunoterapias com BCG, EBS e BCG-EBS no tratamento do CBNMI de ratos induzidos quimicamente. Um total de 75 ratas da linhagem Fisher 344 foram utilizadas. Para a indução do câncer, 60 animais foram anestesiados e receberam uma dose intravesical de 1,5mg/kg de N-metil-N-nitrosouréia (MNU) a cada 15 dias, nas semanas 0, 2, 4 e 6 (4 doses). Os outros 15 animais receberam 0,3ml de solução fisiológica intravesical e constituíram o grupo Controle (CT). Após o período de indução com MNU, os animais foram divididos em 5 grupos (15 animais cada): grupo MNU: recebeu o mesmo tratamento que o grupo CT - 0,3 ml de solução fisiológica intravesical; grupo BCG: recebeu dose intravesical de 10^6 UFC (2×10^6 UFC/mg) de BCG; grupo EBS: recebeu dose intravesical de 10µg/ml de EBS; grupo BCG-EBS: recebeu tratamento simultâneo com BCG e EBS nas

mesmas concentrações que nos grupos BCG e EBS; todos por 6 semanas consecutivas. Após 15 semanas de protocolo, os animais foram sacrificados e as bexigas urinárias coletadas e submetidas às análises histopatológica, imunohistoquímica e *Western Blotting*. Os resultados demonstraram que as alterações histopatológicas mais frequentes em cada grupo foram carcinoma papilífero e carcinoma *in situ* no grupo MNU, hiperplasia papilífera nos grupos BCG e EBS e hiperplasia plana no grupo BCG-EBS. Não houve toxicidade relevante. Os índices apoptótico e proliferativo foram aumentados em todos os grupos de tratamento. Contudo, esses índices foram menores nos grupos BCG, EBS e BCG-EBS em relação ao grupo MNU. Intensas imunorreatividades para VEGF, MMP-9 e IGFR-1 foram verificadas no grupo MNU; moderadas nos grupos BCG e EBS; e fracas nos grupos BCG-EBS e Controle. Em contraste, intensa imunorreatividade para endostatina foi verificada nos grupos Controle e BCG-EBS em relação aos demais grupos experimentais. Assim, pode-se concluir que o tratamento associado BCG-EBS foi mais eficaz em restaurar o equilíbrio entre os processos de apoptose e proliferação celular e as alterações histopatológicas do que os tratamentos isolados com BCG e EBS. Além disso, a diminuição da proliferação celular e das alterações histopatológicas correlacionaram-se com o aumento da reatividade para endostatina e diminuição das reatividades para VEGF, IGFR-1 e MMP-9. A associação entre BCG e EBS abre uma nova perspectiva terapêutica no CBNMI.

Summary

PURPOSE: Compare and characterize effects of intravesical Bacillus Calmette–Guerin (BCG), Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) and BCG plus SEB treatments in the non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC).

METHODS: Seventy-five female Fisher 344 rats were anesthetized and 15 of them received 0.3 ml of saline (Control group), 60 animals received 1.5 mg/kg dose of N-methyl-N-nitrosourea (MNU), all intravesically every other week for 6 weeks. The rats were divided into 5 groups: MNU and Control groups received 0.3 ml of saline; BCG group received 10^6 CFU dose of BCG; SEB group received 10 μ g/ml dose of SEB and BCG-SEB group received simultaneous BCG and SEB, all intravesically for 6 weeks. After 15 weeks, all urinary bladders were collected for histopathological, immunological and Western Blotting analyses.

RESULTS: Papillary carcinoma (pTa) and high-grade intraepithelial neoplasia (carcinoma *in situ*) were more often in MNU group, papillary hyperplasia in BCG and SEB groups and flat hyperplasia in BCG-SEB group. No significant toxicity was observed. Apoptosis and cellular proliferation indexes decreased in BCG, SEB and BCG-SEB groups compared to MNU group. Intensified VEGF, MMP-9, Ki-67 and IGFR-1 immunoreactivities were verified in the MNU group; moderate in the BCG and SEB groups; and weak in the BCG-SEB and Control groups. In contrast,

intense endostatin immunoreactivity was verified in the Control and BCG-SEB groups.

CONCLUSIONS: BCG and SEB presented similar anti-angiogenic effects. BCG-SEB treatment showed an additional activity compared to monotherapy, being more effective in restoring apoptosis and cellular proliferation balance, correlating with increased endostatin and decreased VEGF, MMP-9, Ki-67 and IGFR-1 reactivities.

1.Introdução

1.1. Carcinoma de Bexiga Urinária e Modelo Experimental (instilação intravesical de carcinógeno em roedores)

O carcinoma da bexiga urinária (CB) é a segunda doença maligna mais comum do trato urinário. A Sociedade Americana do Câncer estima que haverá cerca de 70 mil novos casos de CB diagnosticados nos Estados Unidos ao longo de 2011 (1).

A maioria dos CB são carcinomas esporádicos que surgem a partir do urotélio, o qual é caracterizado por um epitélio transicional composto por células superficiais (ou em guarda-chuva), intermediárias e basais (2). Mais de 70% dos CB são papilíferos e não músculo invasivos (CBNMI) (2).

Um número significativo de fatores de risco tem sido relacionado ao desenvolvimento de CB, como a exposição a agentes cancerígenos químicos. O tabagismo é um dos maiores fatores de risco, o qual é responsável por um terço dos casos de CB (3,4). A fumaça do cigarro de tabaco contém cerca de 4.700 substâncias químicas muitas das quais são compostos genotóxicos, tais como os compostos N-nitrosos e aminas aromáticas (4). A urina dos fumantes tem

mostrado características mutagênicas, contendo o dobro da concentração total de aminas aromáticas quando comparada aos compostos encontrados na urina de não fumantes (4).

O estudo do CB tem se desenvolvido utilizando diversos modelos experimentais, dentre eles, modelos de linhagens celulares uroteliais provenientes de tecido humano, facilitados pela sua acessibilidade. A relevância clínica dos achados derivados destes modelos necessita de validação em modelos *in vivo* (5,6) e testar novos agentes em modelos animais é importante, pois requer a consideração da via de administração da droga, farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade.

Além disso, uma característica única no tratamento do câncer de bexiga é a capacidade de instilação de agentes terapêuticos no seu lúmen, particularmente para os tumores não músculo invasivos, evitando assim a toxicidade sistêmica e maximizando a exposição do tecido à droga (7).

A utilização de modelos envolvendo roedores para a carcinogênese da bexiga urinária é assegurada pela semelhança com CB desenvolvido em humanos (7). A estrutura e a função do trato urinário inferior de roedores são semelhantes às dos seres humanos e ambas as espécies exibem perfis de expressão gênica similares no CB, sugerindo que os roedores servem como adequado modelo experimental para o CB (8) após adaptação dos alvos terapêuticos aos homólogos humanos.

Alterações neoplásicas podem ser iniciadas na bexiga urinária de camundongos e ratos no período de algumas semanas, através de múltiplas doses de carcinógeno instiladas diretamente na bexiga, caracterizando modelos de carcinogênese vesical em roedores (7).

Em 1972, Hicks e Wakefield (9) utilizaram quatro doses intravesicais de N-metil-N-nitrosouréia (MNU) para rápida indução de CB em ratos. Estes mesmos autores demonstraram que altas concentrações de MNU induziram lesão citotóxica no urotélio, a qual levou à resposta inflamatória, com rápida proliferação e acúmulo e perpetuação de mutações (7,9). O MNU é um composto genotóxico completo, que pode atuar como iniciador e/ou como promotor e causar persistente metilação do DNA (10,11). Além, disso, o MNU é o único carcinógeno conhecido por agir diretamente sobre o urotélio, sem necessidade de ativação metabólica (10,11).

Posteriormente, este modelo foi otimizado, reproduzindo tumores de bexiga clinicamente observados em humanos, os quais têm origem exclusiva no urotélio (ortotópicos), são espontâneos e não implantados e histologicamente equivalentes ao carcinoma urotelial humano (11-14).

A carcinogênese urotelial induzida por MNU em roedores apresenta uma sequência de alterações morfológicas, iniciando como hiperplasia simples e progredindo para a hiperplasia nodular e papilar (15). A hiperplasia evolui para graus progressivos de displasia, papilomas, carcinomas não músculo invasivos e, finalmente, músculo invasivos (16,17). Muitos tumores exofíticos induzidos em

ratos são polipóides, geralmente pedunculados e eventualmente com um padrão de crescimento papilar invertido (15,16). Enquanto as proliferações papilíferas são frequentes em ratos e humanos, sugerindo maior equivalência entre eles, a hiperplasia nodular em camundongos é consideravelmente mais comum, ocorrendo com certa frequência com ausência completa de hiperplasia papilar (18).

Dentre as diversas estirpes de ratos, Fisher 344 é a linhagem isogênica mais utilizada nos estudos publicados até o momento, particularmente na pesquisa de neoplasias e toxicologia. Estes animais foram previamente bem caracterizados com relação a doenças espontâneas, sobrevida média (87% em 24 meses, ambos os sexos), resposta a químicos, e apresentam alta susceptibilidade às ações carcinogênicas do MNU (14).

Animais isogênicos são obtidos do acasalamento irmão x irmã por vinte ou mais gerações consecutivas (F20), de forma que possam ser atribuídos a um único ancestral em pelo menos 20 gerações. Trata-se de uma definição operacional, não dependente de teste genético. A incidência de homozigose em qualquer *locus* gênico nestes animais é superior a 98% e são histocompatíveis entre si, podendo ser transplantados sem rejeição imunológica. O aspecto mais importante no estudo do câncer é que menos animais são necessários para detectar diferenças entre os grupos estudados (19).

As vantagens do uso de MNU na indução de câncer incluem baixo custo, reprodutibilidade e um hospedeiro imunocompetente, que é importante, por exemplo, ao estudar imunoterapias intravesicais no câncer de bexiga.

Recentemente, a otimização das técnicas de instilação intravesical de MNU em ratos culminou com relato de ampliação do modelo, com carcinogênese do trato superior além de sensível melhora na eficiência do padrão vesical (14).

1.2. Imunoterapia no Câncer de Bexiga Urinária

O câncer vesical, caracterizado por lesões “superficiais” (70% não invadem a túnica muscular), apresenta elevada taxa de recidiva (70%) e progressão (20% a 30%) após ressecção endoscópica transuretral (RTU), (20).

Morales et al. (1976) (21) foram pioneiros em comprovar o sucesso no tratamento de câncer vesical “superficial” com *Mycobacterium bovis*, bacilo Calmette-Guerin (BCG). Desde então, BCG é o tratamento de escolha para o CBNMI de alto risco, sendo considerada atualmente a terapia que apresenta melhores resultados, superior inclusive à quimioterapia intravesical com relação às taxas de recorrência do tumor (22). A instilação intravesical de BCG diminuiu a taxa de recidiva para algo em torno de 31% (20).

A imunoterapia com BCG resulta em resposta imune massiva caracterizada pela indução da expressão de citocinas tanto na urina quanto na bexiga e influxo de células inflamatórias na parede vesical. Citocinas como fator

de necrose tumoral (TNF), fator estimulante de colônias de macrófagos (GMCSF), interferon (IFN) e interleucinas (IL) induzem resposta de linfócitos T-auxiliadores e das células *natural killers* (NK) na bexiga (23). De acordo com Schamhart et al. (23), após a instilação de BCG, a parede vesical apresenta infiltrado celular granulomatoso, envolto por linfócitos e granulócitos com indução de resposta imune de longa duração, a qual pode persistir por mais de um ano. Contudo, tal resposta varia amplamente nos pacientes e a possível correlação entre expressão de citocinas e resultado da terapia é alvo de intensa investigação (24).

Entretanto, o uso de organismos vivos e atenuados pode causar efeitos colaterais além de dificuldade em prever resposta. Os efeitos colaterais estão presentes em mais de 90% dos pacientes tratados com BCG em diferentes graus de intensidade, sendo que esses vão desde sintomas irritativos leves a moderados do trato urinário até óbito, passando por complicações graves como instabilidade hemodinâmica, febre persistente ou reações alérgicas comprometendo sua utilização (5,25).

Somam-se aos efeitos colaterais as falhas ao BCG (cerca de 20% a 40%), que podem ocorrer em intervalos variáveis de tratamento (26). Embora cerca de 35% destes pacientes respondam a um segundo ciclo de BCG (27), a maioria depende de terapia alternativa de resgate, atualmente representada pela cirurgia radical, a cistectomia, mesmo em casos não comprovados de invasão muscular.

Dessa forma, tratamentos alternativos utilizando subfrações não viáveis de bactérias têm sido propostos com resultados promissores, dentre eles os

superantígenos (SAg), (12,13). SAg são proteínas produzidas por microorganismos como bactérias, micoplasmas ou vírus.

A enterotoxina B do *Staphylococcus aureus* (EBS) é um SAg com 30kDa e portanto não é passível de difusão através de tecido íntegro como o urotélio (12,13), o que teoricamente aponta para a limitação de possíveis efeitos colaterais.

EBS se mostrou capaz de desencadear potente resposta imune. Experimentalmente os linfócitos ativados por EBS são capazes de induzir apoptose nas células do carcinoma urotelial. Embora tal resposta imune assemelhe-se à desencadeada pelo BCG, esta é única em termos de efeitos biológicos e patogênicos merecendo estudos futuros. Os superantígenos estão entre os mais potentes ativadores de proliferação das células T através de indução pronunciada de expressão de seus receptores (12,13).

1.3. Regulação da Angiogênese

O câncer de bexiga é um tumor muito vascularizado, constituído por morfologia papilar com uma árvore de ramificação vascular integrada, e o conhecimento sobre suas vias de angiogênese está se expandindo rapidamente.

O microambiente tumoral é caracterizado por uma flutuação de hipóxia e privação de nutrientes, os quais levam ao aumento das adaptações de clones genéticos e epigenéticos, bem como ao aumento da agressividade e potencial de

metástase (28,29). Por sua vez, essas adaptações hipóxicas conferem aos tumores maior resistência às terapias atuais (28,29). Parte desta adaptação é a regulação de genes em resposta à hipóxia. Muitos destes genes são regulados pelo fator indutor de hipóxia (HIF-1), o qual é composto por um par de heterodímeros, HIF-1 α e HIF-1 β (28,29). Estes heterodímeros ligam-se ao promotor dos genes responsivos à hipóxia, além de interagir com outros fatores de transcrição. A hipóxia tumoral resulta em suprarregulação de HIF-1 α e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), culminando com o aumento da angiogênese (29).

A angiogênese é definida como o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes e possui um papel importante no crescimento e desenvolvimento, cicatrização de feridas e na tumorigênese (30). O VEGF é um polipeptídeo ligante de heparina derivado de plaqueta, atuando como um mitógeno específico das células endoteliais e possui papel fundamental na regulação da angiogênese tumoral (31,32). O VEGF estimula todos os aspectos da função endotelial como proliferação, migração, produção de óxido nítrico e permeabilidade de células endoteliais. Além disso, a ação do VEGF protege o endotélio da apoptose (33).

Na ausência de neovascularização, os tumores sólidos não crescem além de 1 a 2mm, demonstrando que o crescimento tumoral e a metástase são dependentes da angiogênese (34,35). Os inibidores da angiogênese têm sido desenvolvidos para atingir as células endoteliais vasculares e bloquear a angiogênese do tumor, uma vez que essas células são geneticamente estáveis e,

portanto, menos propensas a acumular mutações que lhes permitiriam desenvolver resistência a fármacos (34,35). Os inibidores da angiogênese são divididos em duas classes: os inibidores diretos e os indiretos (36).

Os inibidores diretos da angiogênese atuam nas células endoteliais vasculares impedindo-as de responder a vários estímulos, através do bloqueio da expressão ou da ativação dos receptores dos fatores pró-angiogênicos nas células endoteliais, por exemplo bloqueando o receptor para VEGF. Em contraste, os inibidores indiretos da angiogênese interferem na comunicação pró-angiogênica entre as células tumorais e as células endoteliais. Este efeito inibitório indireto pode ser alcançado por: inibição da expressão de fatores angiogênicos como VEGF no tumor, dentre outros (36).

A endostatina, um fragmento proteolítico C-terminal do colágeno XVIII, é um potente inibidor direto endógeno da angiogênese (37,38). A endostatina induz apoptose tanto nas células endoteliais vasculares quanto nas tumorais (37,38). É, portanto, uma potente substância antitumoral, que exerce seus efeitos através da inibição da vascularização e do suprimento sanguíneo nos tecidos neoplásicos (37).

Chang et al. (1999) (39) verificaram que a endostatina imunolocaliza na matriz subendotelial de vasos sanguíneos. As ações da endostatina têm sido verificadas em diversos tumores sólidos como bexiga e próstata (40,41). Em estudos clínicos, a endostatina não tem demonstrado toxicidade ou resistência significativas em 65 tipos de tumores (35). Também, Yokoyama et al. (2000) (42)

avaliaram os efeitos do tratamento com endostatina na tumorigênese espontânea de camundongos transgênicos para o câncer de mama e verificaram um aumento significativo da sobrevida desses animais, bem como redução no tamanho e progressão tumoral.

Embora a invasão e angiogênese sejam processos muito diferentes, ambos estão intimamente relacionados e exigem degradação da matriz extracelular e da membrana basal através de proteases (43). A cooperação de metaloproteinases (MMP)s na degradação da membrana basal do endotélio vascular e matriz extracelular, cria uma passagem por estas barreiras físicas para a formação de novos capilares, assim como contribui para a invasão das células tumorais e metástase (44).

MMPs são ativadas por pró-enzimas, hipóxia e acidose e, através da degradação da matriz extracelular liberam fatores pró-angiogênicos (45). Além disso, o aumento da atividade de MMPs, principalmente a MMP-9, são preditores independentes de sobrevida em câncer de bexiga (46).

As MMPs também têm sido implicadas no processamento do fator de crescimento homólogo à insulina (IGF), que por sua vez atua no suporte do crescimento tumoral (47). Fisiologicamente, IGF-1 é sequestrado pelas proteínas ligantes de IGF (IGFBPs), que servem para evitar a interação dos IGFs com seus receptores (47,48). MMPs desempenham um papel na liberação de IGF ativo da proteína de ligação (47).

O receptor de IGF-1 (IGFR-1) desempenha um papel essencial na

transformação maligna, promovendo o crescimento celular e protegendo as células neoplásicas de apoptose. Sinalização aberrante de IGFR-1 está implicada em vários tipos de tumores, incluindo carcinomas uroteliais da bexiga urinária. Tecidos de câncer de bexiga invasivo mostraram intensa expressão de IGFR-1 quando comparados aos controles não malignos (49).

Em síntese, a angiogênese é um processo de várias etapas que depende do desequilíbrio de fatores pró- e anti-angiogênicos, bem como interações com a matriz extracelular. Neste contexto, a indução do desequilíbrio entre apoptose e proliferação celular e a regulação da atividade de MMPs, IGFR-1 e VEGF podem ter efeitos somatórios ou mesmo sinérgicos em contraposição aos efeitos da endostatina.

1.4. Proliferação e Apoptose

O câncer é um exemplo de disfunção dos mecanismos normais de regulação do ciclo celular, com hiperproliferação e diminuição relativa de remoção de células. A supressão de apoptose durante a carcinogênese tem papel central no desenvolvimento e progressão de alguns cânceres (50,51).

Relação direta entre índice proliferativo (IP) e estágio, e entre índice apoptótico (IA) e grau de diferenciação tumoral foram demonstrados no tumor urotelial, indicando suas implicações na patogênese do carcinoma urotelial (52).

A apoptose é um processo cuidadosamente regulado, caracterizado por aspectos bioquímicos e morfológicos específicos nos quais a ativação das caspases tem um papel fundamental. Métodos que utilizam a detecção destas proteínas não permitem a manutenção da integridade da amostra, impedindo a definição do tipo de célula que está sofrendo apoptose e outra desvantagem é que a ativação das caspases não significa necessariamente que a apoptose irá ocorrer, o que afeta a especificidade do ensaio (53).

Uma das maiores características do apoptose é a degradação do DNA após a ativação de endonucleases $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ dependentes. Esta clivagem leva à formação de bandas fragmentadas de DNA nas células apoptóticas que são identificadas pelo método TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling*) usando o terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) para transferir a biotina-dUTP para as extremidades clivadas de DNA (53). Este método é muito sensível, permitindo a detecção de uma única célula através de microscopia de fluorescência, sendo uma técnica rápida, concluída dentro de três horas (54), porém deve ser complementado por outro ensaio como a reação de Feulgen neste estudo, pois pode apresentar falsos positivos devido a células em processos como necrose, reparo do DNA, e transcrição gênica (53).

A microscopia eletrônica de transmissão é considerada o padrão ouro para confirmação do processo de apoptose devido à caracterização ultra estrutural da célula apoptótica (55). Suas principais desvantagens são: o custo, o tempo despendido, e a possibilidade de analisar apenas uma pequena área de cada vez.

Outras desvantagens incluem dificuldades em detectar algumas células em fase precoce do processo de apoptose.

O entendimento da apoptose é vital porque a morte celular programada é um componente comum a processos patológicos e fisiológicos. Desencadeia diversos estímulos que culminam com a fragmentação do DNA, degradação do citoesqueleto e proteínas nucleares, formação de corpos apoptóticos, expressão de ligantes para fagócitos, receptores celulares e finalmente absorção pelos fagócitos, último componente da apoptose. Uma característica bioquímica é a expressão de marcadores de superfície celular que resultam no reconhecimento precoce das células apoptóticas por fagócitos com comprometimento mínimo do tecido adjacente (56).

A ampla participação da apoptose na fisiopatologia das doenças se presta à intervenção terapêutica em múltiplos pontos. O entendimento dos diversos mecanismos de apoptose e outras variantes da morte celular programada ao nível molecular permite uma visão mais detalhada em diversos processos patológicos possibilitando estratégias de tratamento (53).

Considerando o equilíbrio entre proliferação e morte celular (apoptose), o aumento da proliferação pode se acompanhar de diminuição ou mesmo aumento de apoptose (57,58).

Além de aumento de proliferação e diminuição de apoptose, aumento de ambas as variáveis foi demonstrado em diferentes tumores, ainda que reflitam fenômenos antagônicos (57,58).

O índice de proliferação está associado ao padrão de DNA celular e ao grau histopatológico, desempenhando papel crítico na carcinogênese urotelial (59-63). Quando detectado pelo Ki-67 é significativamente maior em células aneuplóides comparadas às diplóides (padrão das células normais), (64).

A proliferação celular detectada pelo Ki-67 está associada ao grau de diferenciação tumoral, estágio, recorrência e prognóstico (59-61); e a apoptose, detectada pelo método TUNEL, está relacionada ao grau de diferenciação, estágio, e prognóstico no tumor urotelial vesical (62) e do trato urinário superior (63-65).

2. Justificativa e Objetivos

2.1 Justificativa

O tratamento padrão do CBNMI, utilizando BCG, embora atualmente apresente sólidas indicações clínicas (65,66), necessita de esquema de manutenção e traz limitações em sua eficácia especialmente em relação a redução das taxas de progressão (67) e efeitos colaterais indesejáveis, muitas vezes deletérios ao paciente.

Apesar de o uso de dose reduzida de BCG apresentar eficácia similar à sua dose-padrão com menos toxicidade (68,69) e o uso de ofloxacina, uma fluoroquinolona com propriedades tuberculostáticas, ser opção no controle de efeitos colaterais (70), alternativas eficazes ao BCG, assim como o avanço da terapia do CBNMI se fazem necessários.

O emprego da biotecnologia para o desenvolvimento de variadas imunoterapias tornou-se uma opção terapêutica valiosa. Em face do papel estratégico dos imunoterápicos e da necessidade de novas moléculas destaca-se o superantígeno EBS, que por sua grande versatilidade e mínima toxicidade,

revelada através de estudos preliminares *in vivo* e *in vitro*, figura como nova perspectiva para o combate de alguns tipos de câncer, incluindo o CBNMI.

Considerando a importância de tratamentos alternativos que reduzam as taxas de recorrência e progressão tumoral do CBNMI, os objetivos gerais deste estudo foram caracterizar e comparar os efeitos moleculares das imunoterapias com BCG, EBS e terapia combinada no tratamento do CBNMI induzido quimicamente em ratos. Tais objetivos gerais foram alcançados através dos seguintes objetivos específicos:

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar e comparar a histopatologia do CBNMI de ratos induzidos quimicamente frente às imunoterapias com BCG, EBS e terapia combinada;
- Caracterizar os efeitos das imunoterapias com BCG, EBS e terapia combinada no balanço de moléculas implicadas na angiogênese, antiangiogênese, proliferação e apoptose celular do CBNMI de ratos induzidos quimicamente.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais e Procedimento Experimental

Foram utilizados 75 ratos fêmeas da linhagem Fisher 344, na faixa etária de sete semanas, pesando em média 150g (11), obtidos no Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP). Para a indução do câncer de bexiga urinária, 60 animais foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina 2% (5mg/kg i.m.; *König, São Paulo, Brasil*) e Cloridrato de Cetamina 10% (60mg/kg, i.m.; *Fort Dodge, Iowa, EUA*), e mantidos nesse estado por 45 minutos para evitar micção espontânea e instilada uma dose de 1,5mg/kg de N-metil-N-nitrosouréia (MNU - *Sigma, St. Louis, MO, EUA*) dissolvida em 0,3 ml de citrato de sódio (1M, pH 6,0) a cada 15 dias (semanas 0, 2, 4, 6), totalizando quatro doses (14). Os outros 15 animais que não receberam MNU foram considerados como grupo **Controle** e receberam 0,3 ml de solução fisiológica 0,9% intravesical seguindo o mesmo protocolo. Duas semanas após a última dose, todos os animais foram divididos em 5 grupos (15 animais cada):

a) **Grupo Controle (CT)**: recebeu uma dose intravesical semanal de 0,3ml de solução fisiológica 0,9% por seis semanas consecutivas;

b) **Grupo MNU**: recebeu o mesmo tratamento que o grupo CT;

- c) **Grupo BCG (Bacilo Calmette-Guerin)**: recebeu uma dose intravesical semanal de 10^6 UFC de BCG (2×10^6 UFC/mg, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil) diluída em 0,3 ml de solução fisiológica 0,9% por seis semanas consecutivas;
- d) **Grupo EBS (enterotoxina B do estafilococo)**: recebeu uma dose intravesical semanal de 10 μ g/ml de EBS (*Sigma, St. Louis, MO, EUA*) dissolvida em 0,3 ml de solução fisiológica 0,9% por seis semanas consecutivas (13);
- e) **Grupo BCG-EBS**: recebeu tratamento simultâneo com BCG e EBS nas mesmas concentrações que nos grupos BCG e EBS por seis semanas consecutivas.

As doses intravesicais nos diferentes grupos experimentais foram instiladas via cateter flexível 20 gauge (*Abocath*, São Paulo, Brasil). Os animais de todos os grupos experimentais receberam água e a mesma dieta sólida *ad libitum* (*Nuvilab*, Colombo, PR, Brasil). Após 15 semanas de protocolo, os animais foram sacrificados e as bexigas urinárias coletadas e submetidas às análises histopatológicas, imunohistoquímica e Western Blotting. O experimento respeitou as normas da Comissão de Ética na Experimentação Animal, e foi aprovado pelo protocolo número 1242-1.

3.2. Análises Histopatológicas

A bexiga urinária de dez animais de cada grupo foi coletada e fixada em imersão em paraformaldeído 4% por doze horas. Após a fixação, os tecidos foram lavados em álcool etílico a 70%, com posterior desidratação em uma série crescente de álcoois. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em xilol por duas horas e inclusos em parafina e polímeros plásticos (*Paraplast Plus*, St. Louis, MO, EUA).

Em seguida, os materiais foram seccionados no micrótomo *Leica RM 2165* (*Leica, Munique, Alemanha*) com espessura de 5µm, corados em Hematoxilina-Eosina e fotografados no fotomicroscópio *Zeiss Axiophot* (*Zeiss, Munique, Alemanha*). Os diferentes grupos experimentais foram classificados conforme o estadiamento proposto pelo consenso da Organização Mundial da Saúde/Sociedade Internacional de Patologia Urológica (71).

3.3. Imunomarcação dos Antígenos: Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), Metaloproteinase de Matriz 9 (MMP-9), Endostatina, Receptor do Fator de Crescimento Homólogo à Insulina 1 (IGFR-1) e Ki-67

A bexiga urinária de dez animais de cada grupo experimental, os mesmos utilizados para as análises histopatológicas, foram utilizadas para as imunomarcações. A seguir foram obtidos cortes com 5µm de espessura no micrótomo *Leica RM 2165* (*Leica, Munique, Alemanha*), coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes em tampão citrato (pH 6,0) a 100°C em microondas ou tratamento com proteinase K, dependendo das características de cada anticorpo.

O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido com H₂O₂ (0,3% em metanol) com posterior incubação em solução bloqueadora com albumina soro bovino (BSA) 3%, em tampão TBS-T (*Tris buffered saline with Tween*) por uma hora em temperatura ambiente. Posteriormente, os antígenos VEGF, MMP-9, Endostatina, IGFR-1 e Ki-67 foram localizados através dos anticorpos primários: *mouse VG-1* (*sc-53462; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA*) para VEGF, *mouse IM37* (*Calbiochem, Alemanha*) para MMP-9, *mouse 4i37* (*ab64569; abcam, EUA*) para Endostatina, *rabbit N-20* (*sc-720; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA*) para IGFR-1 e *rabbit AB9260* (*Millipore, Temecula, CA, EUA*) para Ki-67 diluídos (1:50; 1:100; 1:200; 1:200; 1:75, respectivamente) em BSA 1% e armazenados *overnight* a 4 °C. O *kit* Envision HRP (*Horseradish*

peroxidase, Dako Cytomation Inc., EUA) foi usado para detecção dos antígenos, de acordo com as instruções do fabricante.

Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP conjugado proveniente do *kit* Envision (Dako) por 40 minutos e, posteriormente revelados com diaminobenzidina (DAB), contra-corados com Hematoxilina de Harris e avaliados no fotomicroscópio *Zeiss Axiophot* (*Zeiss, Munique, Alemanha*).

Para avaliar a intensidade das imunorreatividades dos antígenos, a porcentagem de células uroteliais da bexiga urinária positivas foi examinada em dez campos para cada anticorpo com aumento de 400x. A intensidade da marcação foi graduada em uma escala de 0-3, e expressa como 0 (ausência de imunorreatividade), 0% de células uroteliais positivas; 1 (fraca imunorreatividade), 1-35% de células uroteliais positivas; 2 (moderada imunorreatividade), 36-70% de células uroteliais positivas; 3 (intensa imunorreatividade), >70% de células uroteliais positivas (72).

3.4. Contagem de Células Ki-67 Positivas e Determinação do Índice Proliferativo

Os índices proliferativos foram obtidos por contagem das células Ki-67 positivas. Amostras da bexiga urinária de dez animais de cada grupo, as mesmas destinadas à imunomarcação para Ki-67 foram utilizadas. A seguir, dez campos de cada espécime foram analisados com objetiva de 100x, e o índice proliferativo foi

determinado dividindo-se o número de células Ki-67 positivas pelo número total de células encontradas nos campos microscópicos.

3.5. Detecção de Apoptose e Determinação do Índice Apoptótico

Amostras da bexiga urinária de dez animais de cada grupo, as mesmas destinadas às análises histopatológicas foram utilizadas. A fragmentação do DNA - TUNEL foi detectada utilizando o sistema de detecção fluorescente para apoptose - (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os núcleos apoptóticos foram identificados e fotografados através do microscópio Zeiss Axiophot (Zeiss, Munique, Alemanha) equipado com fluorescência.

Para a determinação do índice apoptótico foi utilizada a reação de Feulgen; os cortes foram submetidos à hidrólise com 4 N HCl por 75 minutos e tratados com o reagente de Schiff por 40 minutos. Depois de extensa lavagem, os cortes foram desidratados e montados em lâminas. A seguir, dez campos de cada animal foram analisados com objetiva de 100x, e o índice apoptótico foi determinado dividindo-se o número de núcleos apoptóticos pelo número total de núcleos encontrados nos campos microscópicos. Os núcleos apoptóticos foram identificados por características como picnose e/ ou fragmentação nucleolar.

3.6. Extração de Proteínas e Western Blotting

A bexiga urinária foi coletada de cinco animais de cada grupo experimental, congelada e, posteriormente, submetida às análises de *Western Blotting*. As bexigas urinárias foram homogeneizadas em tampão de extração contendo Triton-x-1%, NaCl 150mM, Tris 10mM pH 7,4, EDTA 1mM, Hepes 1mM pH 7,6, PMSF 0,2mM e 10 µL/ml de coquetel inibidor de proteases (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA*).

Os extratos das bexigas urinárias foram obtidos por centrifugação durante 20 minutos a 14.000 rpm a 4°C. Uma alíquota de cada amostra foi usada para determinação da concentração de proteínas, usando o reagente de Bradford (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA*). O correspondente a 50 microgramas de proteínas foi aplicado no gel SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gelelectrophoresis*). Após a eletroforese, o material foi transferido eletricamente para membranas de nitrocelulose.

As membranas foram então bloqueadas com BSA 3% diluído em TBS-T por uma hora e incubadas com os mesmos anticorpos primários utilizados nos procedimentos de imunomarcação para os antígenos VEGF, MMP-9, Endostatina e IGFR-1 diluídos 1:500, 1:1000, 1:1500 e 1:1500, em BSA 1%, respectivamente. Após lavagem com tampão TBS-T, as membranas foram incubadas por duas horas com os anticorpos secundários *anti-rabbit* e *anti-mouse* HRP conjugados na

diluição de 1:3000 em BSA 1%. Após nova série de lavagens com TBS-T, a atividade de peroxidase foi revelada com o cromógeno DAB.

O anticorpo para β -actina foi usado como controle endógeno. A intensidade da marcação obtida nas diferentes situações foi determinada por densitometria através do programa de análise de imagens *AxioVision 4* (Zeiss, Munique, Alemanha).

3.7. Análises Estatísticas

Foram empregados o Test-T e a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para comparação entre médias dos parâmetros quantificados (índices proliferativo e apoptótico; análises de *Western Blotting*) nos diferentes grupos experimentais. Todas as análises foram realizadas com nível de significância de 5% (73,74).

4. Publicações

4.1.Trabalho: Anti-Angiogenic Effects of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) and BacillusCalmette-Guerin (BCG) Immunotherapy in the Superficial Bladder Cancer

Authors: Reis LO, Cagnon VHA, Ferreira U¹, Billis A, Fávaro WJ.

Trabalho publicado em Anais de Congresso Internacional - J Urol; v.183(4), p.e126, 2010.

Conteúdo preliminar, apresentado na forma de pôdio e discutido no Congresso Americano de Urologia organizado pela Associação Americana de Urologia (AUA) em São Francisco, CA, EUA em maio de 2010 (75).

INTRODUCTION AND OBJECTIVES: The angiogenic phenotype can be defined as an effect of balance between angiogenic and anti-angiogenic factors. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is important regulator of cancer cell growth and metastases. Endostatin is one of angiogenic inhibitors that play an important role in suppressing tumor growth. However, the endostatin anti-angiogenic mechanisms

on urothelial tissue are unclear. Thus, the aim of this work was to characterize the anti-angiogenic effects of the BCG, SEB and BCG plus SEB treatments in the SBC of rats. **METHODS:** Fifty 7-week-old female Fisher 344 rats were anesthetized and 10 of them received 0.3ml dose of saline (Control group). Other 40 rats received 1.5 mg/kg dose of n-methyl-n-nitrosourea (MNU), intravesically every other week (weeks 0, 2, 4, 6). After MNU treatment, the 40 rats were divided into 4 groups: MNU group received saline; SEB group received 10µg/ml dose of SEB; BCG group received 10⁶ UFC dose of BCG and BCG-SEB group received simultaneous BCG and SEB treatments all intravesically for 6 weeks. After 15 weeks, all bladders were collected for immunological analyses of vascular endothelial growth factor (VEGF), endostatin, matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), insulin like growth factor receptor 1 (IGFR-1), Ki-67 (cellular proliferation) and apoptosis. **RESULTS:** The apoptosis and cellular proliferation indexes were increased in all treatment groups. However, these processes were decreased in the BCG, SEB and BCG-SEB groups in relation to the MNU group. These indexes were similar to the normal status in the BCG-SEB group. Intensified VEGF, IGFR-1 and MMP-9 immunoreactivities were verified in the MNU group; moderate in the BCG and SEB groups; and weak in the BCG-SEB and Control groups. Weak endostatin immunoreactivity was seen in the blood vessels of the MNU, BCG and SEB groups, moderate in the BCG-SEB group and intense in the Control group. **CONCLUSIONS:** The associated BCG-SEB treatment was more effective in restoring apoptosis and cellular proliferation balance than BCG or SEB treatments. VEGF, MMP-9 and IGFR-1 reactivities were an important pathway in cellular

proliferation, and can be considered fundamental elements involved in bladder carcinogenesis. Furthermore, the decreased cellular proliferation and neoplastic features were correlated with increased endostatin and decreased VEGF reactivities, mainly, in the BCG-SEB group. Finally, the association between BCG and SEB may be effective in treating bladder cancer focusing on angiogenic homeostasis. Source of Funding: FAEPEX – UNICAMP.

4.2. Artigo: Anti-Angiogenic Effects of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B and Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy in the Non-muscle invasive Bladder Cancer

Leonardo O. Reis¹, Ubirajara Ferreira¹, Athanase Billis², Valéria H.A. Cagnon³, Wagner J. Fávaro^{3,4}

- 1 - Department of Urology, School of Medicine, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil
- 2 - Department of Pathology, School of Medicine, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil
- 3 - Department of Anatomy, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil
- 4 - Department of Anatomy, Institute of Biosciences, Univ. Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

Correspondence to:

Dr. Leonardo Oliveira Reis, MD, MSc
R. Votorantim, 51, ap. 43
13073-090
Campinas-SP, Brazil
Phone/Fax: + 55 19 35217481
E-mail: reisleo@unicamp.br

*Article recommended for publication in **The Journal of Urology** and tentatively scheduled for publication in the **February 2012** issue. Submitted in June 2011.*

ABSTRACT

PURPOSE: Compare and characterize effects of intravesical Bacillus Calmette–Guerin (BCG), Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) and BCG-SEB treatments in non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC).

METHODS: Seventy-five female Fisher 344 rats were anesthetized and 15 of them received 0.3 ml of saline (Control group), 60 animals received 1.5 mg/kg dose of n-methyl-n-nitrosourea (MNU), all intravesically every other week for 6 weeks. The rats were divided into 5 groups: MNU and Control groups received 0.3 ml of saline; BCG group received 10^6 CFU dose of BCG; SEB group received 10 µg/ml dose of SEB and BCG-SEB group received simultaneous BCG and SEB, all intravesically for 6 weeks. After 15 weeks, all urinary bladders were collected for histopathological, immunological and Western Blotting analyses.

RESULTS: Papillary carcinoma (pTa) and high-grade intraepithelial neoplasia (carcinoma *in situ*) were more often in MNU group, papillary hyperplasia in BCG and SEB groups and flat hyperplasia in BCG-SEB group. No significant toxicity was observed. Apoptosis and cellular proliferation indexes decreased in BCG, SEB and BCG-SEB groups compared to MNU group. Intensified VEGF, MMP-9, Ki-67 and IGFR-1 immunoreactivities were verified in the MNU group; moderate in the BCG and SEB groups; and weak in the BCG-SEB and Control groups. In contrast, intense endostatin immunoreactivity was verified in the Control and BCG-SEB groups.

CONCLUSIONS: BCG and SEB presented similar anti-angiogenic effects. BCG-SEB treatment showed an additional activity compared to monotherapy, being more effective in

restoring apoptosis and cellular proliferation balance, correlating with increased endostatin and decreased VEGF, MMP-9, Ki-67 and IGFR-1 reactivities.

Key words: Non-muscle invasive bladder cancer; Bacillus Calmette-Guerin; Staphylococcal Enterotoxin B; Angiogenesis; Proliferation; Apoptosis; N-methyl-N-nitrosourea; Anticancer

INTRODUCTION

Bladder cancer (BC) is the fifth most common cancer in the USA with an expected 70,530 individuals diagnosed and 14,680 deaths in 2011 (1,2). Approximately 50–70% of all bladder tumors are non-muscle invasive, stage Tis (carcinoma *in situ*), Ta (papillary) and/or T1 tumors confined to the mucosa or submucosa (2,3). Typically, treatment for high-risk, non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) is transurethral resection (TUR) and adjuvant therapy with Bacillus Calmette–Guerin (BCG) (4).

BCG, an attenuated strain of *Mycobacterium bovis*, aims to reduce recurrence or to eradicate Tis when it is not possible to resect completely (5) and its action limiting NMIBC progression is disputable (4). Although the exact mechanism of BCG antitumor effect remains unknown, it is based on a complex immune response characterized by marked infiltration of the bladder wall by immunocompetent cells along with the secretion of cytokines in the urine as part of the local immune response (6,7).

Paralleling BCG better understanding and optimization, studies have evaluated the Staphylococcal enterotoxin B (SEB) as a potential candidate to intravesical therapy of NMIBC. SEB, produced by *Staphylococcus aureus*, through a unique biological effect crosslinks variable parts of the T-cell antigen receptor with MHC class II molecules on accessory or antigen-presenting target cells and do not require processing or proteolysis (8).

In this context, SEB seems interesting as a candidate for an intravesical immunomodulatory approach to bladder cancer, showing no local or systemic toxicity (9). Thus, the aims of the hereby study were to compare and to characterize the anti-angiogenic effects of the BCG, SEB and BCG plus SEB treatments in the NMIBC of rats induced experimentally.

METHODS AND MATERIALS

Experimental Proceedings

Seventy-five female Fisher 344 rats, all 7 weeks old, were obtained from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB) at University of Campinas (UNICAMP).

Animals were anesthetized with 10% ketamine (60mg/kg, i.m.; Fort Dodge, Iowa, USA), and 2% xylazine (5mg/kg i.m.; König, São Paulo, Brasil) and remained sedated for approximately 45 minutes after bladder catheterization via a 20-gauge angiocatheter to prevent spontaneous micturition.

Cancer induction and control (from weeks 0 to 6 – 4 doses):

Sixty rats received 1.5 mg/kg dose of n-methyl-n-nitrosourea (MNU) dissolved in 0.30 ml of sodium citrate 1M pH 6.0 (10) and fifteen animals received 0.30 ml of 0.9% physiological saline (Control group - **CT**) - all every other week, on weeks 0,2,4,6.

Treatment (from weeks 8 to 13 – 6 doses):

Rats were divided into 5 groups (15 animals pergroup): **MNU** and **CT** groups received 0.30 ml of 0.9% physiological saline; **BCG** group received 10^6 CFU dose of BCG (2×10^6 CFU/mg, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil); **SEB** group received 10 µg/ml dose of SEB (Sigma, St. Louis, MO, EUA)(9); and **BCG-SEB** group received simultaneous BCG and SEB treatments - all dissolved in 0.30 ml of 0.9% physiological saline, weekly for 6 weeks.

After 15 weeks of protocol (cancer induction, control and treatment), all animals were sacrificed and urinary bladder was collected, processed for histopathological, immunological and Western Blotting analysis. This study was done according to the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA, approved by protocol no. 1242-1).

Histopathological Analysis

The urinary bladders were randomly collected from 10 animals in each group, fixed by immersion in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, cut into 5- μ m thick and stained with hematoxylin-eosin. The neoplastic lesions were diagnosed using the nomenclature proposed by the World Health Organization/International Society of Urological Pathology consensus classification (3).

Immunodetection of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Endostatin, Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9), Insulin Like Growth Factor Receptor-1 (IGFR-1) and Ki-67

The same urinary bladders used for histopathological analysis (10 per group), were cut 6 μ m thick sections for immunological analysis and incubated at room temperature in 0.3% H₂O₂ to block endogenous peroxidase and in blocking solution for nonspecific binding.

Primary mouse antibody VG-1 (sc-53462; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for VEGF; mouse antibody 4i37 (ab64569; abcam, Cambridge, MA, UK) for endostatin; mouse antibody IM37 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) for MMP-9;

rabbitantibody N-20 (sc-720; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) for IGFR-1 and rabbit antibody AB9260 (Millipore, Temecula, CA, USA) for Ki-67 were diluted in 1% BSA (1:50; 1:100; 1:200; 1:200 and 1:75, respectively) and applied to the sections overnight at 4°C. Bound antibody was detected with an Envision HRP kit (Dako Cytomation Inc., USA). Secondary labeled polymer (Envision HRP kit) was applied for 40 min at room temperature. Peroxidase activity was detected using a diaminobenzidine chromogen mixture (Envision HRP kit). Sections were lightly counterstained with Harris' hematoxylin and photographed with a *Zeiss Axiophot* (Zeiss, Hamburg, Germany) photomicroscope.

To evaluate the intensity of antigen immunoreactivity, the percentage of positive-staining urothelial cells was examined in ten fields at random per animal for each antibody under high magnification (400x). The staining intensity was graded on a scale of 0–3, and expressed as 0 (no immunoreactivity), 0% positive urothelial cells; 1(weak immunoreactivity), 1–35% positive urothelial cells; 2 (moderate immunoreactivity), 36–70% positive urothelial cells; 3 (intense immunoreactivity), > 70% positive urothelial cells (11).

Determination of the Apoptotic and Proliferative Indexes

The urinary bladders, the same used for histopathological analysis, were processed for DNA fragmentation - TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) by means of a fluorescein apoptosis detection system (Promega, Madison, WI, USA). In addition, Feulgen's reaction was utilized for apoptotic index determination. The sections were subjected to hydrolysis with 4N HCl for 75 min and then treated with Schiff's reagent for 40 min.

Ten microscopic fields were taken at random per animal, resulting in 100 fields per group for Feulgen and another 100 fields per group for ki-67 reactions, using a Zeiss Axiophot (Zeiss, Hamburg, Germany) photomicroscope with a $\times 100$ objective. Apoptotic index was determined by dividing the number of apoptotic nuclei, identified by pyknosis and/or nuclear fragmentation (11) by the total number of nuclei found in the microscope field. Proliferative index was determined by dividing the number of positive Ki-67 immunoreaction nuclei by the total number of nuclei found in the microscope field.

Western Blotting Analysis

The urinary bladders were randomly collected from 5 animals in each group, frozen in liquid nitrogen and homogenized in 50 μ l/mg of lysis buffer. The tissue homogenates were centrifuged and a sample of each extract was used for protein quantification by Bradford's method. Aliquots containing 50 μ g of protein were separated under reducing conditions by SDS-PAGE, 12%.

After electrophoresis, the proteins were transferred to Hybond-ECL nitrocellulose membranes (Amersham, Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL, USA). The membranes were blocked with TBS-T and incubated at 4°C overnight with the same primary antibodies utilized in the immunoreaction for VEGF, endostatin, MMP-9 and IGFR-1 diluted in 1% BSA (1:500; 1:1,000; 1:1,500 and 1:1,500, respectively).

The membranes were then incubated for 2 h with rabbit or mouse secondary HRP-conjugated antibodies (diluted 1:3,000 in 1% BSA; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Peroxidase activity was detected by incubation with a diaminobenzidine chromogen (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). The intensities of

immunoreactivity bands of each protein were quantified using scanner and image analysis AxioVision 4 (Zeiss, Munique, Germany). The results were expressed as means of band ratio by β -actin band intensity as an endogenous control.

Statistical Analysis

The results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation. Average data for proliferative and apoptotic indexes, and Western Blotting were compared among groups by analysis of variance and Tukey multiple range test, with the level of significance set at 5%.

RESULTS

Histopathological Analysis

The more frequent alterations were papillary carcinoma (pTa) (40.0%) and high-grade intraepithelial neoplasia (carcinoma *in situ*) (20.0%) in MNU group; papillary hyperplasia (60.0%) and carcinoma *in situ* (20.0%) in BCG group; papillary hyperplasia (60.0%) and flat hyperplasia (20.0%) in SEB group and papillary hyperplasia (30.0%), flat hyperplasia (20.0%) and normal tissue (50.0%) in the BCG-SEB group (Table 1). No significant toxicity was observed.

Proliferative and Apoptotic Indexes

The apoptosis and cellular proliferation indexes were increased in all treatment groups. The proliferative response was significantly greater in MNU group than those found for BCG, SEB, BCG-SEB and Control groups, which showed decreasing values for

this variable (Figures 1a, 1c, 1e, 1g, 1i and Table 2). The BCG-SEB group showed the lower proliferative index when related to the other treatment groups.

The apoptotic index significantly increased in the MNU, BCG and SEB groups in relation to BCG-SEB and Control groups (Figures 1b, 1d, 1f, 1h, 1j and Table 2). Nevertheless, this index was similar to the normal status in the BCG-SEB group.

Immunodetection and Western Blotting Analysis of VEGF, Endostatin, MMP-9 and IGFR-1

The highest VEGF, MMP-9 and IGFR-1 proteins levels were found in the MNU group when related to the other experimental groups, showing intense immunoreactivity in the urothelium and blood vessels for VEGF (Figures 2a, 2e, 2i, 2m, 2q, 3 and Table 3) in the urothelium for MMP-9 (Figures 2b, 2f, 2j, 2n, 2r, 3 and Table 3) and in the stroma for IGFR-1 (Figures 2d, 2h, 2l, 2p, 2t, 3 and Table 3).

However, these proteins were significantly higher in the BCG and SEB groups than in the BCG-SEB and Control groups, which showed weak immunoreactivities (Figures 2, 3 and Table 3).

In contrast, endostatin protein level was significantly higher in the Control and BCG-SEB groups when related to the other experimental groups, exhibiting intense and moderate immunoreactivities, respectively, in the urothelium and blood vessels (Figures 2c, 2g, 2k, 2o, 2s, 3 and Table 3). Also, this level was significantly higher in the SEB and BCG groups than in the MNU group, which showed weak immunoreactivity (Figures 2g, 2k, 2o, 3 and Table 3).

DISCUSSION

Considering the limitations of the adjuvant gold standard therapy of NMIBC (12), in addition to the seeking of BCG better understanding and improvement, the search for new agents for intravesical therapy continues.

An attractive mechanism targeting the regulatory cascade of cytokines based on immune T cells can be obtained through the association of BCG with superantigens such as SEB in search of complementary effects and NMIBC treatment progress.

Possible mechanisms of action for the advantageous association of BCG-SEB can evolve the activation of CD4+ and CD8+ T cells in different proportions, as well as diverse quantitative and qualitative cytokine induction added to exclusive anticancer properties between both treatments.

In this scenario, no dose dependency of SEB action (13), the efficacy of three-fold decrease in BCG dose (14), and the immune suppression described after high BCG doses through Th2 response, support the hypothesis of a Gaussian dose–response curve for superantigen immunotherapies (15).

Potential mechanisms contributing to anti-tumor and anti-angiogenic effects on urothelial carcinoma cells include BCG induced susceptibility to an apoptotic insult (16), added to induction of T-lymphocyte predominant inflammatory infiltrate and cytokines in the bladder wall and urine (17); tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interferon-gamma (IFN- γ), and interferon-inducible protein-10 (IP-10), the latter two sharing common regulatory pathways (18).

SEB acts as a superantigen, the most potent T-cell mitogen known, added to a strong secretion of IL-2, INF- γ and TNF- α released from the SEB-stimulated peripheral

blood mononuclear cells (PBMC), which are able to kill urothelial carcinoma cells by inducing apoptosis through a pronounced specific Fas-ligand expression (9, 13).

The very high molecular weight of SEB (30 kDa) hinders local diffusion into the bladder wall, preventing systemic toxicity (8) and neither major nor minor side effects (including hematuria) were seen in this and in previous study (9). Otherwise, *M. bovis* (BCG) is an obligate intracellular pathogen and its infection mechanism of internalization is the same that occurs in intravesical immunotherapy (5-7), suggesting that SEB presents similar but not identical mechanisms against urothelial cancer.

Intriguingly, the present study indicated that the associated BCG-SEB treatment was more effective in restoring apoptosis, cellular proliferation and angiogenic balances as well as cancer state than BCG or SEB isolated treatment. VEGF, MMP-9, IGFR-1, ki-67 and apoptosis decreased while endostatin increased in the urothelial tumor exposed to treatments.

Like all solid tumors, NMIBCs require angiogenesis to support their active growth and progression and based on the presented results, it is likely that the inhibition of different steps of angiogenesis, induction of apoptosis and regulation of cell proliferation, MMPs and IGFR-1 may have synergistic and/or additive effects on the activity of BCG-SEB intravesical immunotherapy.

VEGF had been used as a diagnostic indicator in BC and is a principal regulator of angiogenesis, which induces proliferation and differentiation of endothelial cells. VEGF level also has an impact on prognosis and mortality rate of BC, and its overexpression has been shown in high stage bladder tumor (19). In accordance with our findings, Pavlovich et al. (2000) verified that post-BCG treatment urine became progressively inhibitory to

endothelial cells during weekly treatment courses; and concluded that intravesical BCG induced a cytokine-rich urinary microenvironment that is inhibitory to endothelial cells (17).

The angiogenic phenotype is thought to depend on a balance of inhibitors and stimulators; several endogenous inhibitors of angiogenesis play an important role in suppressing tumor growth and proliferation through apoptosis in endothelial and tumor cells. Endostatin is thus a potent anti-tumor agent, having its effects by inhibiting vascularity and blood supplying in the urothelial cancer (20, 21).

In addition, a number of MMPs have been shown to promote angiogenesis and, as a consequence, tumor growth; high tissue expression levels of MMP-2 and MMP-9 were significant predictors of prognosis in urothelial cancer (20).

Bergers et al. (2000) showed that the expression of MMP-9 was correlated with a concomitant increase in VEGF/VEGF receptor complex (22). Also, Hashimoto et al. (2002) demonstrated that connective tissue growth factor (CTGF) binds to VEGF and prevents the interaction of VEGF with its receptor, and concluded that MMP(s) can process CTGF and mediate the release of VEGF, thus representing another mechanism of how MMPs can influence angiogenesis (23).

The MMPs have also been implicated in the processing of active insulin-like growth factors (IGFs), which in turn may play a role in enhancing tumor growth (24). The IGFR-1 plays an essential role in malignant transformation by promoting cell growth and protecting cancer cells from apoptosis (24). Aberrant IGFR-1 signaling is implicated in several types of tumors, including carcinomas of the urinary bladder; invasive bladder cancer showed intense IGFR-1 expression compared to nonmalignant controls (25,26). Physiologically,

IGF-1 is sequestered by insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs), which serve to prevent the interaction of IGFs with their receptors. MMPs play a role in the liberation of active IGF from the binding protein (26).

To our knowledge, this is the first study exploring at the same time VEGF, endostatin, MMP-9, IGFR-1, ki-67 and apoptosis in an integrated manner, important pathways in bladder carcinogenesis, previously showed to be related to urothelial cancer relapse and stage progression (21, 27-30).

In this complex scenario, the presented results foreshadow a potential evolution of the treatment of urothelial carcinoma: 1 - greater antitumor efficacy with introduction of superantigen (SEB); 2 - less potential for adverse effects of SEB compared to BCG; 3 - direct relationship among BCG-SEB treatment response and angiogenesis (VEGF, endostatin, MMP-9), proliferation (Ki-67, IGF-1) and apoptosis. A clinical phase I evaluation appears warranted to confirm the preclinical findings.

REFERENCES

- 1- National Cancer Institute, Available at http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/, based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER website 2010.
- 2- Zhang Y, Zhu C, Curado MP, et al. Changing patterns of bladder cancer in the USA: evidence of heterogeneous disease. *BJU Int.* 2011 May 18. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10283.x
- 3- Montironi R, Lopez-Beltran A. The 2004 WHO classification of bladder tumors: a

summary and commentary. *Int J Surg Pathol*. 2005; 13:143-153.

4- Shelley MD, Kynaston H, Court J, et al. A systematic review of intravesical bacillus Calmette-Guerin plus transurethral resection versus transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer. *BJU Int*. 2001; 88:209–16.

5- Zlotta AR, Van Vooren JP, Denis O, et al. What are the immunologically active components of bacille Calmette-Gue´rin in therapy of superficial bladder cancer? *Int J Cancer*. 2000; 87:844–52.

6- Ludwig AT, Moore JM, Luo Y, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: A novel mechanism for *Bacillus Calmette-Guerin*-induced antitumor activity. *Cancer Res*. 2004; 64:3386 –90.

7- Simons MP, O'Donnell MA, Griffith TS. Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. *Urol Oncol*. 2008; 26:341-5.

8- Petersson K, Forsberg G, Walse B. Interplay between superantigens and immunoreceptors. *Scand J Immunol*. 2004; 59:345-355.

9- Perabo FG, Willert PL, Wirger A, et al. Preclinical Evaluation of Superantigen (Staphylococcal Enterotoxin B) in the Intravesical Immunotherapy of Superficial Bladder Cancer. *Int J Cancer*. 2005; 115:591-598.

10- Reis LO, Favaro WJ, Ferreira U, et al. Evolution on experimental animal model for upper urothelium carcinogenesis. *World J Urol*. 2010; 28:499-505.

- 11- Tomas D, Krušlin B. The potential value of (Myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. *Prostate*. 2004; 61:324-331.
- 12- Malmström 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-Guérin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*. 2009; 56:247-56.
- 13- Perabo FG, Willert PL, Wirger A, et al. Superantigen-Activated Mononuclear Cells Induce Apoptosis In Transitional Cell Carcinoma. *Anticancer Res*. 2005; 25:3565-73.
- 14- Ojea A, Nogueira JL, Solsona E, et al. A multicentre, randomized prospective trial comparing three intravesical adjuvant therapies for intermediate-risk superficial bladder cancer: low-dose bacillus Calmette-Guerin (27 mg) versus very low-dose bacillus Calmette-Guerin (13.5 mg) versus mitomycin C. *Eur Urol*. 2007; 52:1398–406.
- 15- Power CA, Wei G, Bretscher PA. Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of the immune response independently of whether immunization is administered by the intravenous, subcutaneous, or intradermal route. *Infect Immun*. 1998; 66:5743-50.
- 16- DiPaola RS, Lattime EC. Bacillus Calmette-Guerin Mechanism of Action: The Role of Immunity, Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *J Urol*. 2007; 178:1840-1841.
- 17- Pavlovich CP, Kräling BM, Stewart RJ, et al. BCG-induced urinary cytokines inhibit microvascular endothelial cell proliferation. *J Urol*. 2000; 163:2014-2021.

- 18- Poppas DP, Pavlovich CP, Folkman J, et al. Intravesical bacille Calmette-Guérin induces the antiangiogenic chemokine interferon-inducible protein 10. *Urology*. 1998; 52:268-75.
- 19- Bernardini S, Fauconnet S, Chabannes E, et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor as a prognostic factor in bladder cancer. *J Urol*. 2001; 166:1275-9.
- 20- Inoue K, Kamada M, Slaton JW. The prognostic value of angiogenesis and metastasis related genes for progression of transitional cell carcinoma of renal pelvis and ureter. *Clin Cancer Res*. 2002; 8:1863-1870.
- 21- Guan KP, Ye HY, Yan Z, et al. Serum levels of endostatin and matrix metalloproteinase-9 associated with high stage and grade primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*. 2003; 61:719–723.
- 22- Bergers G, Brekken R, McMahon G, et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nature Cell Biol*. 2000; 2:737–744.
- 23- Hashimoto G, Inoki I, Fujii Y, et al. Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165. *J Biol Chem*. 2002; 277:36288-95.
- 24- Fowlkes JL, Serra DM, Nagase H, et al. MMPs are IGFBP-degrading proteinases: implications for cell proliferation and tissue growth. *Ann NY Acad Sci*. 1999; 878:696–699.

- 25- Iwamura M, Ishibe M, Sluss PM, et al. Characterization of insulin-like growth factor I binding sites in human bladder cancer cell lines. *Urol Res.* 1993; 21:27–32.
- 26- Metalli D, Lovat F, Tripodi F, et al. The insulin-like growth factor receptor 1 promotes motility and invasion of bladder cancer cells through Akt- and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of paxillin. *Am J Pathol.* 2010; 176:2997-3006.
- 27- Asakura T, Takano Y, Iki M, et al. Prognostic value of Ki-67 for recurrence and progression of superficial bladder cancer. *J Urol.* 1997; 158:385-8.
- 28- Yang CC, Chu KC, Yeh WM. The expression of vascular endothelial growth factor in transitional cell carcinoma of urinary bladder is correlated with cancer progression. *Urol Oncol.* 2004; 22:1-6.
- 29- Crew JP, O'Brien T, Bradburn M, et al. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res.* 1997; 57:5281-5.
- 30- Rochester MA, Patel N, Turney BW, et al. The type 1 insulin like growth factor receptor is over-expressed in bladder cancer. *BJU Int.* 2007; 100:1396–1401.

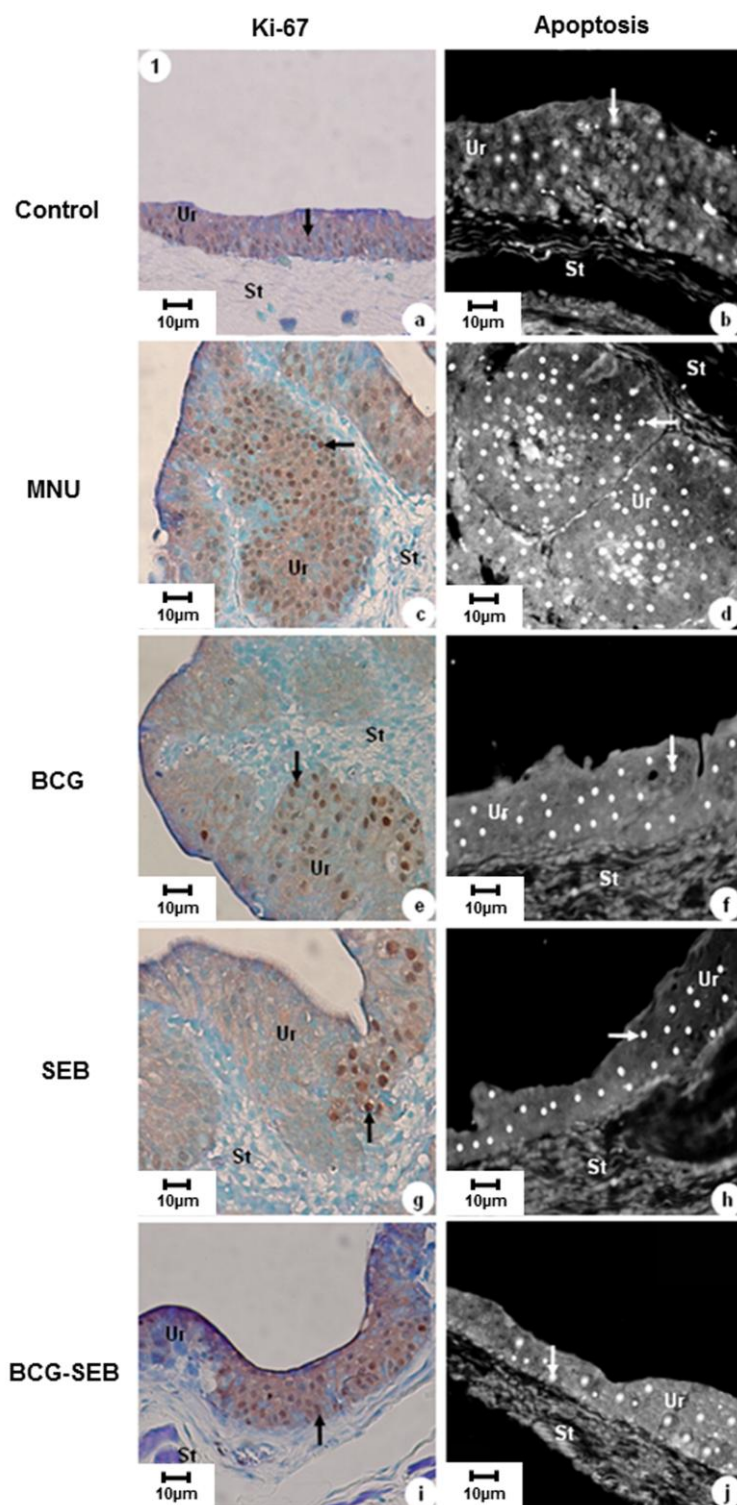


Figure 1: Immunolabelled Ki-67 and Apoptosis of the urinary bladder from Control (a, b), MNU (c, d), BCG (e, f), SEB (g, h) and BCG-SEB (i, j) groups. (a), (c), (e), (g) and (i) Ki-67 immunoreactivity (arrows) in the urothelial cells. (b), (d), (f), (h) and (j) DNA fragmentation (arrows) in the urothelial cells. a – j: Ur – urothelium and St – stroma.

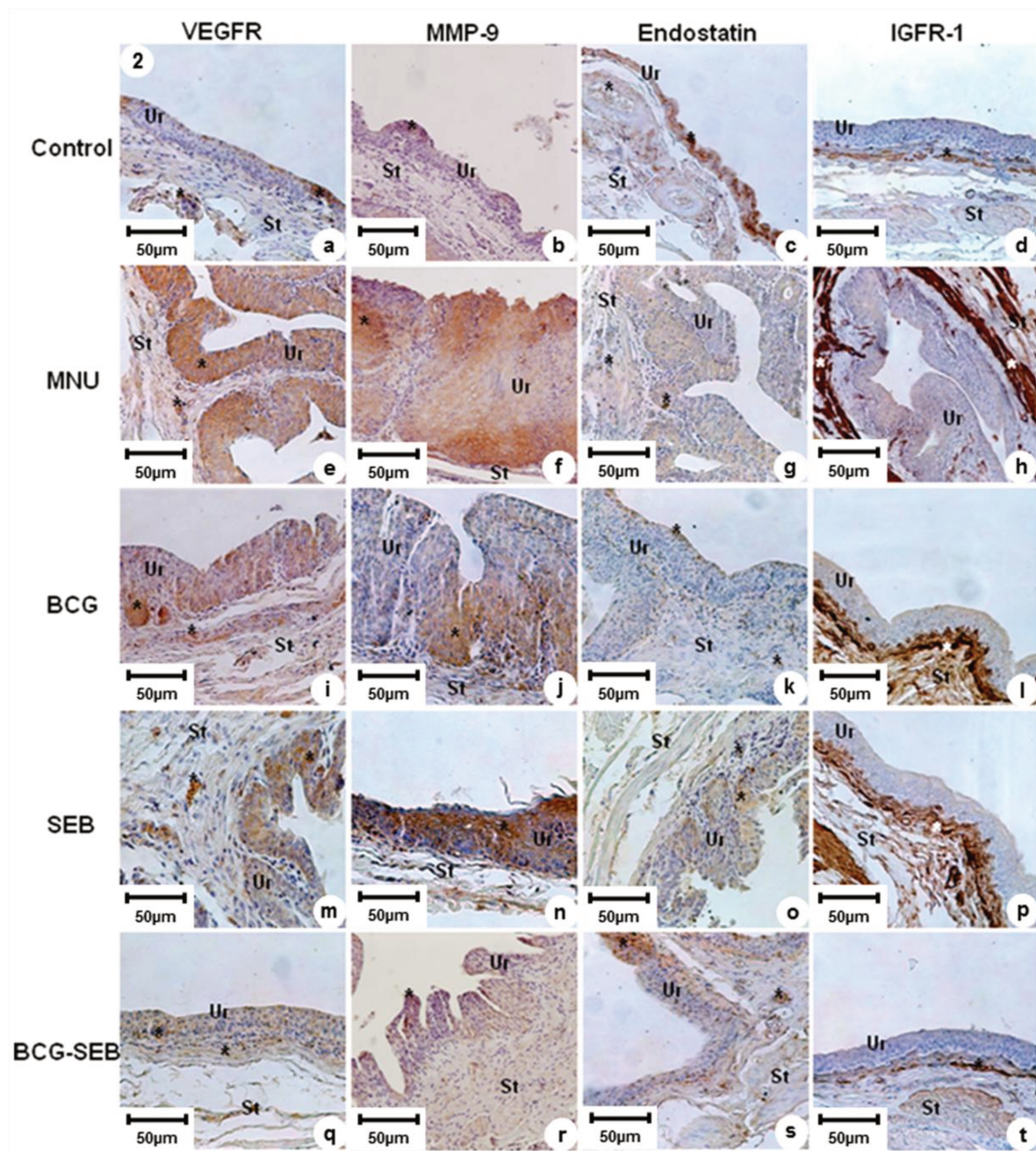


Figure 2: Immunolabelled of the urinary bladder from the Control (a, b, c, d), MNU (e, f, g, h), BCG (i, j, k, l), SEB (m, n, o, p) and BCG-SEB (q, r, s, t) groups. (a), (e), (i), (m) and (q) VEGF immunoreactivity (asterisks) in urothelium and blood vessels. (b), (f), (j), (n) and (r) MMP-9 immunoreactivity (asterisks) in urothelium. (c), (g), (k), (o) and (s) Endostatin immunoreactivity (asterisks) in urothelium and blood vessels. (d), (h), (l), (p) and (t) IGFR-1 immunoreactivity (asterisks) in stroma. a – t: Ur – urothelium and St – stroma.

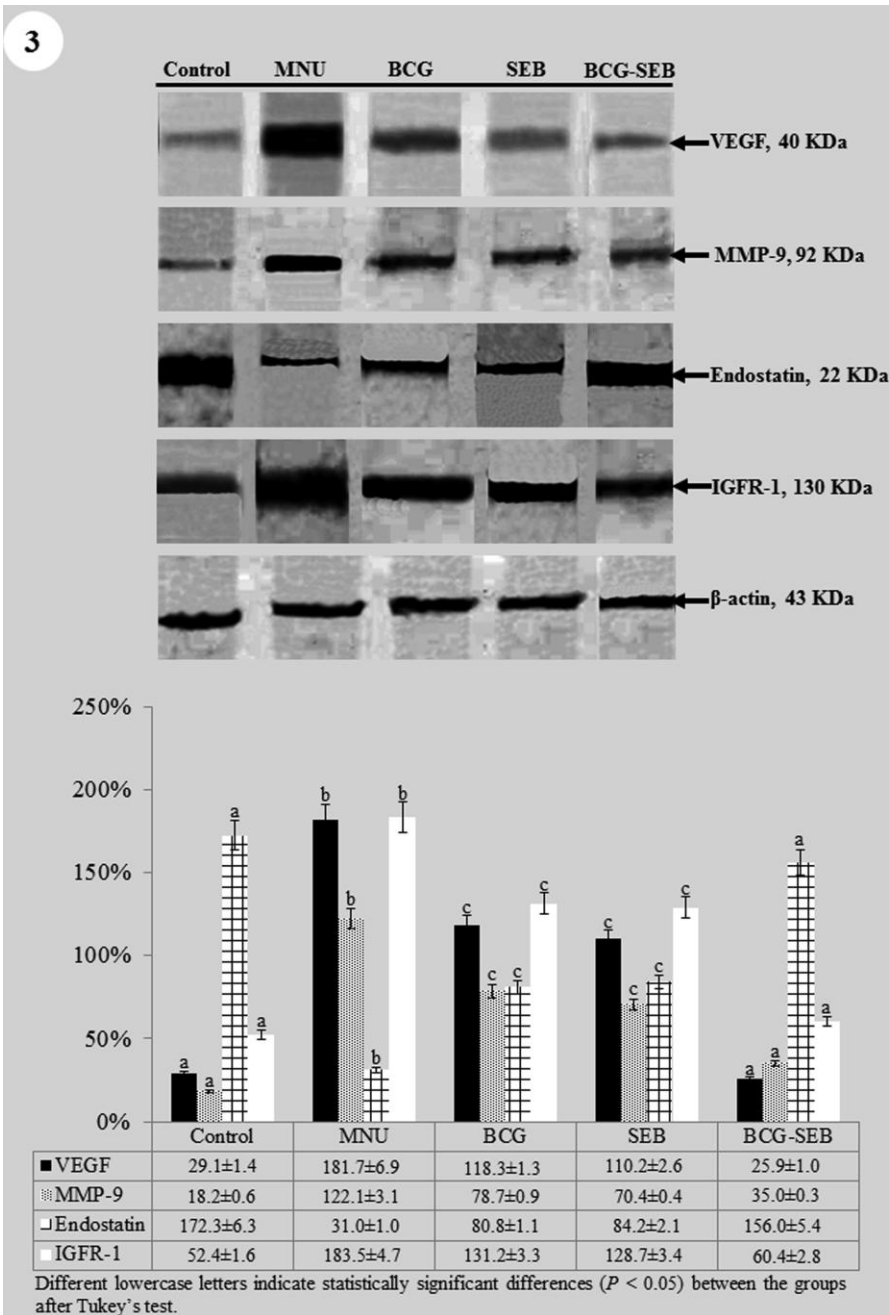


Figure 3: Representative Western Blotting and semiquantitative determination for VEGF, MMP-9, Endostatin and IGFR-1 proteins of the urinary bladder extracts in the five experimental groups. The protein levels were identified in the blots. β-Actin was used as the endogenous control. Data were expressed as the mean ± standard deviation (n=5) Table 1: Percentage of histopathological alterations of the urinary bladder of rats in the different experimental groups.

Table 1: Percentage of histopathological alterations of the urinary bladder of rats in the different experimental groups

Histopathology	Groups			
	MNU	BCG	SEB	BCG-SEB
	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)
Flat Hyperplasia	-	-	02 (20.0%)	02 (20.0%)
Papillary Hyperplasia	02 (20.0%)	06 (60.0%)	06 (60.0%)	03 (30.0%)
Low-grade IN	01 (10.0%)	01 (10.0%)	-	-
High-grade IN - Carcinoma <i>in situ</i> (pTis)	02 (20.0%)	02 (20.0%)	-	-
Papillary Carcinoma (pTa)	04 (40.0%)	-	-	-
Squamous Metaplasia	01 (10.0%)	01 (10.0%)	01 (10.0%)	-
Normal	-	-	01 (10.0%)	05 (50.0%)

IN - Intraepithelial neoplasia

Table 2: Percentage of proliferative and apoptotic index of the urinary bladder of rats in the different experimental groups

Index	Groups				
	Control	MNU	BCG	SEB	BCG-SEB
	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)
Proliferative	1.7% a	30.8% b	15.7% c	8.7% d	3.1% a
Apoptotic	1.4% a	12.8% b	7.3% c	5.5% c	2.7% a

Different lowercase letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$) between the groups after Tukey's test.

Table 3: Immunolabelled antigens intensity of the urinary bladder of rats in the different experimental groups

Antigens	Groups				
	Control	MNU	BCG	SEB	BCG-SEB
	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)	(n= 10)
VEGF	1 (14.0%)	3 (92.8%)	2 (55.7%)	2 (42.3%)	1 (15.1%)
MMP-9	1 (22.7%)	3 (91.0%)	2 (46.0%)	2 (41.4%)	1 (24.7%)
Endostatin	3 (89.2%)	1 (3.5%)	1 (10.0%)	1 (15.0%)	2 (38.9%)
IGFR-1	1 (23.0%)	3 (88.9%)	2 (63.6%)	2 (55.0%)	1 (27.5%)

0, no immunoreactivity; 1, weak immunoreactivity (1% – 35% positive urothelial stromal cells); 2, moderate immunoreactivity (36% – 70% positive urothelial cells); 3, intense immunoreactivity (> 70% positive urothelial cells).

5. Discussão

O mecanismo de ação do BCG ainda não foi claramente estabelecido, no entanto, a infiltração acentuada da parede da bexiga por células imunocompetentes juntamente com a secreção de citocinas na urina fazem parte da cascata de resposta imune local com efeitos antitumorais (6,76).

Como processo inicial, a cepa viva do BCG se liga à fibronectina, sendo internalizada via integrinas (77,78). Ambas as células uroteliais, malignas e normais submetem-se a este processo. É interessante notar que o *M. bovis* em si é um patógeno intracelular obrigatório e o mecanismo de infecção é o mesmo de internalização que ocorre na imunoterapia intravesical. Uma vez internalizado, as células uroteliais respondem com uma cascata inflamatória, incluindo a liberação de citocinas (24).

A resposta celular inicialmente envolve neutrófilos (que constituem > 75% do infiltrado celular precoce), e é seguida de predomínio de células mononucleares (79, 80).

O infiltrado de células mononucleares na parede da bexiga consiste principalmente de células T, implicadas na resposta a longo prazo, com predominância de células CD4 + (T auxiliaadoras) em comparação com células

CD8 + (T citotóxicas). A resposta mediada por células T auxiliaadoras está associada ao aumento de IL-2, IL-8, TNF e IFN- γ , que têm sido associados à melhor evolução clínica (81-83).

A maioria dos neutrófilos urinários em pacientes submetidos a tratamento com BCG intravesical, são potencializados por INF e expressam *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), um membro da família de moléculas TNF, conhecidas por terem capacidade de indução de apoptose, expressas tanto como proteína de membrana como na forma solúvel biologicamente ativa (84,85).

Exposição repetida ao BCG reforça respostas tanto específica (células T) quanto inata (neutrófilos) para o aumento da produção de TRAIL, resultando em um efeito local antitumoral robusto e sustentado (81-83).

TRAIL induz apoptose em células tumorais, mas não em células e tecidos normais (86). Em pacientes com câncer urotelial recebendo tratamento de BCG, níveis elevados de TRAIL na urina têm se correlacionado com melhor resposta clínica (definida por > 12 meses livre de tumor) (87).

BCG intravesical induz TNF- α (82), IFN- γ (88) e proteína-10 interferon-induzida (IP-10) na urina (89). Estas citocinas têm atividades antitumoral e antiangiogênica (89-91) através de vias comuns (92).

Neste contexto, experimentos sugerem que a resposta a tratamentos sucessivos com BCG cria um ambiente de citocinas urinárias que é progressivamente inibitório para as células endoteliais humanas. Este efeito aumenta ao longo de tratamentos semanais, de modo que após a indução ou

durante o tratamento de manutenção com BCG todas as amostras de urina são inibitórias para células endoteliais microvasculares (93-97). Mediada por citocinas a inibição angiogênica pode explicar em parte a atividade antitumoral do BCG.

No cenário atual, apesar de a imunoterapia com BCG representar o padrão ouro do tratamento adjuvante do CBNMI (98-99), a melhor dose, a programação das instilações, e a cepa ideal ainda permanecem obscuros e apenas cerca de 31% dos pacientes com indicação de adjuvância recebem terapia intravesical (100), evidenciando grande potencial de otimização do tratamento do câncer de bexiga.

Um dos principais objetivos da imunoterapia é gerar resposta tumor específica que contribui para sua erradicação e subsequente vigilância. O carcinoma urotelial tem altas taxas de recorrência e progressão (101), sugerindo deficiente capacidade de apresentação de seus antígenos próprios às células T e consequente resistência ao sistema imunológico natural.

Esforços para aumentar a eficácia do tratamento do carcinoma urotelial incluem várias tentativas promissoras de introduzir novos agentes para a terapia intravesical, combinados com agentes estabelecidos, ou mesmo modificando esquemas atuais. Futuros potenciais meios para otimizar a eficácia do BCG podem ser vislumbrados com base em avanços no conhecimento de seus mecanismos de ação. Um mecanismo atrativo visa melhorar a cascata de citocinas reguladoras da via imune fundamentada em linfócitos T que pode ser obtida através da associação de BCG com superantígenos como o EBS,

conjuntamente a esforços para minorar seus efeitos colaterais.

Considerando os elevados índices de intolerância ao BCG, toxicidade sistêmica pode ser evitada pelo fato de que a ação da EBS não é dependente de sua penetração e internalização no urotélio como ocorre com o BCG. O peso molecular destes superantígenos é elevado (cerca de 30 kDa), de forma que nenhuma difusão para parede da bexiga é observada (13), em concordância com os dados apresentados neste estudo em que não houve toxicidade local ou sistêmica à instilação intravesical de EBS.

Concentrações inferiores a 0,1pg/ml de SAg são suficientes para estimular os linfócitos T (102). EBS formam um complexo com as moléculas de histocompatibilidade maior (MHC) classe II em células apresentadoras de antígenos, e ligam-se sequencialmente ao receptor da célula T (RCT), através de sua cadeia variável β (103,104).

EBS ativa todas as células T com cadeia β em sua região variável ($V\beta$)-RCT, independentemente de sua real especificidade com o antígeno. Como consequência, até 25% do total de células T periféricas tornam-se ativadas (105). Ambos os linfócitos CD4 + e CD8 + T proliferam em resposta a este SAg.

O aumento de CD8+ tem importante papel antitumoral por exercer intenso efeito citotóxico. CD4+ desempenham um papel importante na conservação de células de memória e nas funções de atividade antitumoral como células T auxiliaadoras.

Além disso, a intensa ativação de células T é acompanhada por aumento

da produção de citocinas como IFN- γ , IL2 e TNF- α (12). A hiperativação de células T normalmente ocorre dentro de 48 h após a exposição ao SAg. As células T têm um papel fundamental na eliminação células hospedeiras que sofreram transformação maligna (106).

Adicionalmente, granulócitos e monócitos podem ser ativados para funcionar como células acessórias para ativação de células T e uma infiltração secundária da parede da bexiga também ocorre (107). Células NK regulam a secreção de IL-4, IFN- γ e TNF- α (108), mediando lesão das células endoteliais através da indução de células LAK (*leukocyte-activated killer*) (109,110).

O fenótipo angiogênico provém de um equilíbrio entre inibidores e estimuladores da proliferação de células endoteliais, migração destas células e formação capilar (111). A inibição da neovascularização apresenta um possível mecanismo de ação para as imunoterapias.

Aspectos tais como a densidade e padrão vascular, bem como a expressão de fatores angiogênicos têm sido correlacionados com a progressão do carcinoma urotelial (112-114).

O CBNMI apresenta morfologia papilar com ramificações vasculares integradas expressando diversos fatores angiogênicos, dentre os quais VEGF. Níveis elevados de VEGF correlacionam-se com recorrência precoce e progressão dos CBNMI (94,115,116).

VEGF é o regulador mais importante da angiogênese fisiológica, responsável por recrutar as células no desenvolvimento da vasculatura (117);

induzir metaloproteinases (118) e secretar fatores de crescimento adicionais do endotélio em desenvolvimento, dentre os quais IGF-1 (119).

Além disso, o aumento da expressão de MMPs, especialmente MMP-9, é preditor independente de sobrevida no câncer de bexiga (46).

Pesquisando a literatura, não encontramos qualquer estudo examinando a correlação entre a resposta à imunoterapia intravesical do tumor urotelial e VEGF, MMP-9, IGFR-1, endostatina e ki-67; todos considerados fatores prognósticos no câncer de bexiga em estudos anteriores (46,60,94,120).

VEGF, MMP-9 e endostatina desempenham papéis importantes na invasão e diferenciação do carcinoma da bexiga e apesar de o papel de IGFR-1 ser menos conhecido neste contexto, este atua no desenvolvimento de tumores em uma variedade de tecidos epiteliais. A ligação entre IGFR-1 e câncer de bexiga é biologicamente plausível, IGF-1 induz proliferação celular e bloqueia apoptose em linhagens celulares de câncer de bexiga humano (121); maior circulação de IGF-1 está associada a risco aumentado de tumor de bexiga em humanos (122) e IGFR-1 está aumentado em tumores uroteliais invasivos (123).

Portanto, quantificar suas expressões pode ser útil na medida em que a determinação de preditores do comportamento do tumor (101) e da resposta ao tratamento é fundamental no progresso do manejo do câncer urotelial.

No presente estudo, a eficácia da imunoterapia intravesical correlacionou-se com a expressão dos inibidores e estimuladores da angiogênese e com as atividades proliferativas e apoptóticas celulares. Este estudo, pela primeira vez,

propõe análise destes fenômenos de maneira integrada e abre caminho para a sua aplicação clínica. No futuro, a dinâmica de expressão das moléculas estudadas frente ao tratamento pode determinar a evolução clínica e a resposta ao tratamento de pacientes com carcinoma da bexiga, além de serem possíveis alvos específicos no desenvolvimento de novos tratamentos.

Os efeitos antitumorais de EBS e BCG ainda necessitam de maiores esclarecimentos, e neste contexto, embora ambos apresentem mecanismos de ação semelhantes, fundamentados em resposta imune humoral e celular, as múltiplas vias compreendidas podem apresentar eficácias diferentes nos diferentes tratamentos, culminando com efeito final sinérgico e até mesmo potencializado na associação dos tratamentos. Possíveis mecanismos de ação da associação entre EBS e BCG podem envolver a ativação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ em proporções diferentes, ou ainda diferenças quantitativas e/ou qualitativas no estímulo a citocinas, além da possibilidade de vias de ação anticâncer exclusivas nos diferentes tratamentos.

A indução de apoptose não dependente da dose de EBS foi demonstrada em experimentos envolvendo câncer de bexiga. EBS induz maciça secreção de citocinas (IL-2, IFN- γ e TNF- α) tempo dependente (entre 1 e 7 horas de exposição) mas não dose dependente, com eficácia demonstrada em doses tão baixas como 0,01 $\mu\text{g/ml}$ (12).

Da mesma forma, há evidências claras de que uma redução em até três vezes na dose de BCG intravesical é tão eficaz quanto a dose completa. Em

contraste, um sexto da dose é significativamente menos eficaz do que um terço, apesar de nível de toxicidade semelhante (124).

Elevadas doses de BCG, ao contrário, suprimem a resposta imune, sugerindo curva dose-resposta de padrão Gaussiano para imunoterapias envolvendo superantígenos. Grandes quantidades de BCG estão relacionados a resposta mediada por T auxiliaadoras tipo 2, associadas a produção de IL-6 e IL-10, que afetam negativamente a eficácia da resposta mediada por T auxiliaadoras tipo 1, responsáveis pela ação anti-tumoral (125).

É importante ressaltar que apesar de os resultados obtidos prenunciarem horizontes bastante otimistas na evolução do tratamento do carcinoma urotelial, dentre eles: 1- maior eficácia antitumoral na introdução de superantígeno (EBS); 2- menor potencial para efeitos adversos de EBS comparado ao BCG; 3- relação direta entre resposta terapêutica e ativação de vias de angiogênese (VEGF, endostatina, MMP-9), proliferação (ki-67, IGF-1) e apoptose celular; existem algumas potenciais limitações importantes no presente estudo a serem, também, verificadas no futuro.

Ratos são geralmente preferidos como modelos experimentais para testes de drogas por causa de sua homogeneidade e porque um grande número de animais pode ser usado com resultados disponíveis em um tempo relativamente curto. No entanto, os roedores são pouco responsivos à EBS dada sua menor afinidade com MHC II e são naturalmente resistentes ao choque tóxico superantígeno induzido (123). Estes aspectos relacionados à MHC II podem

sugerir maior reatividade ao EBS em humanos, com duas possíveis repercussões com impacto na pesquisa translacional: maior efeito antitumoral, assim como maior incidência de efeitos colaterais em humanos comparados a roedores.

Aerossol de EBS em macacos resultou em vômito e diarreia, desenvolvidos dentro de 24 horas de exposição, seguido pelo início abrupto de letargia, dificuldade respiratória e finalmente choque tóxico, à semelhança do que ocorre em humanos (126). EBS é a toxina mais estudada entre as exotoxinas de estafilococos e é listada pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) como um agente de prioridade categoria B, uma vez que pode ser usado como arma biológica em forma de aerossol (www.cdc.gov/biomonitoring/pdf/Toxins_Fact_Sheet.pdf). Somados à potencial toxicidade de enterotoxinas, níveis detectáveis de anticorpos contra várias enterotoxinas estafilocócicas (EAS, EBS, ECS1 e TSST-1) podem potencialmente inibir a ativação de células T (127), porém sem limitação significativa em estudos clínicos recentes (128).

A variedade e gravidade das reações EBS induzidas dependem muito da rota de exposição e a via intravesical no câncer de bexiga se apresenta como grande vantagem. Apesar de até 50% dos *S. aureus* causadores de infecção urinária (IU) produzir ao menos um fator de virulência, dentre eles EBS, este não se relaciona diretamente à gravidade da infecção ou a sintomas relacionados às enterotoxinas (vômito, diarreia, etc.), (129) sugerindo importante papel da barreira urotelial à EBS na limitação de eventos adversos, mesmo em condições desfavoráveis como IU.

A localização anatômica do câncer de bexiga “superficial” é altamente propícia à terapia regional. A bexiga é um órgão com cavidade bem definida que permite a instilação de agentes terapêuticos que podem banhar os tumores em altas concentrações, limitando a exposição sistêmica devido à natureza impermeável da parede da bexiga, além de a eliminação do agente ser facilmente alcançada através de lavagem e micção (7).

Embora exposição à enterotoxina possa trazer o risco de efeitos adversos, nenhuma toxicidade significativa foi observada e todos os animais permaneceram saudáveis durante o experimento, confirmando estudo de toxicidade anterior utilizando dose de até 100 µg/ml de EBS intravesical sem efeitos colaterais (13).

Estudos clínicos atuais demonstraram a segurança do uso de enterotoxinas do estafilococo em humanos com resultados promissores no tratamento do câncer (128,130,131).

A engenharia genética de superantígenos tem sido usada para desenvolver aplicações terapêuticas com melhores efeitos antitumorais e toxicidade reduzida. Fusão de proteínas sintéticas, MHC classe II-independente e tumor-específicas, foram avaliados com sucesso e podem representar o futuro dos superantígenos (115, 132-134).

6. Conclusões

6.1. A imunoterapia combinada BCG-EBS mostrou-se mais efetiva na recuperação das alterações histopatológicas, na restauração do equilíbrio de moléculas envolvidas na angiogênese, proliferação e apoptose comparada aos tratamentos isolados com BCG ou EBS.

6.2. Os grupos submetidos às imunoterapias com BCG, EBS e BCG-EBS demonstraram diminuição de VEGF, MMP-9, IGFR-1 e aumento da endostatina, tendendo a níveis próximos da normalidade.

7. Referências Bibliográficas

1. AMERICAN CANCER SOCIETY. Overview: bladder cancer. In: How many people get bladder cancer? American Cancer Society, Atlanta. Disponível em: http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_2_1X_How_many_people_get_bladder_cancer_44.asp?sitearea. Acesso em 11/05/2010.
2. Kroft SH, Oyasu R. Urinary Bladder Cancer: Mechanisms of development and progression. *Lab Invest* 1994; 71:158-74.
3. Zeegers MP, Tan FE, Dorant E. The Impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: A Meta-Analysis of epidemiologic studies. *Cancer* 2000; 89:630-9.
4. Grimmer G, Dettbarn G, Seidel A. Detection of carcinogenic aromatic amines in the urine of non-smokers. *Sci Total Environ* 2000; 247:81-90.
5. Böhle A, Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol* 2003; 170:964-9.
6. Crallan RA, Georgopoulos NT, Sothgate J. Experimental models of human bladder carcinogenesis. *Carcinogenesis* (2006); 27:374-81.
7. Reis LO, Pereira TC, Fávaro WJ, Cagnon VH, Lopes-Cendes I, Ferreira U. Experimental Animal Model And RNA Interference: A Promising Association for Bladder Cancer Research. *World J Urol* 2009; 27:353-61.
8. Williams PD, Lee JK, Theodorescu D. Molecular credentialing of rodent bladder carcinogenesis models. *Neoplasia* 2008; 10:838-46.

9. Hicks RM, Wakefield JS. Rapid Induction of Bladder Cancer in Rats With N-Methyl-N-Nitrosourea. I. Histology. *Chem. Biol. Interact.* (1972); 5:139-52.
10. Kunze E, Graewe T, Scherber S. Cell Cycle Dependence of N-Methyl-N-Nitrosourea-Induced Tumour Development in the Proliferating, Partially Resected Rat Urinary Bladder. *Br J Exp Pathol* 1989; 70:125-42.
11. Steinberg GD, Brendler CB, Ichikawa T, Squire RA, Isaacs JT. Characterization of an N-Methyl-N-Nitrosourea Induced Autochthonous Rat Bladder Cancer Model. *Cancer Res* 1990; 50:6668-6741.
12. Perabo FG, Willert PL, Wirger A, Schmidt DH, Von Rueker A, Mueller SC. Superantigen-Activated Mononuclear Cells Induce Apoptosis In Transitional Cell Carcinoma. *Anticancer Res* 2005; 25:3565-73.
13. Perabo FGE, Willert PL, Wirger A, et al. Preclinical evaluation of superantigen (staphylococcal enterotoxin B) in the intravesical immunotherapy of superficial bladder cancer. *Int J Cancer* 2005; 15:591-8.
14. Reis LO, Fávaro WJ, Ferreira U, Billis A, Fazuoli MG, Cagnon VH. Evolution on experimental animal model for upper urothelium carcinogenesis. *World J Urol* 2010; 28:499-505.
15. Oliveira PA, Colaco A, De La Cruz PLF. Experimental Bladder Carcinogenesis-Rodent Models. *Exp Oncol* 2006; 28:2-11.
16. Oyasu R. Epithelial Tumours of the Lower Urinary Tract in Humans and Rodents. *Food Chem Toxicol* 1995; 33:747-55.
17. Cohen SM. Comparative Pathology of Proliferative Lesions of the Urinary Bladder. *Toxicol Pathol* 2002; 30:663-71.
18. Fukushima S, Friedell GH, Jacobs JB. Effect of L-Tryptophan and Sodium Saccharin on Urinary Tract Carcinogenesis Initiated by N-[4-(5-Nitro-2-Furyl)-2-Thiazolyl] Formamide. *Cancer Res* 1981; 41:3100-3.

19. Billingham RE, Silvers WK. Inbred animals and tissue transplantation immunity, with an index of some inbred strains other than mice. *Transplant Bull*; 1959; 6:399-406.
20. Richie JP, D'Amico A. *Urologic Oncology*, Saunders Elsevier 1st Edition. 2005.
21. Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary bacillus Calmette-Guérin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 1976; 116:180-3.
22. Andreas BO, Brandau S. Immune mechanisms in bacillus Calmette Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer. *J Urol* 2003; 170:964-9.
23. Schamhart DH, de Boer EC, de Reijke TM, Kurth K. Urinary cytokines reflecting the immunological response in the urinary bladder to biological response modifiers: Their practical use. *Eur Urol* 2000; 37:S16-S23.
24. Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ. *Campbell's Urology*. 7^a ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company. 2007.
25. Witjes JA. Management of BCG failures in superficial bladder cancer: a review. *Eur Urol* 2006; 49:790-7.
26. O'Donnell MA, Boehle A. Treatment options for BCG failures. *World J Urol* 2006; 24:481-7.
27. Semenza GL. Targeting Hif-1 for Cancer Therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:721-32.
28. Kimbro KS, Simons JW. Hypoxia-Inducible Factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13:739-49.
29. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res* 2006; 312:549-60.

30. Kamath A, Helie M, Bifulco CB, Li WW, Concato J, Jain D. Lack of immunohistochemical detection of VEGF in prostate carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2009; 17:227-32.
31. Zhu M, Bi X, Jia Q, Shangguan S. The possible mechanism for impaired angiogenesis after transient focal ischemia in type 2 diabetic Gk rats: Different expressions of angiostatin and vascular endothelial growth factor. *Biomed Pharmacother* 2009; 64:208-13.
32. Waltenberger J. VEGF resistance as a molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus. *Biochem Soc Trans* 2009; 37:1167-70.
33. Abdollahi A, Lipson KE, Sckell A, Zieher H, Klenke F, Poerschke D, et al. Combined Therapy with Direct and Indirect Angiogenesis Inhibition Results in Enhanced Antiangiogenic and Antitumor Effects. *Cancer Res* 2003; 63:8890-8.
34. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1:27-31.
35. Folkman JHP, Hlatky L. The logic of anti-angiogenic gene therapy. Friedmann T. Eds. *The Development of Gene Therapy*, p.1-17, Cold Spring Harbor Laboratory Press New York. 1998.
36. Folkman J. Antiangiogenesis in cancer therapy - endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res* 2005; 312:594-606.
37. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88:277-85.
38. Schmidt A, Sommer F, Ozgür E, Klotz T, Engelmann U, Addicks K, Bloch W. Vessels in benign prostatic hyperplasia contain more binding sites for endostatin than vessels in normal prostate tissue. *Eur Urol* 2004; 46:765-7.

39. Chang Z, Choon A, Friedl A. Endostatin binds to blood vessels in situ independent of heparan sulfate and does not compete for fibroblast growth factor-2 binding. *Am J Pathol* 1999; 155:71-6.
40. Kikuchi E, Menendez S, Ohori M. Inhibition of orthotopic human bladder tumor growth by lentiviral gene transfer of endostatin. *Clin Cancer Res* 2004; 10:1835-42.
41. Tatyana I, Diptiman C, Lisa K. Effects of sustained antiangiogenic therapy in multistage prostate cancer in tramp model. *Cancer Res* 2007; 67:5789-97.
42. Yokoyama Y, Green J.E, Sukhatme VP, Ramakrishnan S. Effect of endostatin on spontaneous tumorigenesis of mammary adenocarcinoma in a transgenic mouse model. *Cancer Res* 2000; 60:4362-5.
43. Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989; 339:58-61.
44. Kleiner D, Stetler-Stevenson W. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 43:S42-S51.
45. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005; 9:267-85.
46. Guan KP, Ye HY, Yan Z, Wang Y, Hou SK. Serum levels of endostatin and matrix metalloproteinase-9 associated with high stage and grade primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2003; 61:719-23.
47. Lynch CC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 2002; 70:561-73.
48. Fowlkes JL, Serra DM, Nagase H, Thrailkill KM. MMPs are IGFBP-degrading proteinases: implications for cell proliferation and tissue growth. *Ann NY Acad Sci* 1999; 878:696-9.

49. Metalli D, Lovat F, Tripodi F, Genua M, Xu SQ, Spinelli M, Alberghina L. et al. The insulin-like growth factor receptor I promotes motility and invasion of bladder cancer cells through Akt- and mitogen-activated protein kinase-dependent activation of paxillin. *Am J Pathol* 2010; 176:2997-3006.
50. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73:2013-26.
51. Foster JR. Cell death and cell proliferation in the control of normal and neoplastic tissue growth. *Toxicol Pathol* 2000; 28:441-6.
52. Zhang X, Kong C, Takenaka I. Evaluation of cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis in transitional cell carcinoma of the pelvis and ureter. *Urology* 2001; 57:981-5.
53. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35:495-516.
54. Kressel M, Groscurth P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res* 1994; 278:549-56.
55. White MK, Cinti CA. Morphologic approach to detect apoptosis based on electron microscopy. *Methods Mol Biol* 2004; 285:105-11.
56. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzyme A induces caspase independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 2005; 22:355-70.
57. Koivisto P, Visakorpi T, Rantala I, Isola J. Increased cell proliferation activity and decreased cell death are associated with the emergence of hormone-refractory recurrent prostate cancer. *J Pathol* 1997; 183:51-6.
58. Ito Y, Matsuura N, Sakon M, Takeda T, Umeshita K, Nagano H, et al. Both cell proliferation and apoptosis significantly predict shortened disease-free survival in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 81:747-51.

59. Osen I, Fossa SD, Majak B, Rotterud R, Berner A. Prognostic factors in muscle-invasive bladder cancer treated with radiotherapy: an immunohistochemical study. *Br J Urol* 1998; 81:862-9.
60. Asakura T, Takano Y, Iki M, Suwa Y, Noguchi S, Kubota Y, et al. Prognostic value of Ki-67 for recurrence and progression of superficial bladder cancer. *J Urol* 1997; 158:385-8.
61. Suwa Y, Takano Y, Iki M, Asakura T, Noguchi S, Masuda M. Prognostic significance of Ki-67 expression in transitional cell bladder carcinoma after radical cystectomy. *Pathol Res Pract* 1997; 193:551-6.
62. Lipponen PK, Aaltomaa S. Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. *J Pathol* 1994; 173:333-9.
63. Masuda M, Takano Y, Iki M, Asakura T, Hashiba T, Noguchi S, et al. Apoptosis in transitional cell carcinoma of the renal pelvis and ureter: association with proliferative activity, bcl-2 expression and prognosis. *J. Urol.* 1997; 158:750-3.
64. Palmeira C, Oliveira PA, Arantes-Rodrigues R, Colaço A, De la Cruz PL, Lopes C, et al. DNA cytometry and kinetics of rat urothelial lesions during chemical carcinogenesis. *Oncol Rep* 2009; 21:247-52.
65. Gontero P, Bohle A, Malmstrom PU, O'Donnell MA, Oderda M, Sylvester R, Witjes F. The role of bacillus Calmette-Guérin in the treatment of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2010; 57:410-29.
66. Malmström PU, Sylvester RJ, Crawford DE, Friedrich M, Krege S, Rintala E, et al. An individual patient data meta-analysis of the long-term outcome of randomised studies comparing intravesical mitomycin C versus bacillus Calmette-Guérin for non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2009; 56:247-56.
67. Shelley MD, Mason MD, Kynaston H. Intravesical therapy for superficial bladder cancer: a systematic review of randomised trials and meta-analyses.

Cancer Treat Rev 2010; 36:195-205.

68. Martinez-Pineiro JA, Martinez-Pineiro L, Solsona E. et al. Has a 3-fold decreased dose of bacillus Calmette-Guerin the same efficacy against recurrences and progression of T1G3 and Tis bladder tumors than the standard dose? Results of a prospective randomized trial. *J Urol* 2005; 174:1242-7.
69. Ojea A, Nogueira JL, Solsona E *et al.* A multicentre, randomised prospective trial comparing three intravesical adjuvant therapies for intermediate-risk superficial bladder cancer: low-dose bacillus Calmette-Guerin (27 mg) versus very low-dose bacillus Calmette-Guerin (13.5 mg) versus mitomycin C *Eur Urol* 2007; 52:1398-406.
70. Colombel M, Saint F, Chopin D, Malavaud B, Nicolas L, Rischmann P. The effect of ofloxacin on bacillus calmette-guerin induced toxicity in patients with superficial bladder cancer: results of a randomized, prospective, double-blind, placebo controlled, multicenter study. *J Urol* 2006; 176:935-9.
71. Montironi R, Lopez-Beltran A. The 2004 WHO classification of bladder tumors: a summary and commentary. *Int J Surg Pathol* 2005; 13:143-53.
72. Tomas D, Kruslin B. The potential value of (Myo)fibroblastic stromal reaction in the diagnosis of prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 2004; 61:324-31.
73. Montgomery DC. Design and Analysis of Experiments. John Wiley: New York, 1991. p.649.
74. Zar JH. Biostatistical Analysis. 4rd Ed. New Jersey: Prentice Hall; 1999 p. 663.
75. Reis LO, Cagnon VHA, Ferreira U, Billis A, Fávaro WJ. Anti-Angiogenic Effects of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) and Bacillus Calmette-Guerin (BCG) Immunotherapy in the Superficial Bladder Cancer (SBC). *J Urol* 2010; 183:e126.

76. Alexandroff AB, Jackson AM, O'Donnell MA, James K. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet* 1999; 353:1689-94.
77. Ludwig AT, Moore JM, Luo Y, Chen X, Saltsgaver NA, O'Donnell MA, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: A novel mechanism for bacillus Calmette–Guerin-induced antitumor activity. *Cancer Res*; 2004 64:386-90.
78. Becich MJ, Carroll S, Ratliff TL. Internalization of bacille Calmette-Guerin by bladder tumor cells. *J Urol* 1991; 145:1316-24.
79. Thalmann GN, Sermier A, Rentsch C, Mohrle K, Cecchini MG, Studer UE. Urinary interleukin-8 and 18 predict the response of superficial bladder cancer to intravesical therapy with bacillus Calmette–Guerin. *J Urol* 2000; 164:2129-33.
80. Boer EC, de Jong WH, van derMeijden AP, Steerenberg PA, Witjes F, Vegt PD, et al. Leukocytes in the urine after intravesical BCG treatment for superficial bladder cancer. A flow cytofluorometric analysis. *Urol Res* 1991; 19:45-50.
81. Reijke TM, Boer EC, Kurth KH, Schamhart DH. Urinary cytokines during intravesical bacillus Calmette–Guerin therapy for superficial bladder cancer: Processing, stability and prognostic value. *J Urol* 1996; 155:477-82.
82. Böhle A, Nowc C, Ulmer A J, Musehold J, Gerdes J, Hofstetter AG, et al. Elevations of cytokines interleukin-1, interleukin-2 and tumor necrosis factor in the urine of patients after intravesical bacillus Calmette–Guerin immunotherapy. *J Urol* 1990; 144:59-64.
83. Jackson AM, Alexandroff AB, Kelly RW, Skibinska A, Esuvaranathan K, Prescott S, et al. Changes in urinary cytokines and soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in bladder cancer patients after bacillus Calmette–Guerin (BCG) immunotherapy. *Clin Exp Immunol* 1995; 99:369-75.

84. Armitage RJ. Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:407-13.
85. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunit* 1995; 3:673-682.
86. Griffith TS, Lynch DH. TRAIL: A molecule with multiple receptors and control mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1998; 10:559-63.
87. Patard JJ, Muscatelli-Groux B, Saint F, Popov Z, Maille P, Abbou C, Chopin D. Evaluation of local immune response after intravesical bacille Calmette-Guerin treatment for superficial bladder cancer. *Br J Urol* 1996; 78:709-14.
88. Poppas DP, Pavlovich CP, Folkman J, Voest EE, Chen X, Luster AD, O'Donnell MA. Intravesical bacille Calmette-Guérin induces the antiangiogenic chemokine interferon-inducible protein 10. *Urology* 1998; 52:268-75.
89. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JF, Maheshwari S, et al. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 1995; 182:155-62.
90. Luster AD, Leder P. IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo. *J Exp Med* 1993; 178:1057-65.
91. Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ, Morris SB, Burdick MD, Glass MC, et al. Interferon-g-inducible protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human nonsmall cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases. *J Exp Med* 1996; 184:981-92.
92. Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gammainterferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 1985; 315:672-6.
93. Weingartner K, Ben-Sasson SA, Stewart R, Richie JP, Riedmiller H, Folkman

- J. Endothelial cell proliferation activity in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: an in vitro model for assessment. *J Urol* 1998; 159:465-70.
94. Crew JP, O'Brien T, Bradburn M, Fuggle S, Bicknell R, Cranston D, et al. Vascular endothelial growth factor is a predictor of relapse and stage progression in superficial bladder cancer. *Cancer Res* 1997; 57:5281-5.
95. Thalmann GN, Dewald B, Baggiolini M, Studer UE. Interleukin-8 expression in the urine after bacillus Calmette-Guerin therapy: a potential prognostic factor of tumor recurrence and progression. *J Urol* 1997; 158:1340-4.
96. Rabinowitz R, Smith DS, Tiemann DD, Hudson M A. Urinary interleukin-8/creatinine level as predictor of response to intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy in bladder tumor patients. *J Urol* 1997; 158:1728-31.
97. Pavlovich CP, Kraling BM, Stewart RJ, Chen X, Bochner BH, Luster AD, Poppas DP, O'Donnell MA. BCG-induced urinary cytokines inhibit microvascular endothelial cell proliferation. *J Urol* 2000; 163:2014-21.
98. Montie JE, Clark PE, Eisenberger MA, et al. Bladder cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2009; 7:8-39.
99. Hall MC, Chang SS, Dalbagni G, et al. Guideline for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update. *J Urol* 2007; 178:2314-30.
100. Huang GJ, Hamilton AS, Lo M, Stein JP, Penson DF. Predictors of intravesical therapy for nonmuscle invasive bladder cancer: results from the surveillance, epidemiology and end results program 2003 patterns of care project. *J Urol* 2008; 180:520-4.
101. Ferreira U, Matheus WE, Nardi Pedro R, Levi D'Ancona CA, Reis LO, Stopiglia RM, Denardi F, Rodrigues Netto N Jr, de Cássio Zequi S, da Fonseca FP, Lopes A, Cardoso Guimarães G, de Carvalho Fernandes R, Cardenuto Perez MD. Primary invasive versus progressive invasive

- transitional cell bladder cancer: multicentric study of overall survival rate. *Urol Int*. 2007; 79:200-3.
102. Thomas P, John DF. Review Bacterial Superantigen. *Clin Exp Immunol* 2003; 133:299-306.
103. Choi Y, Kotzin B, Herron L, Callahan J, Marrack P, Kappler J. Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin “superantigens” with human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1989; 86:8941-5.
104. Kappler J, Kotzin B, Herron L, et al. V β -specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* 1989; 244:811-3.
105. Si SY, Hu PZ, Huang YY, et al. Tumor cells with B7.1 and transmembrane anchored staphylococcal enterotoxin A generate effective antitumor immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347:208-14.
106. Dalpke AH, Heeg K. Synergistic and antagonistic interactions between LPS and superantigens. *J Endotoxin Res* 2003; 9:52-4.
107. Radsak M, Iking-Konert C, Stegmaier S, Andrassy K, Hansch GM. Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology* 2000; 101:521-30.
108. Sperber K, Bauer J, Pizzimenti A, Najfeld V, Mayer L. Identification of subpopulations of human macrophages through the generation of human macrophage hybridomas. *J Immunol Methods* 1990; 129:31-40.
109. Boshell M, McLeod J, Walker L, Hall N, Patel Y, Sansom D. Effects of antigen presentation on superantigen-induced apoptosis mediated by Fas/ Fas ligand interactions in human T cells. *Immunology* 1996; 87:586-92.
110. Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley A, et al. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J*

Exp Med 1995; 181:71-7.

111. Campbell SC. Advances in angiogenesis research: relevance to urological oncology. *J Urol* 1997; 158:1663-74.
112. Senger DR. Molecular framework for angiogenesis. *Am J Pathol* 1996; 149:1-6.
113. Weidner N. The importance of tumour angiogenesis: the evidence continues to grow. *Am J Clin Pathol* 2004; 122:675-7.
114. Crew JP, O'Brien TS, Harris AL. Bladder cancer angiogenesis, its role in recurrence, stage progression and as a therapeutic target. *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15:221-30.
115. O'Brien T, Cranston D, Fuggle S. Different angiogenic pathways characterize superficial and invasive bladder cancer. *Cancer Res* 1995; 55:510-3.
116. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marmé D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated by the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87:3336-43.
117. Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, et al. MMP-9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung specific metastasis. *Cancer Cell* 2002; 2:289-300.
118. LeCouter J, Moritz DF, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, et al. Angiogenesis-independent endothelial protection of the liver: Role of VEGF-R1. *Science* 2003; 299:890-3.
119. Yang CC, Chu KC, Yeh WM. The expression of vascular endothelial growth factor in transitional cell carcinoma of urinary bladder is correlated with cancer progression. *Urol Oncol* 2004; 22:1-6.
120. Iwamura M, Ishibe M, Sluss PM, Cockett AT. Characterization of insulin-like

- growth factor I binding sites in human bladder cancer cell lines. *Urol Res* 1993; 21:27-32.
121. Zhao H, Grossman HB, Spitz MR, Lerner SP, Zhang K, Wu X. Plasma levels of insulin-like growth factor-1 and binding protein-3, and their association with bladder cancer risk. *J Urol* 2003; 169:714-7.
122. Rochester MA, Patel N, Turney BW, et al. The type 1 insulin like growth factor receptor is over-expressed in bladder cancer. *BJU Int* 2007; 100:1396-401.
123. DaSilva L, Welcher B, Ulrich R. et al. Humanlike immune response of human leukocyte antigen-DR3 transgenic mice to staphylococcal enterotoxins: a novel model for superantigen vaccines. *J Infect Dis* 2002; 185:1754-60.
124. Ojea A, Nogueira JL, Solsona E, et al. A multicentre, randomized prospective trial comparing three intravesical adjuvant therapies for intermediate-risk superficial bladder cancer: low-dose bacillus Calmette-Guerin (27 mg) versus very low-dose bacillus Calmette-Guerin (13.5 mg) versus mitomycin C. *Eur Urol* 2007; 52:1398–406.
125. Power CA, Wei G, Bretscher PA. Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of the immune response independently of whether immunization is administered by the intravenous, subcutaneous, or intrader-mal route. *Infect Immun* 1998; 66:5743-50.
126. Stiles BG, Bavari S, Krakauer T, Ulrich RG. Toxicity of staphylococcal enterotoxins potentiated by lipopolysaccharide: major histocompatibility complex class II molecule dependency and cytokine release. *Infect. Immun* 1993; 61:5333-8.
127. LeClaire RD, Bavari S. Human antibodies to bacterial superantigens and their ability to inhibit T-cell activation and lethality. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:460-3.
128. Zhou P, Liang P, Dong B, Yu X, Han X, Wang Y, Han Z. Long-term results of

- a phase II clinical trial of superantigen therapy with staphylococcal enterotoxin C after microwave ablation in hepatocellular carcinoma. *Int J Hyperthermia* 2011; 27:132-9.
129. Baba-Moussa L, Anani L, Scheftel JM, Couturier M, Riegel P, Haïkou N, et al. Virulence factors produced by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from urinary tract infections. *J Hosp Infect* 2008; 68:32-8.
130. Shaw DM, Connolly NB, Patel PM, Kilany S, Hedlund G, Nordle O, et al. A phase II study of a 5T4 oncofoetal antigen tumour-targeted superantigen (ABR-214936) therapy in patients with advanced renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2007; 96:567-74.
131. Borghaei H, Alpaugh K, Hedlund G, Forsberg G, Langer C, Rogatko A, et al. Phase I dose escalation, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of naptumomab estafenatox alone in patients with advanced cancer and with docetaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27:4116-23.
132. Abrahmsen L. Superantigen engineering. *Curr Opin Struct Biol* 1995; 5:464-70.
133. Newton DW, Dohlsten M, Lando PA, Kalland T, Olsson C, Kotb M. MHC class II-independent, Vb-specific activation of T cells by superantigen mutants fused to anti-tumor Fab fragments: implications for use in treatment of human colon carcinoma. *Int J Mol Med* 1998; 1:157-62.
134. Erlandsson E, Andersson K, Cavallin A, Nilsson A, Larsson-Lorek U, Niss U, et al. Identification of the antigenic epitopes in staphylococcal enterotoxins A and E and design of a superantigen for human cancer therapy. *J Mol Biol* 2003; 333:893-905.

8. Anexos

8.1. Aprovação da Comissão de Ética



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEE-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

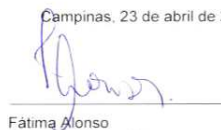
Certificamos que o Protocolo nº 1242-1, sobre "Estudo comparativo entre modalidades de imunoterapia intravesical em ratos com câncer vesical", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete / Prof. Dr. Ubirajara Ferreira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEE-IB-UNICAMP) em reunião de 23 de abril de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1242-1, entitled "Estudo comparativo entre modalidades de imunoterapia intravesical em ratos com câncer vesical", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on april 23, 2007.

Campinas, 23 de abril de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEE-IB - Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas - SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comsib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>

8.2. Direitos Autorais

COPYRIGHT release(s) of the article recommended for publication in *The Journal of Urology* and tentatively scheduled for publication in the **February 2012** issue for purpose of including in Ph.D. thesis dissertation (always credit the original source fully):

JU-11-1176R1

Anti-Angiogenic Effects of the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B and Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy in the Non-Muscle Invasive Bladder Cancer

<http://www.jurology.com/content/permission>

<http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/copyright>

<http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/postingpolicy#Scholarly>

What rights do I retain as a journal author*?

- the right to make copies (print or electronic) of the journal article for your own personal use, including for your own classroom teaching use;
- the right to make copies and distribute copies of the journal article (including via e-mail) to research colleagues, for personal use by such colleagues for scholarly purposes*;
- the right to post a pre-print version of the journal article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites for scholarly purposes* (with some exceptions such as The Lancet and Cell Press. See also our information on [electronic preprints](#) for a more detailed discussion on these points)*;
- the right to post a revised personal version of the text of the final journal article (to reflect changes made in the peer review process) on your personal or institutional website or server for scholarly purposes*, incorporating the complete citation and with a link to the Digital Object Identifier (DOI) of the article (but not in subject-oriented or centralized repositories or institutional repositories with mandates for systematic postings unless there is a specific agreement with the publisher. [Click here](#) for further information);
- the right to present the journal article at a meeting or conference and to distribute copies of such paper or article to the delegates attending the meeting;
- for your employer, if the journal article is a 'work for hire', made within the scope of the author's employment, the right to use all or part of the information in (any version of) the journal article for other intra-company use (e.g. training);
- patent and trademark rights and rights to any process or procedure described in the journal article;
- the right to include the journal article, in full or in part, in a thesis or dissertation;
- the right to use the journal article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of the article in the journal); and
- the right to prepare other derivative works, to extend the journal article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal.

*Commercial purposes and systematic distribution

Authors of Elsevier-published articles may use them only for scholarly purposes as set out above and may not use or post them for commercial purposes or under policies or other mechanisms designed to aggregate and openly disseminate manuscripts or articles or to substitute for journal-provided services. This includes the use or posting of articles for commercial gain or to substitute for the services provided directly by the journal including the posting by companies of their employee-authored works for use by customers of such companies (e.g. pharmaceutical companies and physician-prescribers); commercial exploitation such as directly associating advertising with such postings; the charging of fees for document delivery or access; the systematic distribution to others via e-mail lists or list servers (to parties other than known colleagues), whether for a fee or for free; the posting of links to sponsored articles by commercial third parties including pharmaceutical companies; institutional, funding body or government manuscript posting policies or mandates that aim to aggregate and openly distribute the accepted, peer reviewed manuscripts or published journal articles authored by its researchers or funded researchers; and subject repositories that aim to aggregate and openly distribute accepted peer reviewed manuscripts or published journal articles authored by researchers in specific subject areas.