

*LUIZ ROBERTO PEREIRA TONIOLO*

**AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA E  
ANÁTOMO-PATOLÓGICA APÓS ADMINISTRAÇÃO  
INTRAVESICAL DAS CEPAS DE BCG CONNAUGHT  
E MOREAU BUTANTAN EM HAMSTERS**

*Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação de Cirurgia da Faculdade de  
Ciências Médicas da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do Título de Mestre  
em Cirurgia.*

Orientador: *Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona*

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada à Comissão de Pós-Graduação em Cirurgia da FCM/UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Cirurgia do médico

*Campinas* LUIZ ROBERTO PEREIRA TONIOLO.  
1997 Campinas, 18 de junho de 1997.  
*Carlos Arturo Levi D'Ancona*

Prof. Dr. CARLOS ARTURO LEVI, D'ANCONA  
ORIENTADOR



9805.206

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TCMBO BC/	33166
PROC.	395/98
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	28/03/98
N.º CPD	

CM-00107431-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS - UNICAMP

Toniolo, Luiz Roberto Pereira

T614a

Avaliação imunológica e anátomo-patológica após administração intravesical das cepas de BCG Connaught e Moreau Butantan em hamsters/ Luiz Roberto Pereira Toniolo. Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Carlos Arturo Levi D' Ancona

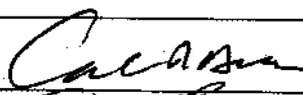
Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

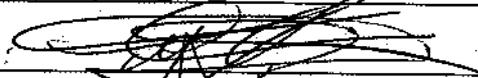
1. Urologia 2. Medicina Experimental. 3. Neoplasias. I. Carlos Arturo Levi D'Ancona. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

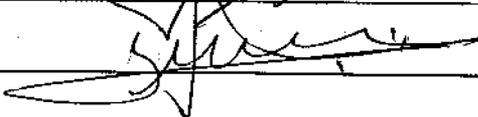
**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS ARTURO LEVI D'ANCONA**

**MEMBROS:**

1. Carlos Arturo Levi D'Ancona: 

2. Marco Demétrio C. Peres: 

3. Fernandes Lenardi: 

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

**DATA:18/06/97**

*Trabalho realizado na Disciplina de Urologia do Departamento de Cirurgia e nos Laboratórios de Imunologia Pediátrica e de Técnicas Cirúrgicas do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.*

**Agradeço,**

*ao Prof. Dr. Milton Flávio M. Lautenschlager, professor de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), pela gentileza ao ceder os animais para a realização do experimento.*

*à equipe do Laboratório de Técnica Cirúrgica do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em especial à bióloga Ana Cristina de Moraes e ao técnico de laboratório William Adalberto Silva.*

*à Prof. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela, Coordenadora da Comissão de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pelo apoio e orientação na avaliação imunológica.*

*à Elizabeth Cristina Cambiucci, bióloga do Laboratório de Imunologia do Departamento de Pediatria do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela dedicação e disponibilidade na preparação e realização da avaliação imunológica.*

*ao Prof. Dr. Nelson Rodrigues Netto Jr., professor titular da Disciplina de Urologia, do Departamento de Cirurgia da UNICAMP, por possibilitar a realização deste trabalho.*

*ao Engenheiro Agrícola Ednaldo Carvalho Guimarães, professor assistente da Faculdade de Engenharia Agrícola da UNICAMP, pelo desenvolvimento da análise estatística.*

*à Prof. Dra. Miriam de Fátima Brasil Engelman, professora adjunta da Disciplina de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina de Pouso Alegre, pela gentileza e amizade ao confeccionar e emitir os laudos das lâminas da avaliação anátomo-patológica.*

# SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	<i>i</i>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Carcinoma de células transicionais de bexiga.....	5
1.2. BCG e carcinoma de células transicionais de bexiga.....	8
1.3. Imunologia.....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
3.1. Animais.....	19
3.1.1. Definição dos Grupos.....	19
3.1.2. Vacinação dos animais.....	20
3.2. Avaliação imunológica.....	21
3.2.1. Obtenção do soro.....	21
3.2.2. Obtenção dos macrófagos peritoneais.....	21
3.2.3. Ensaio fagocítico.....	21
3.2.4. Fagocitose de Zimosan.....	22
3.2.5. Coloração e leitura.....	23
3.3. Histologia.....	23
3.4. Análise estatística.....	24

<b>4. RESULTADOS</b> .....	25
4.1. Fagocitose.....	26
4.1.1. Índice fagocitário.....	26
4.1.2. Análise estatística para índice fagocitário.....	30
4.2. Capacidade fagocitária.....	30
4.2.1. Zimosan / Meio.....	30
4.2.2. Zimosan / Soro não imunizado.....	31
4.2.3. Zimosan / Soro imunizado.....	31
4.2.4. Análise estatística para capacidade fagocitária.....	35
4.3. Anátomo-Patológico.....	35
4.3.1. Grupo Connaught.....	35
4.3.2. Grupo Moreau.....	36
4.3.3. Grupo Controle.....	36
4.4. Resultados por Grupo de Experimentação.....	36
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	42
5.1. Método.....	43
5.1.1. Grupos de Experimentação.....	43
5.1.2. Protocolo de Administração do BCG.....	44
5.1.3. Avaliação Imunológica.....	44
5.2. Resultados.....	45
5.3. Análise estatística.....	48

<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>53</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

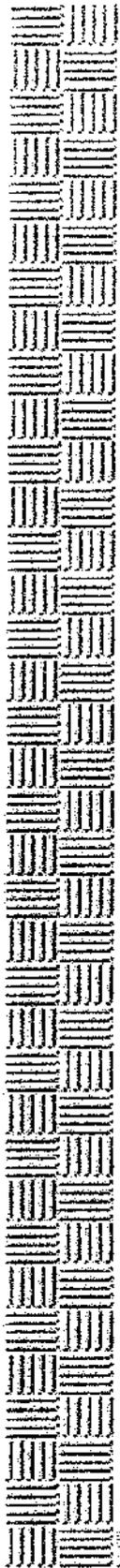
---

<b>Tabela 1.</b> Índice fagocitário (IF%) de macrófagos peritoneais de hamsters imunizados ou não com BCG (Moreau - Connaught) para partículas de zimosan não opsonizadas .....	27
<b>Tabela 2.</b> Índice fagocitário (IF%) de macrófagos peritoneais de hamsters imunizados, ou não, com BCG (Moreau - Connaught) para partículas de zimosan opsonizadas com soro de animais não imunizados.....	28
<b>Tabela 3.</b> Índice fagocitário (IF%) de macrófagos peritoneais de hamsters imunizados ou não, com BCG (Moreau - Connaught) para partículas de zimosan opsonizadas com soro de animais imunizados.....	29
<b>Tabela 4.</b> Capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de hamsters imunizados, ou não, com BCG (Moreau - Connaught) para partículas de zimosan não opsonizadas.....	32
<b>Tabela 5.</b> Capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de hamsters imunizados, ou não com BCG (Moreau - Connaught) para partículas de zimosan opsonizadas com soro de animais não imunizados.....	33
<b>Tabela 6.</b> Capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de hamsters imunizados, ou não, com BCG (Moreau - Connaught) para partículas de zimosan opsonizadas com soro de animais imunizados.....	34
<b>Tabela 7.</b> Alterações anátomo-patológicas no grupo Connaught.....	36
<b>Tabela 8.</b> Alterações anátomo-patológicas no grupo Moreau Butantan.....	36
<b>Tabela 9.</b> Resultados Grupo Moreau Butantan.....	37
<b>Tabela 10.</b> Resultados Grupo Connaught.....	37
<b>Tabela 11.</b> Resultados Grupo Controle.....	37

## FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Índice fagocitário de macrófagos para partículas de zimosan não opsonizadas.....	27
<b>Figura 2.</b> Índice fagocitário de macrófagos para partículas de zimosan opsonizadas com soro não imunizado.....	28
<b>Figura 3.</b> Índice fagocitário de macrófagos para partículas de zimosan opsonizadas com soro de animais imunizados.....	29
<b>Figura 4.</b> Capacidade fagocitária de macrófagos para partículas de zimosan não opsonizadas.....	32
<b>Figura 5.</b> Capacidade fagocitária de macrófagos para partículas de zimosan opsonizadas com soro não imunizado.....	33
<b>Figura 6.</b> Capacidade fagocitária de macrófagos para partículas de zimosan opsonizadas com soro não imunizado.....	34
<b>Figura 7.</b> Macrófagos de hamsters imunizados fagocitando partículas de zimosan opsonizadas. (eozina azul de metileno May-Grünwald, aumento 1000X).....	38
<b>Figura 8.</b> Macrófagos de hamster não imunizados fagocitando partículas de zimosan não opsonizadas. (eozina azul de metileno May-Grünwald, aumento 1000X).....	38
<b>Figura 9.</b> Macrófagos de hamster não imunizados fagocitando partículas de zimosan opsonizadas com soro imunizado. (eozina azul de metileno May-Grünwald, aumento 1000X).....	39
<b>Figura 10.</b> Linfonodo peri - hilar renal, apresentando lesão granulomatosa (Hematoxilina-eozina, aumento 100X).....	39
<b>Figura 11.</b> Lesão granulomatosa no fígado (Hematoxilina-eozina, aumento 200X)..	40
<b>Figura 12.</b> Lesão granulomatosa no baço (Hematoxilina-eozina, aumento 400X).....	40
<b>Figura 13.</b> Lesão granulomatosa na bexiga com intenso infiltrado linfocitário (Hematoxilina-eozina, aumento 200X).....	41
<b>Figura 14.</b> Lesão calcificada na parede vesical (corpo psonomatoso) (Hematoxilina-eozina, aumento 200X).....	41



*Resumo*

Com o intuito de avaliar e comparar os efeitos locais e sistêmicos produzidos pelas cepas de BCG Connaught e Moreau Butantan, foram estudados 21 hamsters (*Mesocricetus auratus*) divididos em três grupos de 7 animais. Durante 6 semanas administraram-se semanalmente por via intravesical aos animais do grupo I Controle, solução salina 0,9%, aos animais do grupo II, BCG Moreau Butantan na forma de concentrado oral 100mg/ml, com  $10^8$  bacilos/ml do Instituto Butantan, São Paulo - Brasil e aos animais do grupo III, BCG Connaught (Connaught Laboratories Limited, Willowdale, Ontario, Canada), liofilizado, apresentado em frascos com 27mg (peso seco) e 1ml de diluente com  $10^9$  bacilos/ml. Trinta dias após a última administração os animais foram sacrificados e realizou-se a avaliação fagocitária dos seus macrófagos colhidos por lavado peritoneal. Esta avaliação foi feita, incubando-se os macrófagos de cada grupo junto com partículas de zimosan, que serviram de substrato a ser fagocitado, não opsonizadas (na ausência de soro) e com partículas de zimosan opsonizadas com soro de animais do grupo Connaught ou Moreau (detecção de receptores para C3). A capacidade fagocitária (número de partículas fagocitadas) dos macrófagos dos animais imunizados foi superior à do grupo Controle (animais não imunizados), sendo que os macrófagos dos animais imunizados pelo BCG Connaught (grupo III) apresentaram os melhores resultados. O índice fagocitário (percentual de macrófagos fagocitando) para macrófagos que fagocitavam partículas de zimosan opsonizadas, tanto pelo soro de animais imunizados, como pelo soro de animais não imunizados, mostrou-se superior ao índice fagocitário dos macrófagos que fagocitavam partículas de zimosan não opsonizadas, para  $p < 0,001$ . A avaliação anátomo-patológica demonstrou a formação de lesões do tipo granulomatosa na parede vesical de 3 animais do grupo II e em 1 animal do grupo III e também no fígado de 3 animais do grupo II e no baço de 2 animais do grupo II e III, além do acúmulo de células epitelióides e linfóides nesses mesmos órgãos de outros animais imunizados, demonstrando a penetração do BCG na parede vesical dos animais e a sua disseminação para outros órgãos, comprovando seus efeitos sistêmicos pela ativação do sistema retículo-endotelial.



## ***1. Introdução***

O bacilo de Calmette-Guérin (BCG), bacilo vivo atenuado da cepa virulenta do *Mycobacterium tuberculosis var. bovis*, foi isolado pela primeira vez na França, no Instituto Pasteur, em Lille, em 1908. Sua completa atenuação demorou 13 anos para ser obtida. Animais imunizados com esta cultura desenvolviam aumento da resistência ao bacilo da tuberculose. Em 1921 o bacilo foi administrado por via oral em recém-nascidos (a primeira vez em seres humanos). Desde então foram realizadas mais de 100 milhões de imunizações, e hoje a via preferida para sua aplicação é a intradérmica. Embora amplamente utilizado como vacina contra a tuberculose, o BCG ainda é motivo de controvérsias (ANÔNIMO,1980, TAUB,1963).

O microorganismo obtido através da atenuação em Paris foi depois distribuído para laboratórios de todo o mundo, e serviu de semente para a produção de BCG em muitos centros. No Brasil começou a ser utilizado em 1927, tendo como incentivador Arlindo de Assis, trabalhando na Fundação Ataufo de Paiva e o responsável pela conservação da vacina até nossos dias (VERONESI,1982). A produção de BCG nesses laboratórios resultou, por seleção genética, na geração de diferentes cepas, devido as condições de cultura e os meios utilizados, que variavam de um laboratório para outro. Alguns centros de pesquisa até modificaram de propósito sua cepa. Essas novas cepas diferem quanto a atividade bioquímica, características de crescimento, morfologia das bactérias e colônias, virulência animal e propriedades gerais de imunoestimulação. Por causa das variações nas condições de cultura dos organismos, as vacinas fabricadas com essas cepas também diferem quanto à proporção de bactérias mortas, vivas e, principalmente quanto à agregação de corpos bacterianos. Assim, as unidades viáveis podem consistir na verdade, de vários organismos agregados, já mortos em sua maioria.

O emprego do BCG na preparação de vacinas já é conhecido e utilizado em todo o mundo. No entanto, a identificação de suas propriedades imunomoduladoras propiciou um maior interesse pelo estudo de sua ação, no controle e tratamento do câncer. Com este intuito têm sido elaborados diversos estudos à nível experimental e clínico, com as mais variadas preparações, vias de administração e esquemas terapêuticos. Apesar do grande volume de pesquisas realizadas nessa área, ainda não se

conseguiu estabelecer uma padronização de uso ou uniformidade de efeitos do BCG para a maioria dos tipos de câncer. Uma das primeiras tentativas de uso do BCG no tratamento do câncer foi realizada há mais de 50 anos na Suécia, tendo-se administrado, a preparação por via endovenosa, subcutânea e diretamente sobre o tumor (GILBERT,1978).

O mecanismo pelo qual o BCG promove seu efeito é desconhecido. Tem sido relatado tratar-se de imunidade celular, e a reação de hipersensibilidade cutânea tardia é facilmente demonstrada, principalmente através da reação contra o derivado protéico purificado da tuberculina, o PPD (ZLOTTA, 1994). Embora estas ações possam variar conforme a cepa utilizada na preparação, proporção de organismos viáveis, entre outros fatores. O BCG geralmente leva a uma estimulação do sistema retículo-endotelial, alteração na taxa de ativação de macrófagos, mudança no seu conteúdo lisossômico e poder bactericida, variação na distribuição de células linfóides, indução da hipersensibilidade e resposta humoral (COHEN,1974). Ao mesmo tempo que o BCG induz resposta humoral e celular específica, também influencia decisivamente no estado imunológico do hospedeiro e pode estimular ou deprimir respostas específicas, celulares e humorais contra uma grande variedade de materiais antigênicos (BALDWIN, 1978). Embora estimule o sistema de defesa do organismo, em algumas situações o BCG pode regular a atividade supressora de células T (GOLUMBEK, 1993). Como ocorre reação cruzada entre BCG e outros agentes (inclusive células neoplásicas humanas), acredita-se que sua ação seja uma reação cruzada entre BCG e antígenos tumorais. A obtenção experimental de reação cruzada entre BCG e células de melanoma humano sem que se conseguisse o mesmo resultado com cultura de fibroblastos humanos normais é uma evidência nesse sentido (GORDON,1979). O BCG induz uma resposta local prolongada com características de inflamação granulomatosa crônica; linfócitos, macrófagos e uma grande variedade de células polimorfonucleares são atraídas, o que dá início à resposta imunológica contra o BCG (GUMBY,1982). Como parte da resposta linfóide, vários tipos de substâncias citotóxicas são eliminadas e as células mais próximas (tumorais ou normais) podem ser danificadas ou destruídas (TATCHER,1979, NAKAMURA, 1982).

A ativação da função fagocitária e metabólica dos macrófagos parece ser responsável pela destruição das células tumorais, por mecanismos ainda não muito claros. Assim, tanto através da ativação dos macrófagos quanto da ativação de células citotóxicas, as células tumorais seriam destruídas pela reação de defesa desencadeada pelo BCG. Até pouco tempo não se tinha determinado se os componentes comuns ao BCG e as células neoplásicas estavam relacionados com a atividade biológica do tumor, ou com possível efeito antitumoral do BCG. A partir de 1985, entretanto, com a descoberta do fator de necrose tumoral (TNF) e os estudos subsequentes, abriram-se novas perspectivas (OLD,1988). Estas pesquisas demonstraram que a regressão tumoral depende basicamente de dois fatores: ativação e proliferação de macrófagos acompanhada por estimulação do sistema retículo-endotelial; e a ativação do TNF. O primeiro mecanismo pode ser induzido pelo BCG e o segundo pode ser estimulado por uma endorfina ou lipopolissacáride de parede bacteriana. Mas ainda é incipiente o estudo do papel destas substâncias no controle do câncer. O antagonismo entre câncer e doenças infecciosas, especialmente a tuberculose, é conhecido há mais de 100 anos. Numa revisão feita em 1929 por Pearl , era evidente que a ocorrência de câncer e tuberculose em um mesmo paciente era rara (HOOVER,1978). Em 1926 alguns estudos já demonstravam que o transplante de células neoplásicas misturadas com BCG para camundongos não resultava em crescimento tumoral (HOOVER,1978).

Pesquisas realizadas em diferentes animais e tumores espontâneos ou induzidos por carcinógenos, demonstraram que o uso sistêmico profilático de BCG pode causar efeito inibidor, neutro ou, com menos frequência, estimulador do crescimento tumoral (GUMBY,1982). O sucesso da imunoterapia com BCG para tratamento de tumores já estabelecidos, parece depender de 5 fatores (BALDWIN, 1978, BAST,1972, YARKONI, 1981, ZBAR,1971):

- 1) Do volume do tumor (o BCG eliminaria a doença residual mínima);
- 2) capacidade para desenvolver resposta imunológica ao antígeno da micobactéria (animais que não apresentassem hipersensibilidade cutânea ao PPD não responderiam ao BCG) (BAST,1972; CASCINELLI,1980; RATLIFF,1987);

- 3) administração de um número adequado de organismos viáveis, que gira em torno de  $10^6$  e  $10^8$  organismos. A administração de altas doses de BCG por via endovenosa parece levar a um aumento na proliferação de células supressoras, o que poderia estimular o crescimento tumoral (PANG,1982);
- 4) ação local do BCG contra as células tumorais;
- 5) capacidade de desenvolver uma resposta imunitária aos antígenos tumorais (o efeito terapêutico do BCG parece depender da imunogenicidade do tumor, ou seja seu uso em tumores pouco antigênicos provoca estimulação do crescimento do tumor (BAST,1972).

O BCG foi empregado para tratamento de câncer, com resultados positivos, pela primeira vez, em 1935 por via endovenosa, subcutânea e intralesional (BALDWIN,1978). O interesse no seu uso como agente imunoterápico cresceu após os trabalhos de (MATHÉ,1969), que relatou ação benéfica do BCG em leucemia linfoblástica e melanoma cutâneo. A partir de então, foram realizadas centenas de ensaios clínicos, para diversos tipos de tumores malignos.

Como os efeitos imunológicos produzidos pelo BCG são muito variáveis, inclusive aqueles observados no carcinoma de células transicionais de bexiga, além de não existir padronização da resposta humoral e celular aos tumores, tanto à nível experimental quanto clínico, grande parte dos conhecimentos sobre as propriedades antitumorais do BCG é fruto de observação empírica.

### **1.1. CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS DA BEXIGA**

O carcinoma de células transicionais acomete principalmente as faixas etárias acima dos 40 anos, com frequência de 20:1000. Várias situações estão relacionadas com uma maior incidência desse tumor (o hábito de fumar, exposição industrial ou contato com corantes artificiais).

O estudo anátomo-patológico baseia-se em aspectos citológicos e na arquitetura histológica do urotélio para classificar o material de biópsia da bexiga. Atipias e displasias uroteliais são diagnósticos anátomo-patológicos de lesões que precedem o aparecimento do câncer urotelial (GILBERT,1978). (ALTHAUSEN,1976) num estudo retrospectivo demonstrou que 36% dos pacientes com atipias uroteliais num seguimento de 5 anos desenvolveram câncer. De acordo com a UICC (Union Internacionale Contre le Cancer), o sistema de classificação do câncer de bexiga, a extensão do tumor primário é designada como T, e completado o estadiamento através de exame clínico, urografia, cistoscopia, exame bimanual sob anestesia e biópsia do tumor. A condição dos linfonodos regionais é designada como N, e avaliada através da radiografia, linfografia ou tomografia computadorizada. A extensão das metástases M é determinada por exame clínico, radiografia do tórax, ultra-sonografia abdominal e cintilografia óssea.

O câncer superficial de bexiga é definido como carcinoma de células transicionais limitado à mucosa e submucosa da bexiga. É categorizado como estágio TA (carcinoma de células transicionais papilífero não invasivo confinado à mucosa vesical), CIS (carcinoma *in situ*), T1 (carcinoma de células transicionais papilífero que invade a lâmina própria e submucosa porém não a musculatura vesical). O carcinoma superficial de bexiga responde por 75 a 85% dos cânceres de bexiga diagnosticados. O carcinoma *in situ* primário é raro, cerca de 3%, porém 30 a 70% dos cânceres de bexiga encontram-se associados a ele, sendo mais freqüente nos tumores de alto grau (SKINNER,1988). O tumor de células transicionais manifesta-se de diversas maneiras, desde um papiloma benigno até aqueles pouco diferenciados e com alto grau de anaplasia, podendo ser vegetante, sésil, infiltrativo, nodular, misto ou intraepitelial. De um modo geral o carcinoma superficial de bexiga bem diferenciado não altera a sobrevida do paciente, apesar do tratamento 10 a 15% evoluem para carcinoma invasivo (ALTHAUSEN,1976; HENEY,1986), aproximadamente 70% dos pacientes apresentam uma ou mais recorrências (GILBERT,1978) e 25% apresentam alto grau histológico.

O tratamento padrão do tumor superficial de bexiga é a RTU (ressecção transuretral), resseca-se primeiro a porção superficial do tumor que é separada e a seguir resseca-se profundamente atingindo a musculatura vesical e finalmente procede-se a fulguração das bordas. Recomenda-se também a biópsia a frio das áreas adjacentes ao tumor, da parede oposta, do assoalho vesical, do trigono e uretra prostática, que quando positivas indicam áreas de provável recorrência, os pacientes assim tratados apresentam uma sobrevida em 5 anos de 70%. Outros métodos de tratamento também encontram aplicação, como o LASER que tem tido boa aceitação por ser aplicado sob anestesia local, com bons resultados, além de não produzir sangramento ou estimulação do nervo obturador, porém sua desvantagem se traduz na ausência de material para o estudo anátomo-patológico e no custo do equipamento (SMITH,1992). A cistectomia parcial pode ser realizada naqueles tumores de difícil acesso ou dentro de divertículos, no entanto as desvantagens residem no fato de que favorece a implantação de células tumorais e apresenta um índice de recorrência da ordem de 70% além de suas dificuldades técnicas; a radioterapia poderá também ser indicada, porém sua morbidade é superior a de outros métodos; terapia por pressão hidrostática e retirada da mucosa vesical não têm encontrado aplicação em nossos dias. A quimioterapia intravesical com diversos agentes (thiotepa, etoglucid, mitomicina-C, doxorubicin) demonstrou até pouco tempo ser a mais eficaz, produzindo uma resposta completa entre 33 e 57% para pacientes com tumor papilífero residual e de 55 a 66% para o Ca *in situ* (RICHIE,1992). O Interferon, uma proteína com propriedades antiproliferativas, produzida em larga escala por técnicas de recombinação de DNA tem sido empregada em ensaios clínicos demonstrando uma resposta completa em torno de 44% (SHORTLIFFE,1984; HOROSZEWICZ,1989). Diversas vitaminas, incluindo pyridoxine (BYAR,1977; STUDER,1984), ácido ascorbico, vitamina A e análogos retinóides, têm sido avaliados na profilaxia da recorrência do carcinoma de bexiga com algum resultado. Megadose de vitaminas A, B6, C, E e zinco produziu redução na recorrência de tumor vesical em pacientes que fizeram imunoterapia com BCG (LAMM,1994).

## 1.2. BCG E CARCINOMA DE CÉLULAS TRANSICIONAIS DE BEXIGA

Em 1976 MORALES introduziu a terapia com BCG intravesical e intradérmico na profilaxia da recorrência tumoral, em pacientes com carcinoma superficial de bexiga. O esquema terapêutico utilizado, incluía a ressecção endoscópica do tumor, seguida da instilação de 120mg de BCG (Instituto Armand Frappier, Quebec, Canada) diluídos em 50ml de solução salina e retenção na bexiga por 2hs; simultaneamente, administrava-se 5mg de BCG via intradérmica. Esse procedimento era repetido semanalmente por 6 semanas e o seguimento era feito através de cistoscopia e biópsias ao acaso. Esse estudo demonstrou efeito positivo e desencadeou muitos outros trabalhos. Embora inicialmente o protocolo de Morales tenha orientado o uso do BCG intravesical, associado ao intradérmico, outros autores (LAMM,1991; BROSMAN,1991) têm demonstrado que todos os pacientes submetidos apenas ao tratamento intravesical apresentam viragem do PPD, com taxa de resposta igual ou superior aos estudos iniciais, bem como, foi demonstrado em estudo experimental em *Hamster* que o BCG intravesical produz efeitos sistêmicos (D'ANCONA,1988). No momento tem sido utilizado em pacientes com câncer de bexiga na profilaxia de recidivas, no tratamento de câncer residual e como o mais efetivo agente no tratamento do carcinoma *in situ*. A efetividade do BCG intravesical na erradicação do carcinoma *in situ*, tem sido demonstrada por diversos autores (De JAGER,1991). Com o uso de protocolos que utilizam de 6 a 12 aplicações, aproximadamente 70% dos pacientes são considerados tratados, o que leva a considerá-lo como o tratamento de primeira escolha nesses casos. Embora os resultados sejam muito bons, o acompanhamento se faz necessário, pois o sucesso não é observado em todos os pacientes, principalmente nos tumores de alto grau, pelo seu comportamento mais agressivo. Também na profilaxia das recorrências tumorais o BCG tem demonstrado ser eficaz. Nos trabalhos de LAMM (1981), num seguimento de 15 meses houve uma redução de 43 para 17% no índice de recorrência nos pacientes tratados só com ressecção, comparados com ressecção mais BCG. HERR & LAUDONE (1988) em estudo que utilizavam diversos agentes no tratamento ou prevenção das recorrências do câncer superficial de bexiga, obtiveram 71% de resposta completa com o BCG.

Os resultados com o uso a longo prazo do BCG, demonstraram uma diminuição significativa na progressão da doença, redução no número de cistectomias e que se trata do primeiro agente de uso intravesical que altera a sobrevida no carcinoma de células transicionais de bexiga. Acredita-se que a queda no índice de mortalidade por câncer de bexiga nos Estados Unidos se deva ao uso do BCG intravesical (LAMM,1981). Apesar do entusiasmo de vários pesquisadores e clínicos com a terapia intravesical com BCG, há muito o que se conhecer sobre os efeitos causados a longo prazo pelo medicamento; num estudo de revisão de literatura com o total de 1278 pacientes observou-se que; 91% dos pacientes apresentaram cistite, febre em 3,9%, granuloma prostático em 1,3%, pneumonite ou hepatite em 0,9%, artrites e artralguas em 0,5%, rash cutâneo em 0,4%, abscesso de pele em 0,4%, obstrução ureteral em 0,3%, orquiepididimite em 0,2%, contratura vesical em 0,2%, hipotensão em 0,1% e citopenia em 0,1% (LAMM,1986). O emprego do BCG no carcinoma superficial de bexiga tem se mostrado eficaz, com pequeno índice de complicações, ou seja com baixa morbidade, e quando comparado à outros agentes sua resposta é superior (HERR,1986; RINTALA,1991). Porém algumas dúvidas permanecem, principalmente no que diz respeito ao seu mecanismo de ação. Até o momento não se conhece o efeito do BCG. Existem duas hipóteses; a primeira que sua ação se deva à mecanismos imunológicos e a outra que se daria por uma resposta inflamatória inespecífica da mucosa e submucosa vesical.

Dentre os possíveis mecanismos de ação do BCG, de acordo com as hipóteses não imunológicas, o tumor seria destruído por ação direta da bactéria ou por seus subprodutos, ou ainda, a bactéria induziria um evento inflamatório não específico que resultaria na eliminação do tumor (DROLLER,1986). Entretanto existem poucos dados para apoiar essas teorias.

Por outro lado uma resposta imunológica para justificar o efeito antitumoral do BCG é sugerida por um grande número de dados clínicos e experimentais (RATLIFF,1987; (NAKAMURA,1987). A resposta imunológica poderia se apresentar através de: um evento específico, em que o anticorpo ou uma reação mediada por células

reconheceria um antígeno específico no tumor e então o destruiria; ou por reconhecimento não específico que resultaria na produção de linfocinas solúveis, as quais poderiam exercer uma ação antitumor direta ou poderiam ativar uma reação de toxicidade não específica mediada por células, através de agentes, como as células *Killer* (ativadas por linfocinas ou macrófagos). Vários estudos sugerem uma associação entre a resposta das células T ao BCG, e a atividade antitumoral (STULDREHER,1992). Um fato que reforça essa hipótese, é a presença de linfocinas implicadas na imunidade mediada por células se encontrarem aumentadas na urina de pacientes que receberam BCG intravesical. A ação imunológica do BCG na bexiga se processaria em 2 fases:

1) Através de um evento inibitório, a bactéria teria receptores na parede vesical onde se ligaria, ficando então retida dentro da mesma onde seria processada e induziria a resposta antitumor. Foi demonstrado em animais, que existem esses receptores, e que estariam relacionados a fibronectina, uma glicoproteína presente em forma solúvel no plasma e em outros fluidos corporais e na forma insolúvel (fibronectina matriz) no tecido conectivo e membranas basais (BEEZHOLD,1992). A fibronectina matriz é usada como um mecanismo de ligação para células epiteliais e fibroblastos. Um problema em potencial com o receptor para BCG é que este apresenta uma afinidade muito grande, tanto para fibronectina solúvel como para matriz, o que bloquearia a ligação da bactéria à parede da bexiga por saturar os receptores com fibronectina solúvel, o que também bloqueia a resposta antitumor. Verificou-se também que para induzir a resposta de aderência é importante que as bactérias sejam viáveis, pois aquelas inativadas, por exemplo pelo calor não se ligam à fibronectina (RATLIFF,1988). A distribuição de fibronectina na bexiga humana normal tem sido estudada e resultados mostram que esta ausente na superfície das células epiteliais mas esta presente na membrana basal e na submucosa, sugerindo que a aderência do BCG à fibronectina ocorre somente na presença de um epitélio “interrompido” ou seja na ruptura da superfície urotelial ou em presença de inflamação, produzindo uma reação inflamatória e conseqüente atividade antitumoral (BEEZHOLD,1992; RATLIFF, 1988).

2) Evento efetor, que poderia ser imunológico ou não. Vários investigadores sugeriram que o evento imunológico seria o primeiro a se processar. Outros, entretanto, que os eventos não imunológicos seriam responsáveis pelo efeito primário do BCG devido a sua toxicidade direta (SKINNER,1988). As células tumorais teriam receptores para bactérias, onde se ligariam e a seguir seriam ingeridas pelas células tumorais. Embora não seja ainda conhecido que papel tem na atividade antitumor e se realmente existe o processo de ingestão. A ingestão da bactéria pela célula tumoral estabeleceria o potencial para um efeito tóxico direto, ou seja se daria através da proliferação da bactéria, e conseqüente lise celular. Alternativamente, a própria célula poderia processar o antígeno levando a um reconhecimento da célula pelo sistema imune e posterior morte por ação imune direta contra ela; citotoxicidade.

### **1.3. IMUNOLOGIA**

Os linfócitos distinguem-se pela densidade, mobilidade eletroforética, vida média, migração para órgãos linfóides e resposta aos mitógenos. Do ponto de vista funcional, existem mais populações linfocitárias que agem separadamente ou em cooperação na resposta imunitária. Distinguem-se duas grandes famílias: os linfócitos T, cuja maturação depende do timo e os linfócitos B, que diferenciam-se fora do timo, na medula óssea. As células T são também provenientes da medula óssea que originam as células linfóides no adulto. A resposta imunitária no confronto com os agentes infecciosos pode assumir uma forma essencialmente humoral, ou celular.

Distinguem-se atualmente duas formas de resposta imunológica:

1) a imunidade celular, transferível através das células linfóides como na rejeição aos transplantes, nas reações de hipersensibilidade retardada e a reação de citotoxicidade;

2) A Imunidade Humoral, transferível através do soro (minimamente através das células), responsável em particular pela reação de hipersensibilidade imediata (anafilaxia, atopia), pela citólise em presença de complemento e pelo fenômeno de Arthus.

Os linfócitos T e B diferenciam-se por numerosos antígenos, receptores e funções. Os receptores são moléculas situadas ao nível da membrana celular com capacidade de ligarem-se especificamente à uma substância e podem exercer ações farmacológicas sobre a célula. Os linfócitos apresentam numerosos receptores, dentre eles os receptores de reconhecimento dos antígenos, e os receptores para moléculas com função imunitária, como o fragmento Fc das imunoglobulinas e os fatores do complemento.

As células fagocitárias, são definidas pela capacidade de englobar e, de digerir partículas. Compreendem essencialmente os macrófagos, os monócitos e os polimorfonucleares. Estas células representam o elemento essencial do sistema retículo-endotelial, chamado também de sistema retículo-histiocitário. A origem delas é comum, na medula óssea sob a forma de células hematopoiéticas totipotentes, e de células totipotentes mielóides, estas últimas dão origem, em presença de mediadores (os CSF “Colony Stimulating Factors”), à colônias mistas de macrófagos e polimorfonucleares. Os monócitos produzidos na medula óssea, dão lugar aos macrófagos depois da sua saída dos vasos por diapedese. Pode-se distinguir várias categorias de macrófagos, segundo seu aspecto morfológico, pela capacidade funcional e sobretudo pela sua localização. O tempo de vida dos macrófagos varia de 20 a 100 dias. As células fagocitárias possuem dentre outras, como principal função a fagocitose, que se desenvolve em duas fases:

- 1) A Adesão, que é favorecida pela presença dos anticorpos IgG na superfície da partícula a ser ingerida;
- 2) A Ingestão, segundo o estado funcional das células fagocitárias e a natureza da partícula, esta pode ser digerida, persistir ou multiplicar-se no interior da célula.

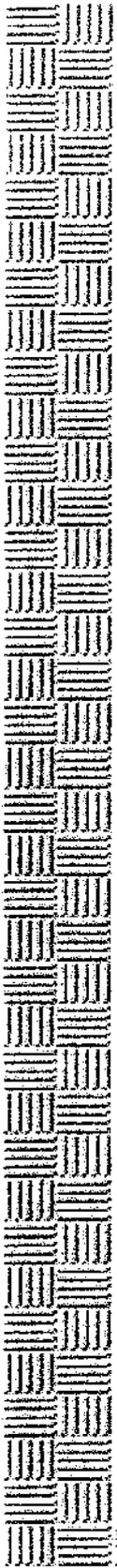
Além destas funções os macrófagos podem sintetizar numerosas moléculas, algumas das quais com função imunitária, como o Interferon e alguns fatores do complemento. Os macrófagos intervêm também na maioria das respostas imunes, mediante a apresentação dos antígenos às células T e B ou pela produção de alguns mediadores. Podem também apresentar funções citotóxicas no confronto com transplantes e com tumores e intervir na cicatrização, além de numerosas atividades metabólicas. Os macrófagos podem ser ativados em diversas circunstâncias fisiológicas ou artificiais. No curso de algumas reações imunitárias, as células T produzem mediadores (as linfocinas) que podem ativar os macrófagos *in vivo* ou *in vitro*.

Outras células além dos linfócitos e dos fagócitos, intervêm nas reações imunitárias. As células Killer (K) e Natural Killer (NK) exercem funções citotóxicas. As células k destroem as células sensibilizadas pelos anticorpos IgG aos quais se fixam mediante os seus receptores para o fragmento Fc. Aparentemente não possuem nenhum dos marcadores das células B e T, são células nulas. As células NK são assim definidas pela capacidade de destruir *in vitro* as células tumorais viro-induzidas mantidas em cultura, independente de uma sensibilização precedente ou da presença de anticorpos ou do complemento. A relação destas com as células T é defendida por vários autores. Numerosos métodos foram descritos para individualizar e medir as interações entre antígenos e anticorpos:

- 1) Os Métodos Primários consideram somente as interações primárias entre o antígeno e o anticorpo, independente dos fenômenos bioquímicos e biológicos. Estas reações primárias permitem medir simultaneamente a quantidade e a afinidade dos anticorpos em função da concentração dos antígenos;
- 2) Os Métodos Secundários estudam os fenômenos que são a consequência direta das interações primárias. A precipitação é um exemplo. As reações de aglutinação revelam pequenas quantidades de anticorpos IgM, porém são de 50 a 500 vezes menos sensíveis para IgG. A fixação do complemento e a hemólise não podem ser utilizadas pelos anticorpos que não fixam o complemento, como IgA e IgE;

3) Os Métodos Terciários estudam as conseqüências biológicas in vivo das interações primárias. A sua complexidade é ainda maior que aquela das reações secundárias. De modo que as variáveis das reações primárias e secundárias ligadas aos antígenos e aos anticorpos se somam aos parâmetros característicos dos indivíduos, como a taxa de complemento ou os receptores celulares para o fragmento Fc da imunoglobulina. As hemácias e plaquetas dos primatas, como outras células têm sobre sua superfície receptores para o terceiro fator do complemento (C3). Se colocamos na presença de antígenos (bactérias, vírus, leucócitos) os anticorpos correspondentes e o complemento, estas partículas antigênicas se recobrem de C3. Com as hemácias e plaquetas consideradas neste caso como “indicadores”, estas partículas antigênicas recobertas de C3 se fixariam sobre as hemácias ou sobre as plaquetas provocando aglutinação caracterizando o fenômeno da imunoaderência. A opsonização é um efeito análogo a imunoaderência, isto é, se caracteriza pelo recobrimento destas partículas antigênicas por fragmentos Fc de IgG ou pela fração C3 do complemento. Permite estudar, de modo semiquantitativo, a capacidade dos anticorpos aumentarem a fagocitose das bactérias pelos macrófagos que têm receptores de superfície para o fragmento Fc de IgG e para C3. O complemento representa, com os anticorpos, o elemento essencial do sistema humoral de defesa contra os agentes infecciosos. É constituído por uma variedade de proteínas circulantes capazes de interagir com algumas membranas biológicas. A atividade em cascata dos seus vários componentes é a origem de uma variada atividade biológica, como a lise celular, bacteriana ou viral. Produz também o recrutamento e a ativação de numerosos efetores celulares, sobretudo a produção de histamina por parte dos mastócitos. O C3b é particularmente importante no início da resposta imunológica, mesmo antes do desenvolvimento da imunidade específica. A importância da opsonização por parte do C3b é bem demonstrada pela gravidade e pela freqüência de infecções observadas nos doentes que têm um déficit de C3. As células B produzem os anticorpos e as células T são responsáveis pelos fenômenos de citotoxicidade específica dos antígenos. O desenvolvimento destes dois tipos de resposta imunológica depende estritamente da natureza química dos antígenos, da dose ou da via de administração e

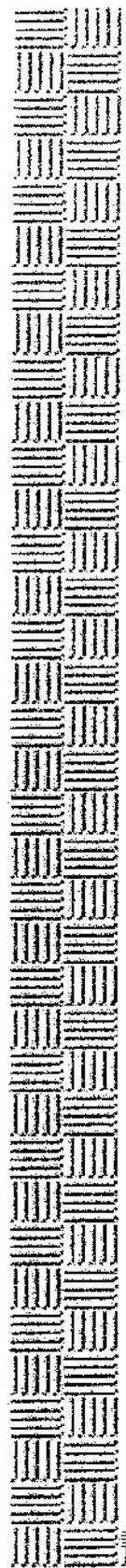
têm influência sobre a qualidade e o nível de produção dos anticorpos ou das células citotóxicas. Estas reações imunológicas são de outro modo submetidas a uma regulação muito complexa, fruto de interações celulares múltiplas onde agem os linfócitos T (amplificadores, “helper” ou supressores), as células B (mediante o efeito de retroação dos anticorpos) e os macrófagos. Depois de haver reconhecido o antígeno os precursores das células efetoras se diferenciam em células produtoras de linfocina. Estas diferenciações requerem a presença de células auxiliares, em particular dos macrófagos e das células T “helper” ou amplificadoras. Através do mecanismo da fagocitose os macrófagos podem incorporar os antígenos e modificá-los por digestão enzimática. Esta captação seguida de modificações químicas tem efeitos variáveis sobre a resposta imunológica, mas tende na maior parte das vezes em aumentá-la. Os macrófagos graças aos seus receptores de superfície captam os complexos antígeno/anticorpo que podem ser destruídos ou ao contrário serem apresentados aos linfócitos. Além destas ações os macrófagos apresentam mediadores que modificam o curso da resposta imune, em particular um fator ativador de linfócitos “Lymphocyte Activating Factor” também chamado de interleucina 1, capaz de ativar de modo não específico mais funções das células T. Enfim, em outras circunstâncias os macrófagos parecem adquirir propriedades citotóxicas ou supressivas, sobretudo depois do contato com as linfocinas produzidas pelas células T ativadas, como por exemplo o tratamento com BCG em animais com tumores (BACH & LESAVRE, 1981).



## ***2. Objetivos***

O objetivo deste estudo consiste em verificar as seguintes questões:

1. Demonstrar a ação sistêmica do BCG após instilação intravesical;
2. Avaliar a fagocitose por macrófagos peritoneais de Hamster;
3. Comparar as respostas da ação do BCG cepas Moreau Butantan e Connaught.



### ***3. Material e Métodos***

### 3.1. ANIMAIS

Foram estudados 21 hamsters (*Mesocricetus auratus*) adultos, fêmeas, isogênicos, doados pela Faculdade de Medicina da UNESP-Botucatu, nascidos em 29/06/92, pesando entre 148 e 203 gramas (média de 182g). Os animais foram divididos em três grupos de sete após escolha aleatória.

Durante a fase experimental os animais foram mantidos em gaiolas no mesmo ambiente, dentro dos mesmos padrões de alimentação no Biotério do Núcleo de Cirurgia Experimental da FCM-UNICAMP, em número de 3 a 4 animais por gaiola, onde receberam comida e água *ad libitum* até atingirem 6 meses de idade.

#### 3.1.1. Definição dos Grupos

**Grupo I (Moreau)** - formado por sete animais que receberam por via intravesical 0,2ml de solução salina 0,9% com  $2 \times 10^7$  bacilos (BCG) do Instituto Butantan de São Paulo, cepa Moreau apresentado em flaconetes com 500mg (concentrado oral de 100mg/ml com  $10^8$  bacilos/ml);

**Grupo II (Connaught)** - sete animais que receberam por via intravesical 0,2ml de solução salina 0,9% com  $2 \times 10^7$  bacilos do BCG-Thérapeutique Immucyst™ (Connaught Laboratories Limited, Willowdale, Ontario, Canada) cepa Connaught, liofilizado, apresentado em frascos com 27mg (peso seco) e 1ml de diluente, com  $10^9$  bacilos/ml, lote n° 469-12;

**Grupo III (Controle)** - sete animais que receberam por via intravesical 0,2ml de solução salina 0,9%.

Para estudar a fagocitose foram utilizadas partículas de zimosan (preparado a partir de fermento Fleischman, fermento fresco de pão), que serviram de substrato para quantificar a fagocitose dos macrófagos, agrupados como se segue:

- Grupo IA - Macrófagos do grupo I + partículas de zimosan não opsonizadas;
- Grupo IB - Macrófagos do grupo I + partículas de zimosan opsonizadas com soro do grupo I;
- Grupo IC - Macrófagos do grupo I + partículas de zimosan opsonizadas com soro do grupo III;
- Grupo IIA - Macrófagos do grupo II + partículas de zimosan não opsonizadas;
- Grupo IIB - Macrófagos do grupo II + partículas opsonizadas com soro do grupo II;
- Grupo IIC - Macrófagos do Grupo II + partículas de zimosan opsonizadas com soro do grupo III;
- Grupo IIIA - Macrófagos do grupo III + partículas de zimosan não opsonizadas;
- Grupo IIIB - Macrófagos do grupo III + partículas de zimosan opsonizadas com soro do grupo II;
- Grupo IIIC - Macrófagos do grupo III + partículas de zimosan opsonizadas com soro do grupo III.

### **3.1.2. Vacinação dos animais**

Os animais foram anestesiados em cuba saturada com éter sulfúrico e a bexiga esvaziada por compressão digital da parede abdominal. As vacinas foram administradas por via intravesical, com cateter de 4 Fr. de diâmetro e 10cm de comprimento acoplado a uma seringa de 1ml (Tecnobio-cod:300316), durante 6 semanas em aplicações semanais.

Após 30 dias da última instilação os animais foram sacrificados por decaptação.

## **3.2. AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA**

### **3.2.1. Obtenção do soro**

Para obtenção do soro, coletou-se cerca de 4ml do sangue que escoava da região cervical após a decaptação do animal. O sangue assim obtido, foi colocado em tubo de vidro, dentro de uma cuba com gelo, para preservar o complemento. A seguir os tubos foram centrifugados à 4°C por 10 minutos à 1500rpm, e separado o sobrenadante. Cerca de 0,6ml do sobrenadante de cada tubo foi transferido para frascos fechados e conservados em geladeira a 4°C pelo período máximo de 48hs.

### **3.2.2. Obtenção dos macrófagos peritoneais**

Para obtenção dos macrófagos, injetou-se intraperitonealmente 5ml de solução salina balanceada de Hanks (HBSS) seguida de massagem do abdomen (lavado peritoneal) por 3 minutos, prosseguindo com a abertura da cavidade. Colheu-se então, cerca de 5ml de líquido do lavado em um tubo cônico de vidro com 0,2ml de heparina, para evitar sua coagulação, e centrifugou-se a 1500rpm por 15 minutos. Observando a formação de depósito no fundo do tubo (representado por células presentes no lavado peritoneal, principalmente macrófagos) retirou-se o excesso de solução por aspiração e adicionou-se solução de Hanks até atingir o nível anterior. Após desfazer o botão e homogeneizar a solução centrifugou-se novamente os tubos; repetindo por duas vezes esse processo para lavar os macrófagos. De cada tubo foi retirado 0,1ml (com pipeta eletrônica) ao qual adicionou-se corante azul de Turkey, a seguir foi colocada uma gota dessa solução na câmara de Neubauer para contagem do número de macrófagos/ml obtidos de cada animal, ajustando as amostras a serem estudadas para  $10^6$  células/ml.

### **3.2.3. Ensaio fagocítico**

Um mililitro da suspensão contendo  $1 \times 10^6$  macrófagos peritoneais de animais imunizados com BCG (Moreau Butantan ou Connaught) ou de animais controle não

imunizados, foi incubado no interior de tubos de Leighton (contendo uma lamínula de vidro previamente desengordurada e seca) por 30 minutos, à 37°C, em atmosfera úmida, a 5% de CO<sub>2</sub>, para que os macrófagos pudessem aderir à lamínula. Após esse período de incubação os tubos foram lavados três vezes com agitação vigorosa em solução de Hanks à temperatura ambiente, para a remoção dos linfócitos. Em seguida as células aderentes às lamínula foram incubadas por 30 minutos, nas mesmas condições anteriores, com uma suspensão de partículas previamente opsonizadas a serem fagocitadas com zimosan incubado com soro para evidenciação de receptores para a fração C3 do complemento. Foram feitos também tubos controle, onde a suspensão a ser fagocitada foi constituída de partículas não opsonizadas de zimosan ou seja partículas que não foram colocadas em contato com o soro dos animais e portanto não sofreram adesão das opsoninas que facilitariam a fagocitose, incubadas por 30 minutos à 37°C.

#### **3.2.4. Fagocitose de Zimosan**

Foram realizados 63 experimentos onde avaliou-se a capacidade e o índice fagocitário dos macrófagos de cada animal, na ausência de opsoninas ou na presença delas, utilizando o soro de animais não imunizados e de animais imunizados com BCG dentro do seguinte esquema:

Macrófagos de animal imunizado + zimosan incubado com soro de animal não imunizado(controle);

Macrófagos de animal imunizado + zimosan incubado com soro de animal imunizado;

Macrófagos de animal não imunizado (controle) + zimosan incubado com soro de animal não imunizado (controle);

Macrófagos de animal não imunizado (controle) + zimosan incubado com soro de animal imunizado;

Macrófagos de animal imunizado + zimosan incubado com solução de Hanks;

Macrófagos de animal não imunizado (controle) + zimosan incubado com solução de Hanks.

Todos os experimentos foram realizados em duplicata, quando o número de células foi suficiente.

### **3.2.5. Coloração e leitura**

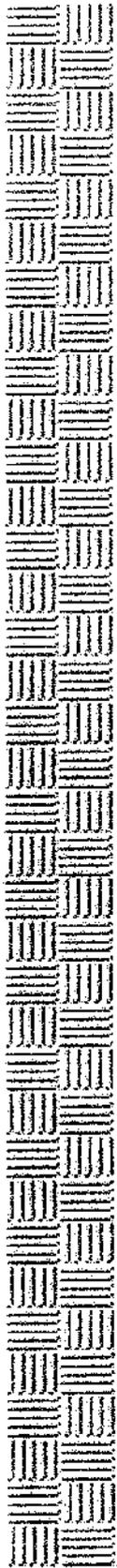
Após 30 minutos de incubação, em estufa à 37°C, as lamínulas foram vigorosamente lavadas três vezes com solução de Hanks, à temperatura ambiente, para a remoção das partículas que não foram fagocitadas. Em seguida, as lamínulas foram retiradas do interior dos tubos de Leighton e colocadas em um suporte para lamínulas e procedeu-se a coloração com eosina azul de metileno segundo May-Grünwald (art.1352-Merck). Após a coloração, as lamínulas ficaram secando por 24hs e a seguir foram montadas em lamina com auxílio de bálsamo do Canada. Finalmente, foi realizada a leitura em microscópio óptico com aumento de 1000 vezes contando-se 200 a 600 macrófagos em cada lâmina, identificando-se as células que haviam fagocitado as partículas de zimosan. Os resultados foram expressos em porcentagem de células que fagocitaram em relação ao número total de macrófagos identificados, definidos como índice fagocitário e pelo número total de partículas fagocitadas por 100 macrófagos, definidos como capacidade fagocitária (Vilela,1993).

### **3.3. HISTOLOGIA**

Para a avaliação histológica das lesões, após os animais terem sido sacrificados, realizou-se a abertura da cavidade peritoneal seguida da retirada das vísceras (fígado, baço, rins e bexiga). Após a fixação em formaldeído à 10%, pelo período aproximado de 24hs, seguiu-se a desidratação em soluções de concentrações crescentes de álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina de onde foram obtidos cortes de 5 micras de espessura que por sua vez foram corados utilizando-se hematoxilina-eosina.

### **3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Foram empregadas para a avaliação estatística a análise de variância e o teste de hipóteses de Tukey. Os níveis de significância observados foram de 5% e 1%. Foi utilizado o Sistema de Análise Estatística SANEST da SEAGRO (Faculdade de Engenharia Agrícola UNICAMP).



## ***4. Resultados***

## **4.1. FAGOCITOSE**

### **4.1.1. Índice fagocitário**

#### **4.1.1.1. Zimosan / Meio**

Na tabela 1 é apresentado o percentual de macrófagos por animal e por grupo, que encontravam-se fagocitando partículas de zimosan não opsonizadas. Sendo que o índice médio de fagocitose de partículas de zimosan incubadas com meio foi de 10,34 no grupo Moreau Butantan (DP = 1,88), 15,50 no grupo Connaught (DP = 4,35) e 20,36 no grupo controle (figura 8) (DP = 1,85). Na figura 1 os resultados obtidos por animal e para cada grupo estão representados por um gráfico, embora tenha havido uma grande variação entre os resultados isto não impediu a análise que, não demonstrou diferença significativa entre os grupos.

#### **4.1.1.2. Zimosan / Soro Não Imunizado**

Na tabela 2 é apresentado o percentual de macrófagos por animal e por grupo que encontravam-se fagocitando partículas de zimosan opsonizadas com soro não imunizado. Observou-se que a média dos valores para o índice fagocitário de partículas de zimosan incubadas com soro de animal não imunizado foi de 66,76 no grupo Moreau Butantan (figura 9) (DP = 3,54), 66,23 no grupo Connaught (DP = 4,14) e 63,54 no grupo Controle (DP = 3,42). Na figura 2 estes resultados estão representados por um gráfico para melhor visualização da análise que não observou diferença significativa para os grupos.

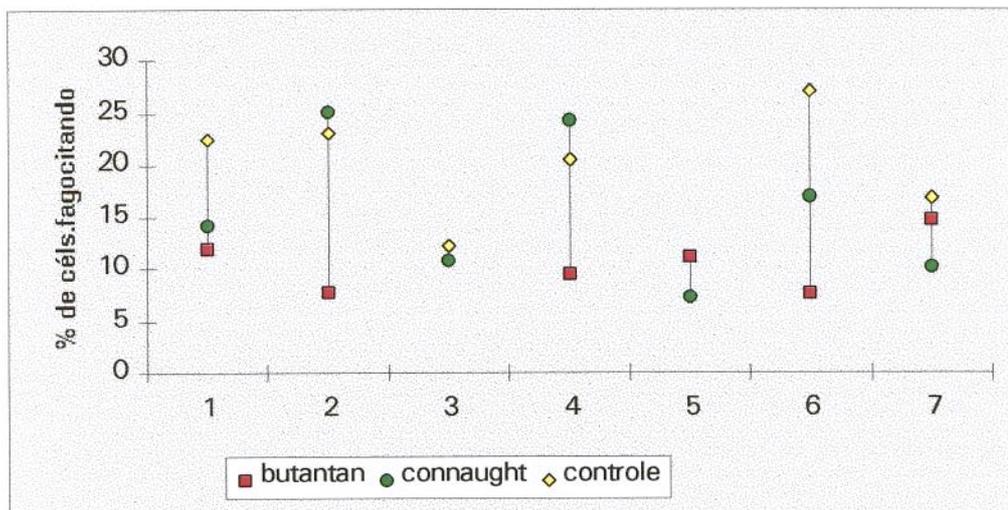
#### **4.1.1.3. Zimosan / Soro Imunizado**

Na tabela 3 é apresentado o percentual de macrófagos por animal e por grupo, que encontravam-se fagocitando partículas de zimosam opsonizadas com soro de

incubadas com soro de animal imunizado foi de 70,05 no grupo Moreau Butantan (DP = 3,71), 69,84 no grupo Connaught (figura 7) (DP = 3,87) e 68,86 no grupo Controle (DP = 2,33). A figura 3 apresenta um gráfico com os resultados, onde a análise não verificou diferença significativa para os grupos.

**Tabela 1.** Índice fagocitário (IF%) de macrófagos peritoneais de hamsters imunizados ou não com BCG (Moreau - Connaught) para partículas de zimosan não opsonizadas

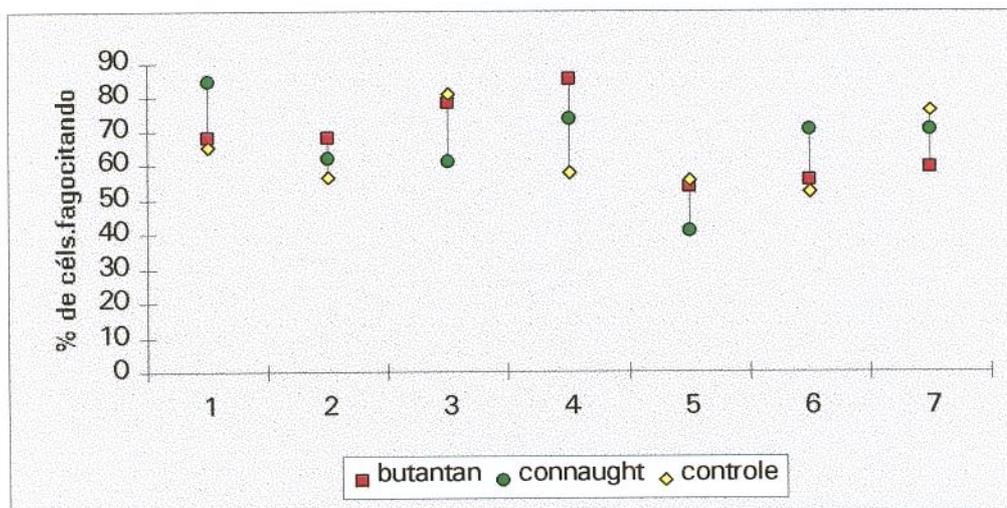
ANIMAL	GRUPO IA butantan	GRUPO IIA connaught	GRUPO IIA controle
1	11,91	14,21	22,44
2	7,66	25,09	23,14
3		10,72	12,18
4	9,37	24,26	20,51
5	11,09	7,22	
6	7,55	16,97	27,12
7	14,54	10,09	16,78
MÉDIA	10,34	15,5	20,36
DES. PAD.	1,88	4,35	1,85



**Figura 1.** Índice fagocitário de macrófagos para partículas de zimosan não opsonizadas

**Tabela 2.** Índice fagocitário (IF%) de macrófagos peritoneais de hamsters imunizados, ou não, com BCG (Moreau - Connaught) para partículas de zimosan opsonizadas com soro de animais não imunizados

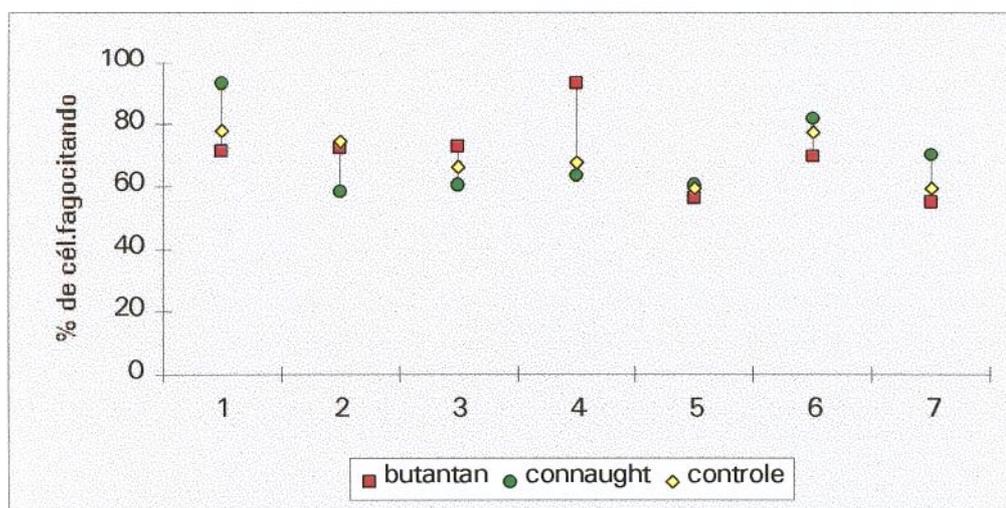
ANIMAL	GRUPO IB	GRUPO IIB	GRUPO IIIB
	butantan	connaught	controle
1	67,97	85,01	65,32
2	67,88	61,93	56,36
3	78,42	60,96	81,22
4	85,13	73,87	58,04
5	53,53	40,81	55,51
6	55,43	70,64	52,28
7	59,03	70,41	76,07
MÉDIA	66,76	66,23	63,54
DES. PAD.	3,54	4,14	3,42



**Figura 2.** Índice fagocitário de macrófagos para partículas de zimosan opsonizadas com soro não imunizado

**Tabela 3.** Índice fagocitário (IF%) de macrófagos peritoneais de hamsters imunizados ou não, com BCG (Moreau - Connaught) para partículas de zimosan opsonizadas com soro de animais imunizados

ANIMAL	GRUPO IC	GRUPO IIC	GRUPO IIIC
	butantan	connaught	controle
1	71,29	93,44	78,09
2	72,15	58,35	74,12
3	72,97	60,76	65,99
4	93,14	63,61	67,56
5	56,17	60,41	59,46
6	69,77	82,05	77,55
7	54,89	70,31	59,44
MÉDIA	70,05	69,84	69,86
DES. PAD.	3,71	3,87	2,33



**Figura 3.** Índice fagocitário de macrófagos para partículas de zimosan opsonizadas com soro de animais imunizados

#### **4.1.2. Análise estatística para índice fagocitário**

Pelo quadro de análise de variância pode-se concluir que somente a variável soro foi significativa, ou seja, para esta variável pode-se concluir que pelo menos um soro foi diferente dos demais a um nível de significância de 1%. A vacina se mostrou não significativa, podendo-se concluir que não existe diferença entre os índices fagocitários dos macrófagos dos animais imunizados com BCG Moreau e dos animais imunizados com BCG Connaught, isto pode ser visto também na análise de variância fixando os níveis.

Os testes de Tukey para soro e para soro dentro de cada vacina revelam que o soro imunizado e o soro normal apresentaram o mesmo resultado quanto ao índice, tanto ao nível de 5% quanto a 1%. O meio foi o que apresentou menor índice e diferiu significativamente dos demais.

O coeficiente de variação de 21% revela uma variabilidade um pouco alta dos dados em relação a média, mas esta variação não prejudicou a análise pois permitia detectar as diferenças significantes existentes.

## **4.2. CAPACIDADE FAGOCITÁRIA**

### **4.2.1. Zimosan / Meio**

Na tabela 4 tem-se o número de partículas não opsonizadas fagocitadas pelos macrófagos de cada animal em cada grupo. Observou-se que a capacidade fagocitária média de macrófagos para partículas de zimosan incubadas com meio foi de 287,28 partículas por 100 células no grupo Moreau Butantan (DP = 9,56), 237,14 no grupo Connaught (DP = 5,92) e 284,50 no grupo Controle (DP = 20,90). Na figura 4 os resultados estão representados por um gráfico onde a análise não observou diferenças significativas entre os grupos.

#### **4.2.2. Zimosan / Soro não imunizado**

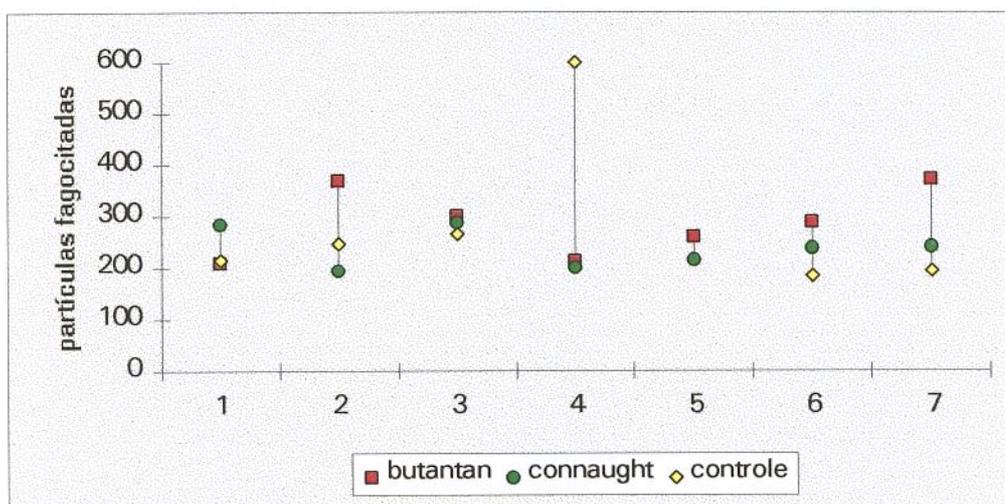
Na tabela 5 tem-se o número de partículas opsonizadas com soro de animais não imunizados, fagocitadas pelos macrófagos por animal e por grupo. O número médio de partículas de zimosan incubadas com soro de animais não imunizados fagocitadas por 100 células foi de 705,71 no grupo Moreau Butantan (DP = 23,80), 975,57 no grupo Connaught (DP = 22,02) e 778,42 no grupo Controle (DP = 18,97). Na figura 5 estão representados por um gráfico os resultados obtidos onde observou-se diferença significativa entre as vacinas e o controle para  $p = 5\%$  (nível de significância).

#### **4.2.3. Zimosan / Soro imunizado**

Na tabela 6 tem-se o número de partículas opsonizadas com soro de animais imunizados, fagocitadas pelos macrófagos por animal e por grupo. A média de partículas de zimosan incubadas com soro de animais imunizados fagocitadas por 100 células foi de 885,14 no grupo Moreau Butantan (DP = 22,38), 1150,57 no grupo Connaught (DP = 19,44) e 735,85 no grupo Controle (DP = 24,33). A figura 6 mostra um gráfico com os resultados obtidos, onde observou-se diferença significativa entre as vacinas e o controle para  $p = 1\%$  (nível de significância).

**Tabela 4.** Capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de hamsters imunizados, ou não, com BCG (Moreau - Connaught) para partículas de zimosan não opsonizadas

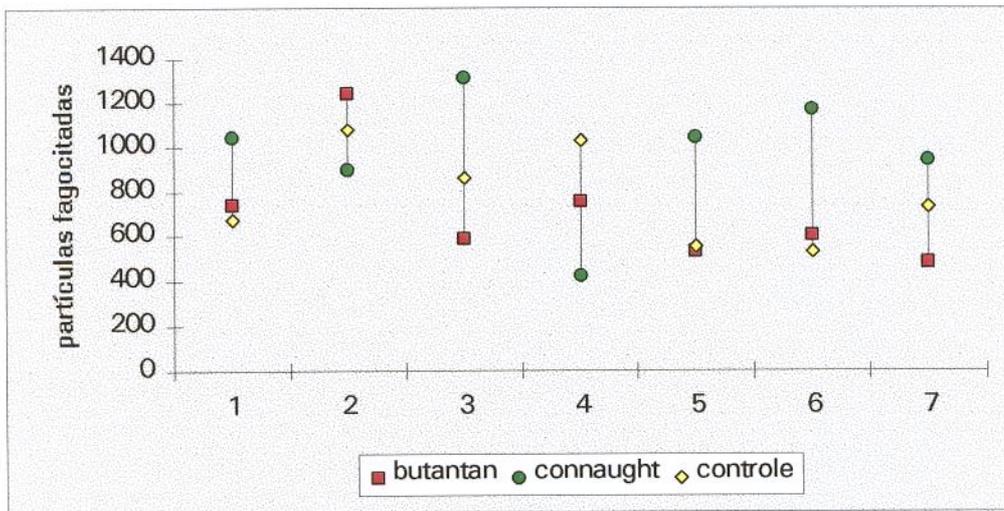
ANIMAL	GRUPO IA	GRUPO IIA	GRUPO IIIA
	butantan	connaught	controle
1	210	285	217
2	369	195	247
3	300	286	266
4	213	199	600
5	259	217	
6	288	236	183
7	372	242	194
MEDIA	287,28	237,14	284,5
DES.PAD.	9,56	5,92	20,9



**Figura 4.** Capacidade fagocitária de macrófagos para partículas de zimosan não opsonizadas

**Tabela 5.** Capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de hamsters imunizados, ou não com BCG (Moreau - Connaught) para partículas de zimosan opsonizadas com soro de animais não imunizados

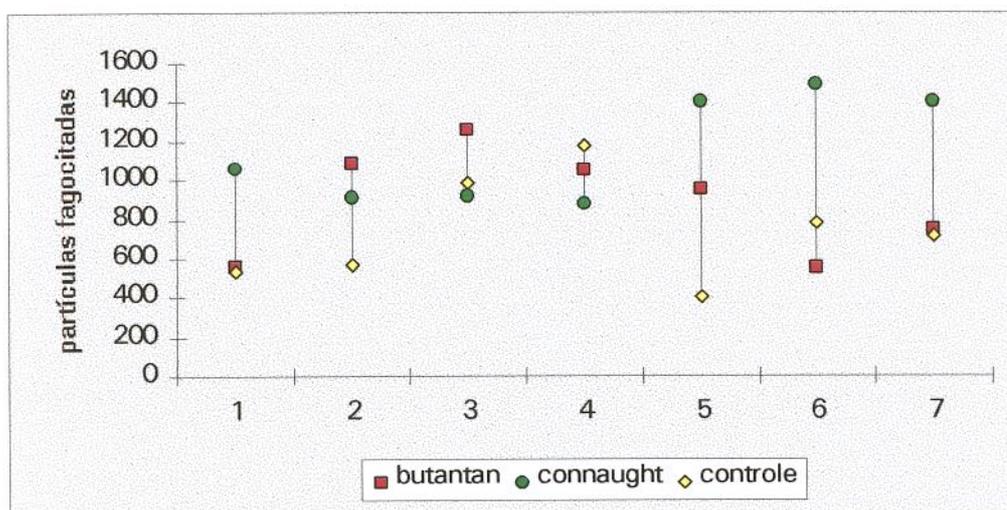
ANIMAL	GRUPO IB	GRUPO IIB	GRUPO IIIB
	butantan	connaught	controle
1	740	1040	673
2	1245	897	1075
3	590	1317	861
4	753	425	1024
5	533	1040	550
6	600	1170	534
7	479	940	732
MÉDIA	705,71	975,57	778,42
DES. PAD.	23,8	22,02	18,97



**Figura 5.** Capacidade fagocitária de macrófagos para partículas de zimosan opsonizadas com soro não imunizado

**Tabela 6.** Capacidade fagocitária de macrófagos peritoneais de hamsters imunizados, ou não, com BCG (Moreau - Connaught) para partículas de zimosan opsonizadas com soro de animais imunizados

ANIMAL	GRUPO IC	GRUPO IIC	GRUPO IIIC
	butantan	connaught	controle
1	562	1060	532
2	1084	908	569
3	1254	915	983
4	1050	881	1172
5	951	1400	400
6	550	1490	779
7	745	1400	716
MEDIA	885,14	1150,57	735,85
DES. PAD.	22,38	19,44	24,33



**Figura 6.** Capacidade fagocitária de macrófagos para partículas de zimosan não opsonizadas com soro de animais imunizados

#### **4.2.4. Análise estatística para capacidade fagocitária**

O quadro de análise de variância revela diferença sinificante para soro, vacina e como a interação soro / vacina se aproximou de 5% devemos fazer o desdobramento para verificar as diferenças. No quadro de análise de variância fixando níveis nota-se, que apenas para o fator meio as vacinas não apresentaram diferença significativa. O coeficiente de variação foi também bastante alto mas a mesma conclusão anterior é válida.

O teste de Tukey para o Controle, Moreau Butantan e Connaught indica que o meio foi o que apresentou menor capacidade de fagocitose e o soro imunizado e o não imunizado apresentaram o mesmo resultado.

Analisando o soro dentro de cada vacina pode-se notar que o soro não imunizado apesar de ter apresentado diferença significativa na análise de variância, não apresentou esta diferença no teste de Tukey, isto ocorreu porque a área de significância estava muito próxima de 5%, pode-se notar que neste caso o Butantan apresentou uma tendência de menor média.

Para o soro imunizado o grupo Controle apresentou a menor capacidade e o grupo Connaught apresentou a maior, sendo que o grupo Moreau Butantan ficou numa fase intermediária.

Para o meio não ocorreu diferença significativa entre as vacinas. No geral o Grupo Connaught foi o que apresentou a maior capacidade em comparação ao Grupo Moreau e ao Controle sendo que este apresentou a pior.

### **4.3. ANATOMO - PATOLÓGICO**

#### **4.3.1. Grupo Connaught**

Foram observadas lesões do tipo granulomatosa em linfonodo peri-hilar renal (figura 10), na bexiga de 1 animal e no baço, tanto na zona branca como na zona vermelha de 2 animais, presença de corpos arredondados calcificados, corpo psonomatoso (figura 14) na bexiga de 2 animais e infiltrado linfocitário intraepitelial no fígado de 2 animais. A tabela 7 apresenta as alterações observadas neste grupo.

**Tabela 7.** Alterações anátomo-patológicas no grupo Connaught

animal	rim 1	rim 2	fígado	bexiga	baço
1					
2				granuloma	granuloma
3					
4					granuloma
5					
6			linfócitos		
7			linfócitos		

#### 4.3.2. Grupo Moreau Butantan

Neste grupo observaram-se lesões granulomatosas no fígado (figura 11) de 3 animais, na bexiga (figura 13) de outros 3 animais e no baço (figura 12) de 2 animais, além do acúmulo de células epitelióides e linfóides no fígado e hiperplasia do tecido linfóide periarteriolar (zona T) de todos eles. As alterações observadas neste grupo encontram-se na tabela 8.

**Tabela 8.** Alterações anátomo-patológicas no grupo Moreau Butantan

animal	rim 1	rim 2	fígado	bexiga	baço
1					
2					
3			granuloma		granuloma
4			granuloma	granuloma	granuloma
5			granuloma		
6				granuloma	
7				granuloma	

#### 4.3.3. Grupo Controle

No grupo controle não foram observadas lesões granulomatosas nos tecidos analisados, nem mesmo acúmulo de células epitelióides ou linfóides no material analisado.

#### 4.4. RESULTADOS POR GRUPO DE EXPERIMENTAÇÃO

Nas tabelas 9, 10 e 11 são apresentados o peso dos animais no início do experimento, utilizado para o cálculo da dose das vacinas, os resultados obtidos na avaliação imunológica, índice e capacidade fagocitária e a presença ou não de alterações morfológicas a macro e a microscopia. Acompanhados de suas médias e respectivos desvios padrão.

**Tabela 9.** Resultados Grupo Moreau Butantan

animal	peso (g)	índice fagocitário			capacidade fagocitária			morfologia	
		meio	s. imuniz.	s.ñ.imun.	meio	s. imuniz.	s.ñ.imun.	macro	micro
1	148	11,91	71,29	67,97	210	562	740	normal	
2	180	7,66	72,15	67,88	369	1084	1245	normal	
3	186		72,97	78,42	300	1254	590	normal	alterado
4	203	9,37	93,14	85,13	213	1050	753	normal	alterado
5	196	11,09	56,17	53,53	259	951	533	normal	alterado
6	185	7,55	69,77	55,43	288	550	600	normal	alterado
7	186	14,54	54,89	59,03	372	745	479	normal	alterado
média	183,42	10,34	70,05	66,76	287,28	885,14	705,71		
des.padrão		1,88	3,71	3,54	9,56	22,38	23,8		

**Tabela 10.** Resultados Grupo Connaught

animal	peso (g)	índice fagocitário			capacidade fagocitária			morfologia	
		meio	s. imuniz.	s.ñ.imun.	meio	s. imuniz.	s.ñ.imun.	macro	micro
1	171	14,21	93,44	85,01	285	1060	1040	normal	
2	160	25,09	58,35	61,93	195	908	897	normal	alterado
3	200	10,71	60,76	60,96	286	915	1317	normal	
4	189	24,26	63,61	73,87	199	881	425	normal	alterado
5	164	7,22	60,41	40,81	217	1400	1040	normal	
6	183	16,97	82,05	70,64	236	1490	1170	normal	alterado
7	183	10,09	70,31	70,41	242	1400	940	normal	alterado
média		15,5	69,84	66,23	237,14	1150,57	975,57		
des.padrão		4,35	3,87	4,14	5,92	19,44	22,02		

**Tabela 11.** Resultados Grupo Controle

animal	peso (g)	índice fagocitário			capacidade fagocitária			morfologia	
		meio	s. imuniz.	s.ñ.imun.	meio	s. imuniz.	s.ñ.imun.	macro	micro
1	187	22,44	78,09	65,32	217	532	673	normal	normal
2	202	23,14	74,12	56,36	247	569	1075	normal	normal
3	198	12,18	65,91	81,22	266	983	861	normal	normal
4	195	20,51	67,56	58,04	600	1172	1024	normal	normal
5	168		59,46	55,51		400	550	normal	normal
6	182	27,18	77,55	52,28	183	779	534	normal	normal
7	165	16,78	59,44	76,07	194	716	732	normal	normal
média		20,36	68,86	63,54	284,5	735,85	778,42		
des.padrão		1,85	2,33	3,42	20,9	24,33	18,97		

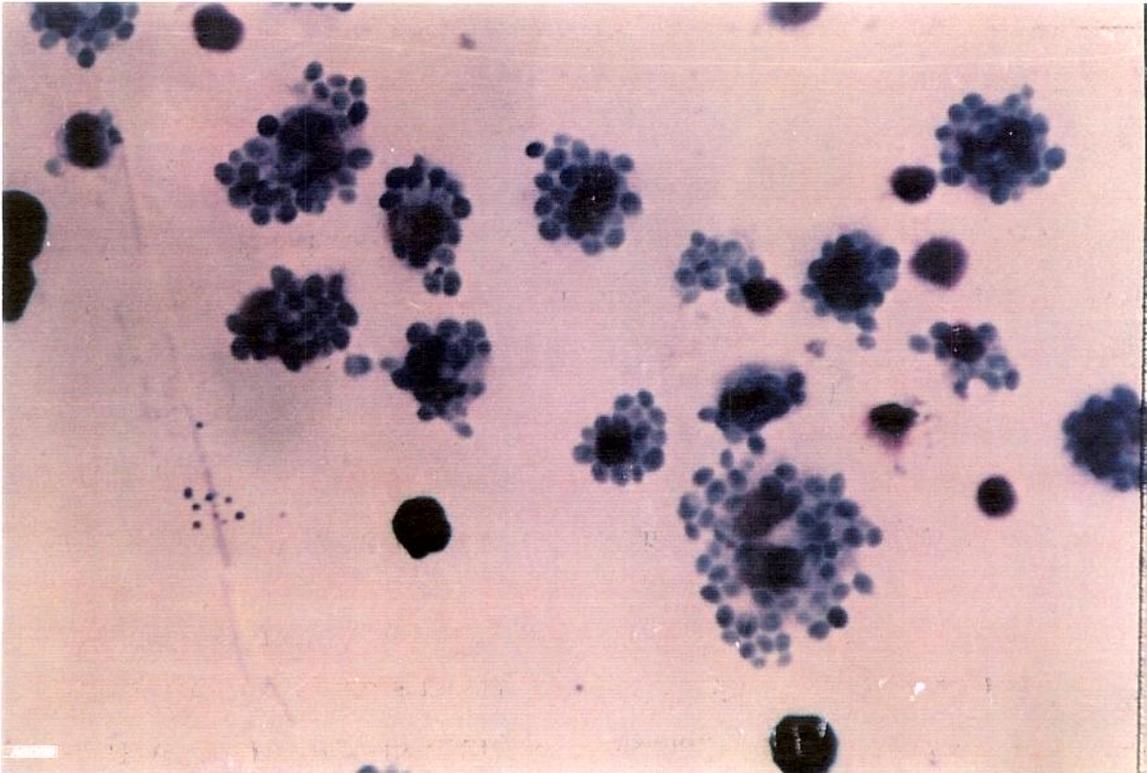


Figura 7. Macrófagos de hamsters imunizados fagocitando partículas de zimosan opsonizadas. (eozina azul de metileno May-Grünwald, aumento 1000X)

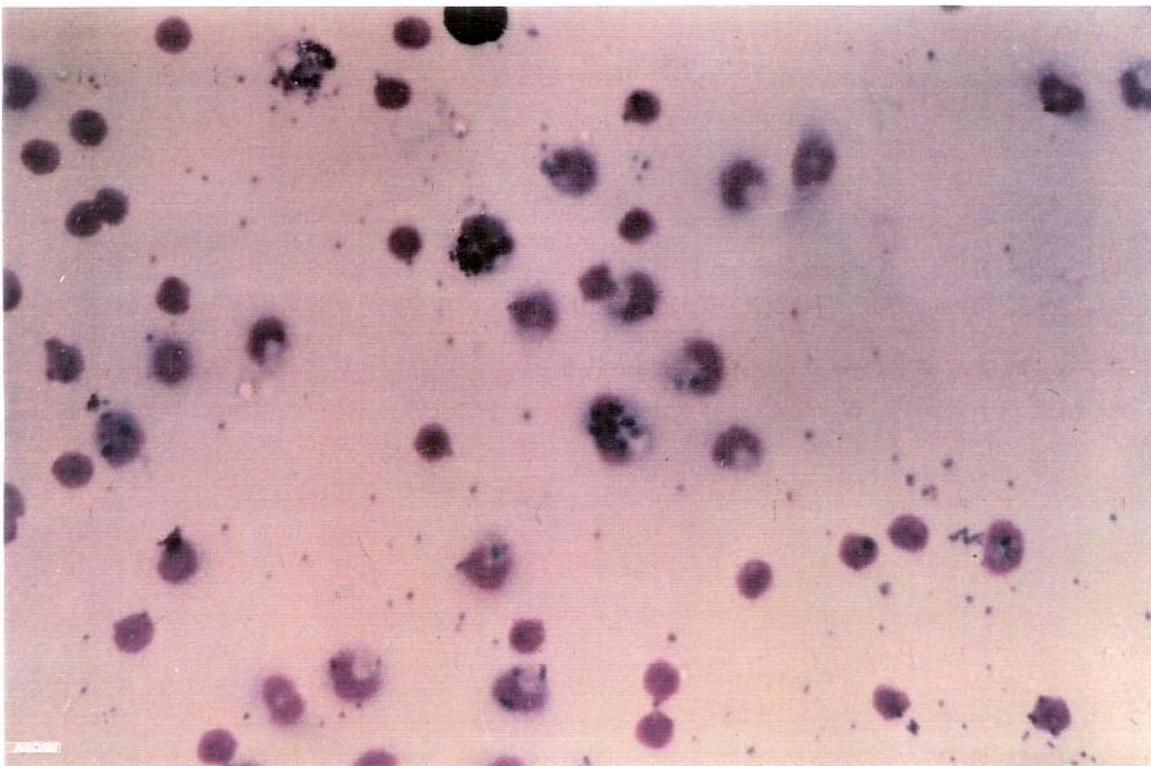


Figura 8. Macrófagos de hamster não imunizados fagocitando partículas de zimosan não opsonizadas. (eozina azul de metileno May-Grünwald, aumento 1000X)

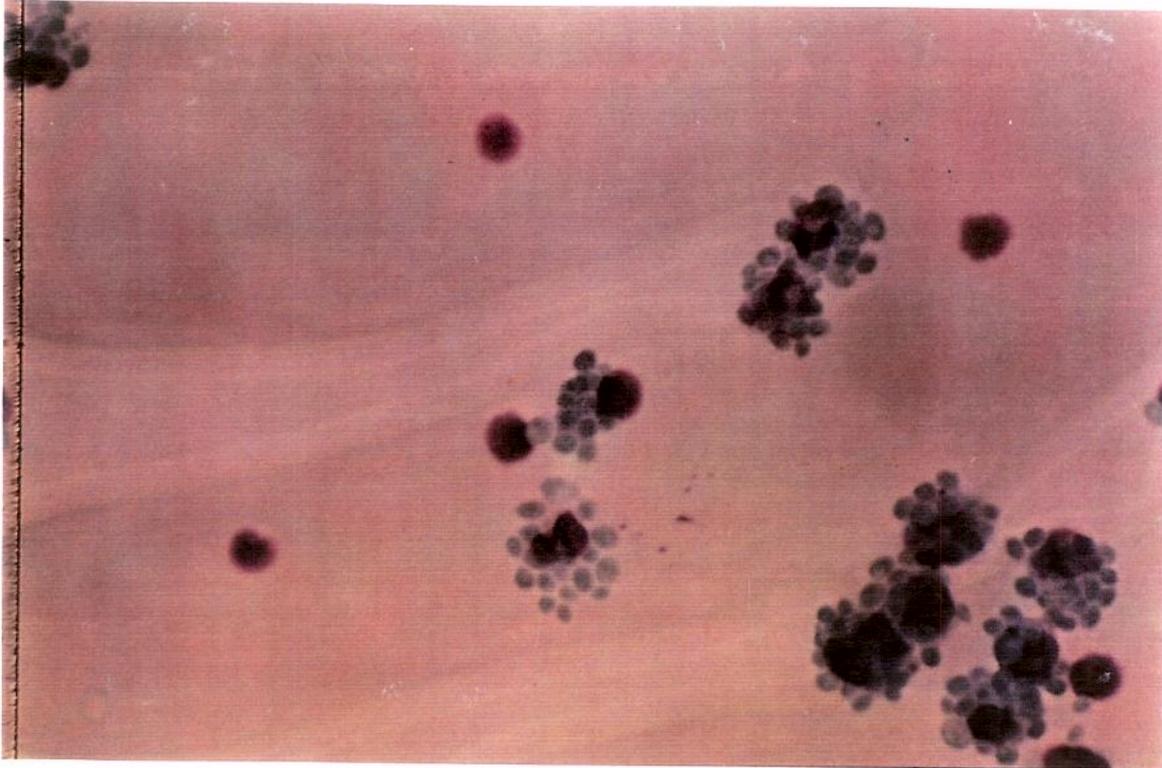


Figura 9. Macrófagos de hamster não imunizado fagocitando partículas de zimosan opsonizadas com soro imunizado. (cozina azul de metileno May-Grünwald, aumento 1000X)

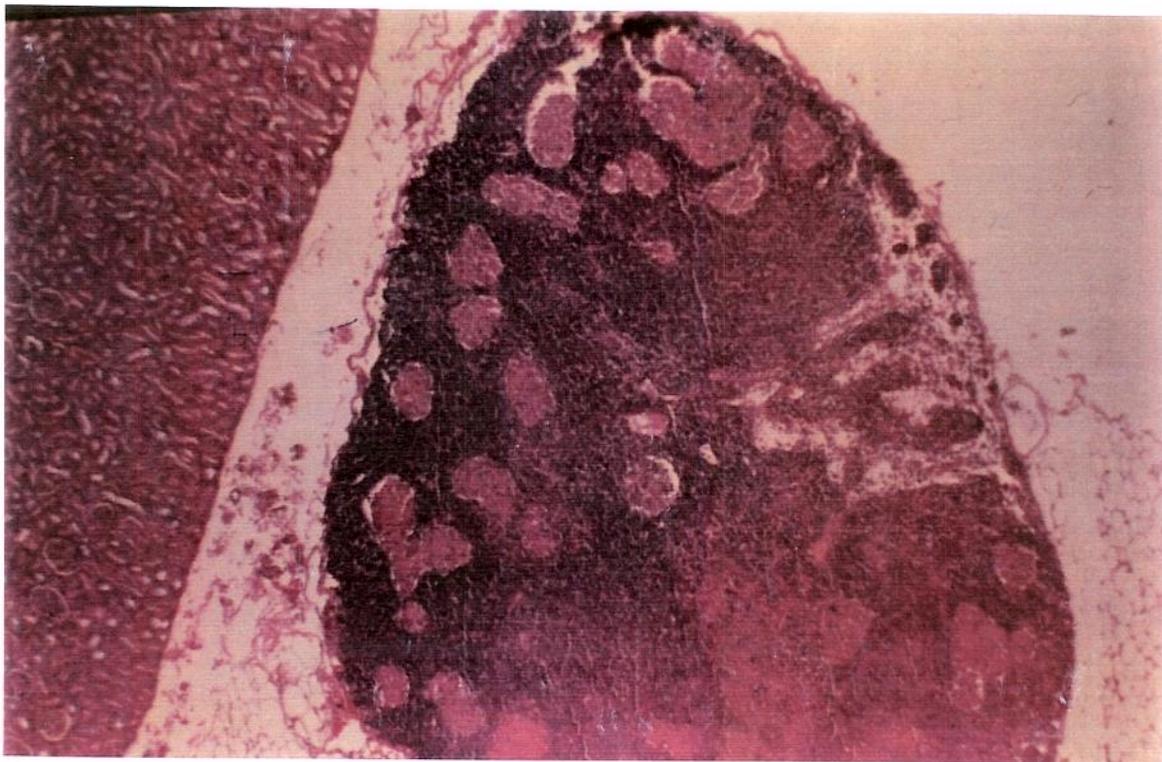


Figura 10. Linfonodo peri - hilar renal, apresentando lesão granulomatosa (Hematoxilina-eozina, aumento 100X)

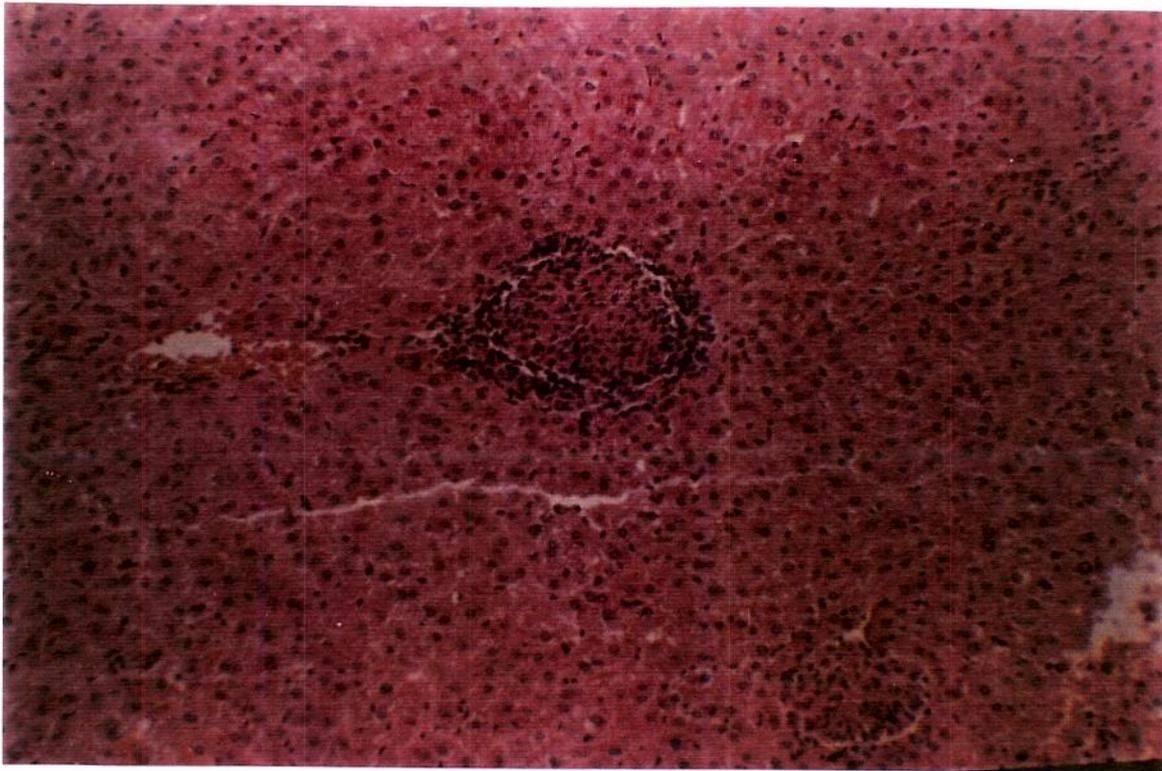


Figura 11. Lesão granulomatosa no fígado (Hematoxilina-eozina, aumento 200X)

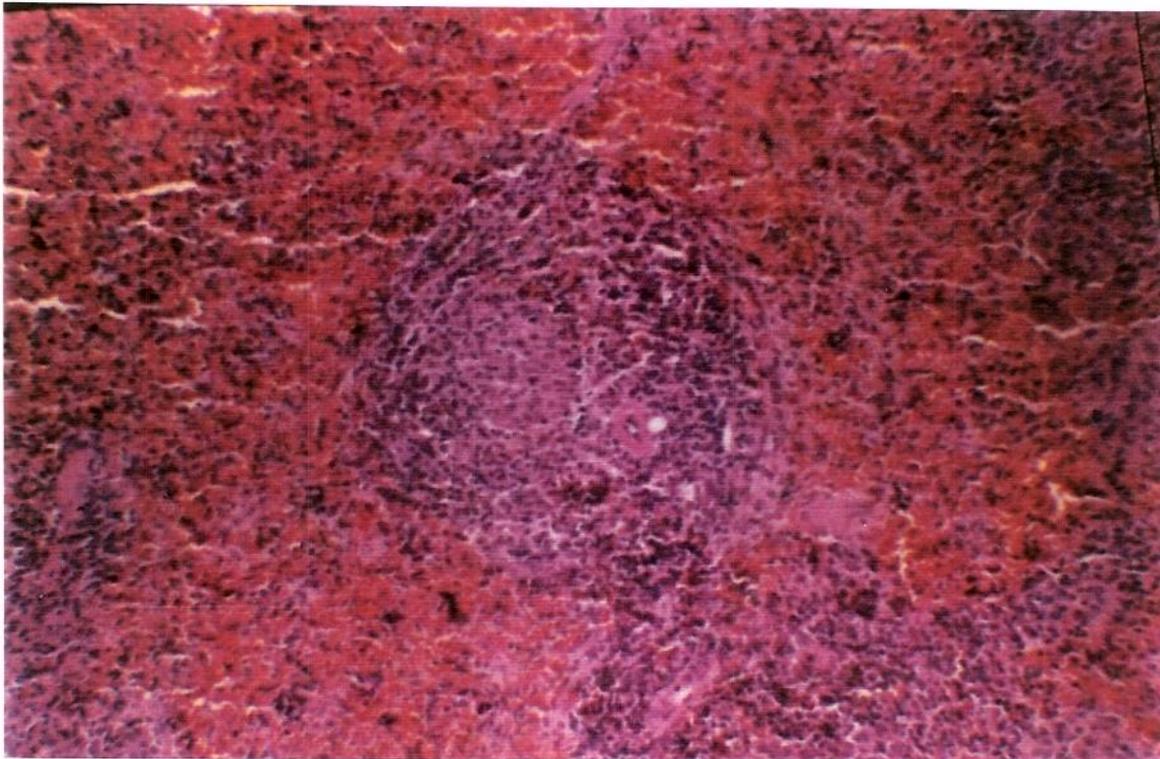


Figura 12. Lesão granulomatosa no baço (Hematoxilina-eozina, aumento 400X)

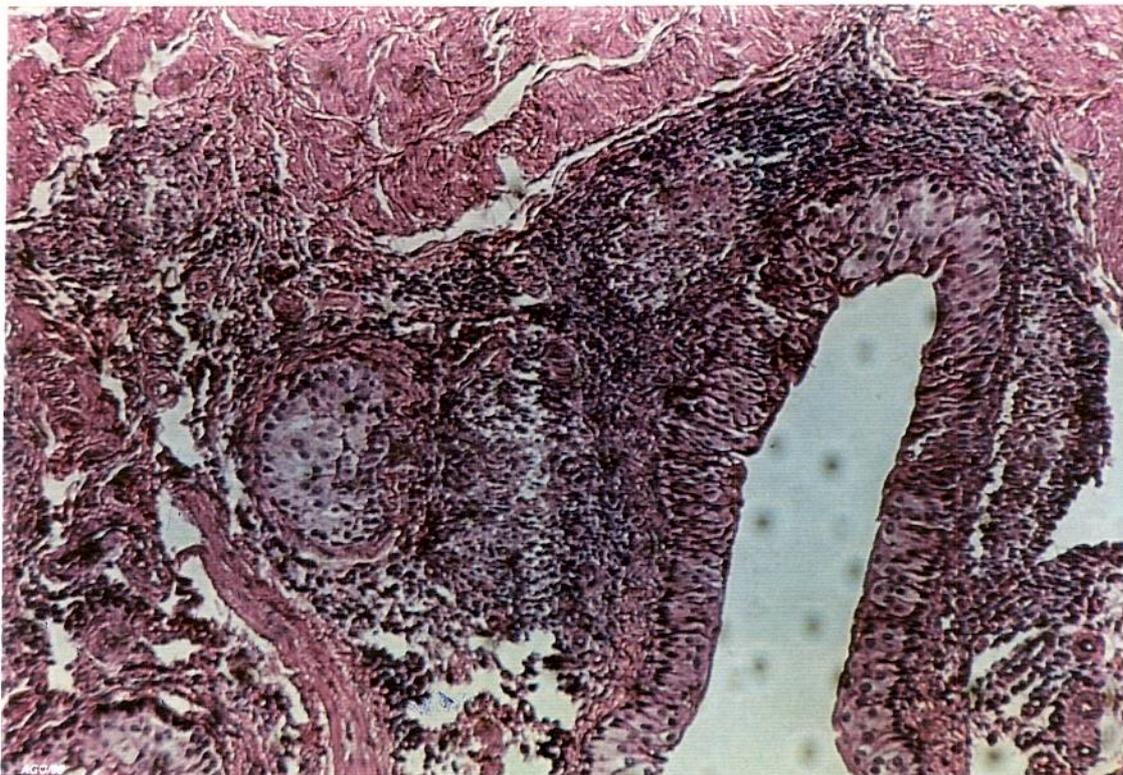


Figura 13. Lesão granulomatosa na bexiga com intenso infiltrado linfocitário (Hematoxilina-eozina, aumento 200X)

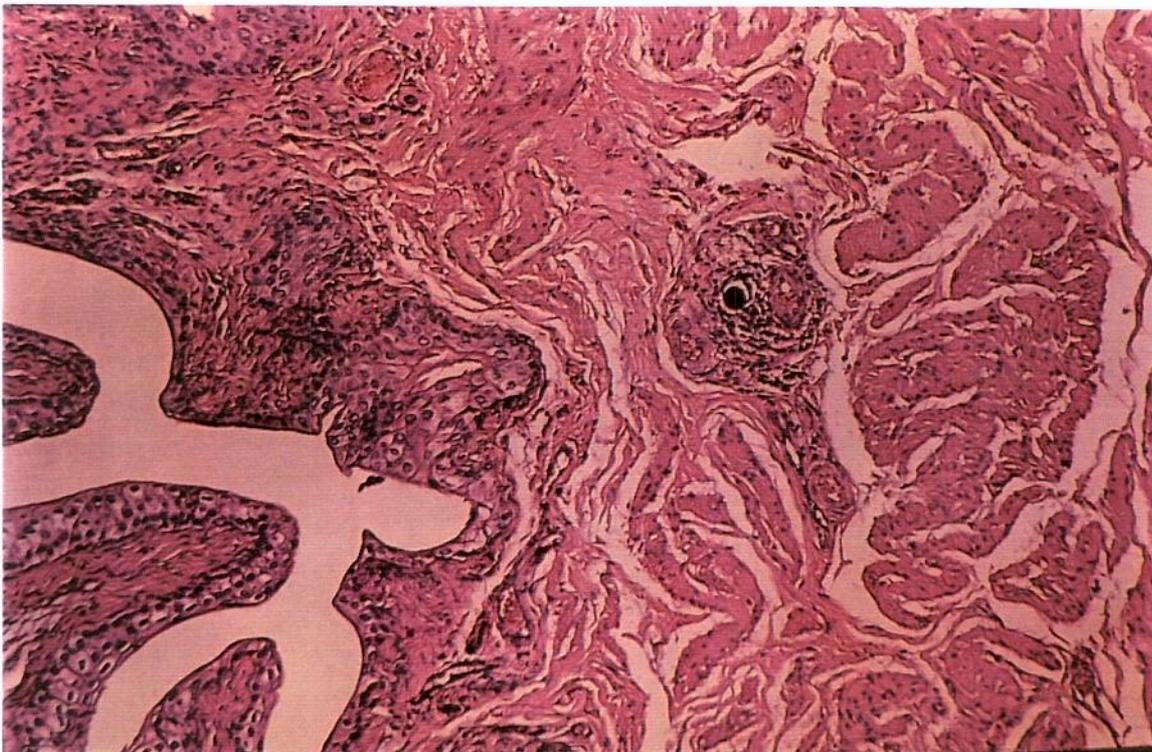
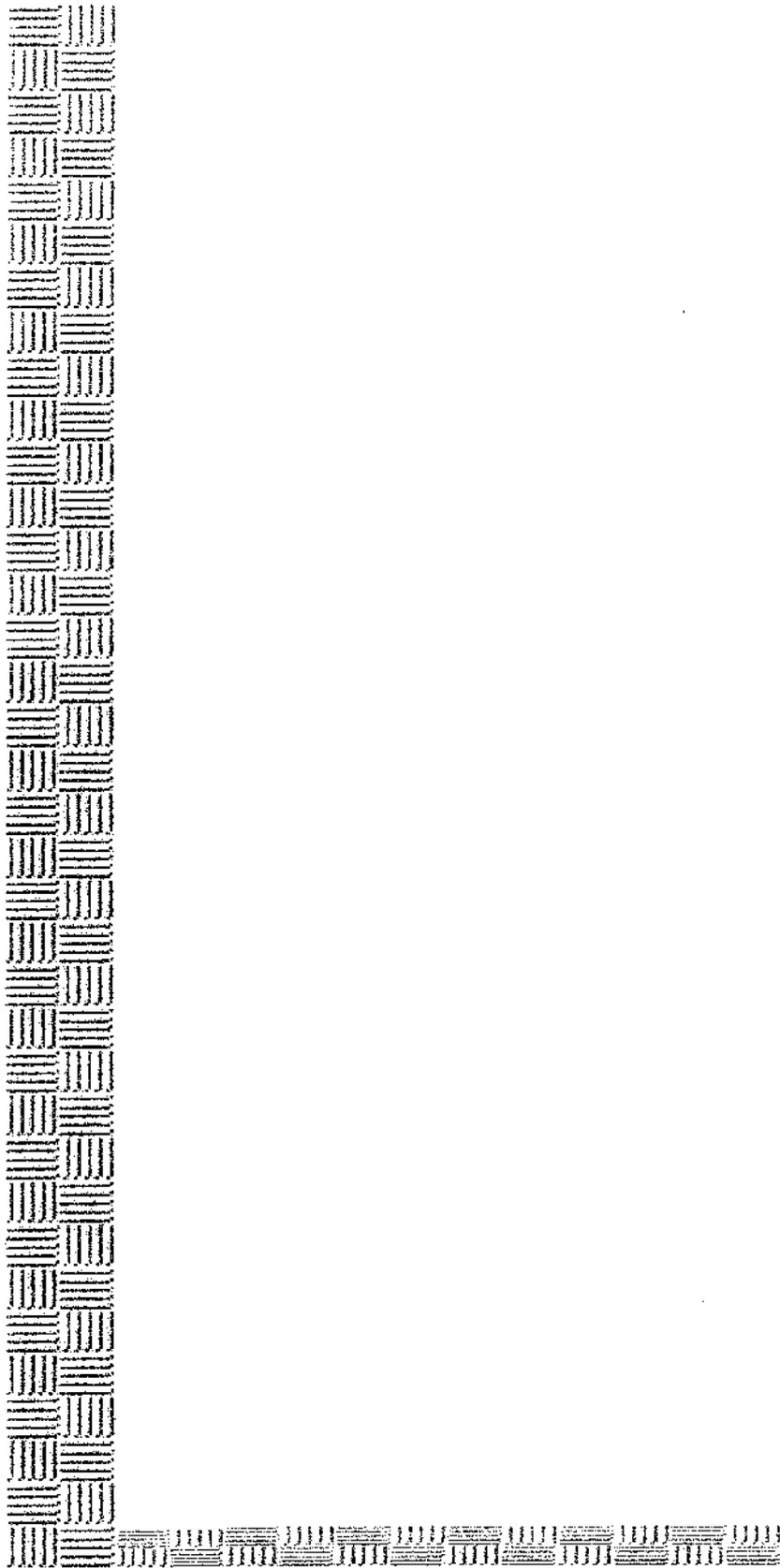


Figura 14. lesão calcificada na parede vesical (corpo psamomatoso) (Hematoxilina-eozina, aumento 200X)



## *5. Discussão*

## 5.1. MÉTODO

### 5.1.1. Grupos de Experimentação

A escolha do Hamster como animal de experimentação, deveu-se ao fato de ser um animal com sensibilidade comprovada ao BCG (SINHORINI,1983), de pequeno porte, de fácil manipulação, manutenção e controle em ambiente laboratorial para estudo de suas funções.

No início da vacinação os animais encontravam-se com seis meses de vida, pesando entre 148 e 203g. Tamanho suficiente para que não trouxessem dificuldades na sua manipulação e fêmeas pela facilidade da cateterização vesical. Foram empregados animais de linhagem semelhante, criados sob as mesmas condições.

Os animais foram submetidos ao estudo imunológico e anátomo-patológico trinta dias após a última administração de BCG intravesical. Este intervalo entre a última vacinação e o início da avaliação teve como finalidade evitar a influência do estresse, produzido nos animais pela manipulação durante o cateterismo, e devido a vida média dos macrófagos, de 20 a 100 dias. (BACH & LESAVRE,1981). Também em relação ao estudo anátomo-patológico dos diversos tecidos (baço, bexiga, fígado e rins) esse período não deveria trazer alterações, embora 80% das bactérias apresentam rápida degradação tanto “in vitro” como “in vivo” em 48hs, tem-se que 20% dos antígenos são mantidos dentro dos macrófagos (SPECTOR,1979). Além de que o granuloma produzido pelo BCG se caracteriza por ser uma reação inflamatória crônica, devendo portanto estar presente mesmo após esse período de 30 dias (SINHORINI,1983). Num grupo de pacientes tratados de câncer de bexiga com instilações intravesicais de BCG foi observado que os bacilos permaneciam no trato urinário até 16,5 meses após o término da terapia (BOWYER, 1995).

### **5.1.2. Protocolo de Administração do BCG**

A via de administração intravesical foi escolhida por ser aquela aceita e empregada nos protocolos clínicos de tratamento do câncer de bexiga, motivo desse nosso experimento. Também a dose do BCG empregado, nada mais é do que aquela empregada na clínica para seres humanos, onde encontrou-se o peso e o número de bacilos administrados por Kg e determinou-se proporcionalmente o quanto deveria ser administrado aos animais em relação ao seu peso. Método empregado em outros trabalhos experimentais (CORNELL,1993; MORALES, 1986; RATLIFF,1986; SHAW, 1991; STULDRELER,1992). O número e a frequência de aplicações também seguiu o protocolo empregado pela maioria dos autores no tratamento do câncer de bexiga (MORALES;1976, HERR,1986; SHAW,1991). Escolheu-se o BCG Moreau Butantan por ser aquele disponível e empregado nesta instituição e o BCG Connaught por ser utilizado em diversos serviços e estar presente em trabalhos estrangeiros. Outro fato é não haver trabalhos comparando o BCG Moreau Butantan com outras cepas.

### **5.1.3. Avaliação Imunológica**

As células que possuem a capacidade de fagocitar agentes infecciosos constituem o mais efetivo componente do sistema de defesa do organismo. Uma vez tendo chegado ao foco inflamatório o fagócito precisa reconhecer para em seguida aderir a partícula a ser fagocitada. Este reconhecimento se faz principalmente através da ligação de receptores para Fc da Ig-G (fragmento de imunoglobulina-G, ponto de ligação para receptores de algumas células) e para C3b (proteína do sistema do complemento com capacidade de depositar-se sobre partículas biológicas e responsável pela sua quebra enzimática), que estão presentes na membrana dos fagócitos e possuem estruturas complementares na superfície das bactérias ou partículas. O C3b é uma partícula com função de opsonina do sistema do complemento que tem um importante papel na resistência anti-infecciosa, uma vez que contribui para a lise das bactérias. Por isso a fagocitose é facilitada se a partícula tiver sido previamente opsonizada, por exemplo pelo C3. Uma molécula de glicoproteína conhecida como fibronectina, que também apresenta a

atividade opsonizante tem sido relacionada ao mecanismo de ação do BCG (RATLIFF,1988; BEEZHOLD,1992). A correlação entre o desenvolvimento de uma resposta imunológica ao BCG e a sua resposta terapêutica já esta bem demonstrada, o que precisa ser compreendido são os mecanismos moleculares envolvidos na apresentação do BCG às células com atividade imunológica e a subsequente indução da resposta imune local e sistêmica (RATLIFF,1987).

## **5.2. RESULTADOS**

As neoplasias malignas constituem um problema de grandes proporções para a medicina de um modo geral, pelos fatores envolvidos na sua gênese, bem como por tratar-se de uma doença que tem origem na proliferação desordenada das células do próprio indivíduo. Vários anos se passaram procurando-se descobrir medicamentos ou processos físico-químicos que levassem a eliminação dessas neoformações, porém tudo o que se conseguiu foram agentes que em detrimento da regressão tumoral, produziam agressões a outros tecidos normais. Na busca de um tratamento mais eficiente pesquisadores voltaram-se para o estudo dos fatores responsáveis pelo aparecimento e desenvolvimento dessas neoplasias (ANDRESEN,1990). Baseando-se no conhecimento e na existência de um sistema de vigilância responsável pela defesa do organismo e de sua relação com o aparecimento e a progressão das neoplasias ou ao menos de sua passividade frente as mudanças, surgiram os primeiros agentes imunomoduladores (GOLUMBECK,1993). A partir de uma avaliação dos mecanismos pelos quais os tumores produzem metástases, conseguiram subsídios para a compreensão e posterior manipulação clínica do paciente com câncer (KELLY,1986). Na esperança de que o conhecimento desses diferentes mecanismos, utilizados pelas células para infiltrarem os tecidos e promoverem metástases para outras áreas, possam fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas terapias, mais específicas que a atual quimioterapia convencional. Têm-se aplicado em conhecer os fatores que favorecem o crescimento e as transformações a que estão expostas as células tumorais, bem como o conhecimento do processo tumoral individualmente que serão

fundamentais para o desenvolvimento da terapia. Existem muitas evidências sugerindo que os tumores malignos apresentam sobre sua superfície antígenos específicos reconhecidos pelas células T, ou pelo menos aspectos do tecido normal da mesma origem e do mesmo estágio de diferenciação. Esses antígenos associados ao tumor seriam identificados e ocorreria uma migração de linfócitos T-Helper, células NK e acúmulo de macrófagos, havendo uma interação entre estas e as células tumorais caracterizando a resposta imune (GOLUMBEK,1993). A pergunta que se coloca é: Estas reações exercem efeitos protetores contra os tumores? Não esquecendo que a imunoterapia não é um tratamento específico e sim uma possibilidade terapêutica cujo papel é propiciar condições para que o paciente possa reagir ao tumor.

Abordou-se a imunoterapia ativa não específica, isto é, aquela que estimula a imunidade antitumoral intrínseca do indivíduo com o auxílio de adjuvantes, ou microorganismos ou substâncias imunomoduladoras que ativam os macrófagos, as células NK e outros efetores não específicos. Empregamos o BCG, importante mediador da resposta biológica, que aumenta os linfócitos Helper ao mesmo tempo que deprime as células supressoras (STUHL DREHER,1992), através de instilações vesicais e avaliamos a sua ação através da observação da formação de granuloma definido como uma reação inflamatória crônica focal, caracterizada pelo acúmulo e proliferação de leucócitos predominantemente do tipo mononuclear, com certo grau de organização tecidual das células que compõem a lesão, produzida pela penetração do BCG na parede vesical. Observou-se a formação de lesões granulomatosas na parede vesical ao estudo histológico de alguns animais como mostram as tabelas 7 e 8, confirmando a penetração do bacilo na parede vesical desses animais, sendo que em nenhum animal do grupo controle este tipo de lesão foi observada, demonstrando que estas lesões se formaram pela resposta ao BCG e não por outras partículas que porventura estivessem sendo instiladas na bexiga destes animais durante o experimento. No entanto as lesões granulomatosas não foram observadas em todos os animais. Tal resultado pode ser justificado por estudos histopatológicos que têm demonstrado que a ação do BCG na parede ocorre apenas em áreas onde o urotélio encontra-se lesado (RATLIFF,1987). Verificamos também a formação de lesões granulomatosas, tanto no fígado como no baço de alguns animais,

demonstrando que o bacilo instilado na bexiga ultrapassa os limites da parede vesical produzindo uma ação sistêmica, e o acúmulo de células epitelióides e linfóides, que são responsáveis pela imunidade celular, nestes mesmos órgãos de outros animais que não apresentaram granuloma, em concordância com a literatura (D'ANCONA,1988). Pelo processo empregado de avaliação imunológica, realizado do mesmo modo para os três grupos [Connaught, Moreau (Butantan) e Controle]. Após a fixação dos macrófagos em lâmina, contou-se o número de partículas por eles fagocitadas, determinando a capacidade fagocitária e também o número de macrófagos que estavam fagocitando, determinando o índice fagocitário. A análise estatística destes resultados demonstrou que o índice fagocitário dos macrófagos para partículas de zimosan opsonizadas, ou seja na presença do complemento, tanto para o soro de animal imunizado com BCG como para o soro de animal não imunizado mostrou-se superior ao índice de fagocitose dos macrófagos para partículas não opsonizadas para  $p < 0,001$ . Verificou-se portanto, que para o macrófago exercer a sua função fagocitária não se faz necessária a presença do complemento, mas a sua presença propicia um incremento desta função. O estudo das características de uma lesão granulomatosa induzida por agente antigênico na ausência de resposta imune revelou que a lesão sem resposta imune associada tem seu ápice em torno da segunda semana após a inoculação e se torna imperceptível, à visão desarmada, após um mês. No entanto a lesão no local onde há resposta imune é marcadamente mais agressiva e persiste por todo o tempo em que se pode observar. E a reinoculação de BCG nos animais produziu uma reação de hipersensibilidade com aumento da atividade celular no local do granuloma, levando a concluir que a resposta de hipersensibilidade ao BCG influencia a lesão induzida por este antígeno (SINHORINI,1983).

Ainda em relação ao índice fagocitário observou-se que não houve diferença significativa entre os resultados do grupo Connaught e do grupo Moreau Butantan, portanto o poder de ativação dos macrófagos pelos dois BCG's por esta análise demonstrou ser semelhante. Os mesmos resultados observados para o índice fagocitário em relação ao soro, verificamos para a capacidade fagocitária, ou seja, a ausência do soro (complemento) implica num menor poder fagocitário dos macrófagos, sendo que quando os macrófagos foram expostos ao soro, tanto imunizado pelo BCG como não, ocorreu um

incremento de sua capacidade. A semelhança de resultados para soro imunizado e não imunizado demonstra que o BCG não produz um incremento da resposta imune humoral e sim um aumento da resposta celular local na presença do complemento. Comparando-se a capacidade fagocitária dos macrófagos para partículas opsonizadas, verificou-se que o grupo Controle ficou com a menor média e que o grupo Connaught com a melhor, seguido pelo grupo Moreau Butantan, reafirmando a ativação do sistema retículo-endotelial pelo BCG, demonstrada pela maior avidéz fagocitária das células expostas a ele. O BCG é um importante agente imunomodulador, pois produz um aumento da atividade das células T e das células NK (RUBENSTEIN, 1991).

### **5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O experimento foi definido dentro de critérios estabelecidos afim de minimizar os efeitos de outros fatores que não aqueles objetos do estudo. Para tanto foram empregados animais isogênicos, em igual número de repetições, vivendo no mesmo ambiente, divididos em grupos por sorteio dentro dos princípios definidos de casualização, experimento inteiramente ao acaso.

“Só a casualização garante que unidades com características diferentes tenham igual probabilidade de serem designadas para os grupos” (BUSSAB, 1991).

Foi escolhido o Hamster como unidade experimental, divididos em grupos submetidos ao tratamento com BCG Connaught e Moreau Butantan além de um grupo controle, caracterizando as variáveis em análise e seus efeitos foram quantificados pelo índice e pela capacidade fagocitária dos macrófagos. Para cada uma delas analisou-se os macrófagos postos em contato com partículas de zimosan não opsonizadas, opsonizadas pelo soro não imunizado e opsonizadas pelos soros imunizados, para os três grupos independentemente.

Os resultados foram distribuídos em tabelas, onde encontrou-se as médias para cada tratamento e seus respectivos desvios padrão, unidade de dispersão ou variabilidade que tem a finalidade de tornar mais informativa a análise de dados. Com estes dados ordenados e com suas médias e desvios padrão determinados, aplicou-se a análise de variância afim de concluir se os resultados eram estatisticamente diferentes uns dos outros, para níveis de significância de 1% e 5% ou seja, a porcentagem de chance das conclusões estarem erradas.

Quando a análise de variância mostrava que as médias não eram estatisticamente iguais, submetiam-se os dados ao teste de hipóteses. O teste de hipóteses é uma fórmula que geralmente leva o nome do seu autor e que tem a finalidade de determinar a diferença mínima significativa, para que se possa inferir os resultados obtidos com as amostras, para a população geral.

Neste estudo foi empregado o teste de hipóteses de Tukey:

$$D.M.S. = q \sqrt{\frac{QMR}{r}}$$

onde:  $q$  é o valor desejado do nível de significância,

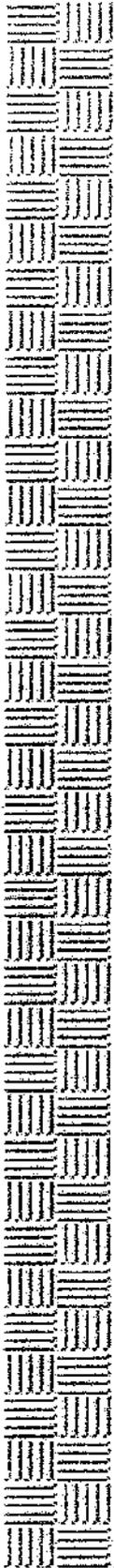
$QMR$  é o quadrado médio do resíduo da análise de variância e

$r$  é o número de repetições de cada tratamento.

A escolha do método adequado para comparar as médias exige que se leve em consideração, tanto o nível de significância (probabilidade de rejeitar a hipótese de que as médias são iguais, quando são iguais) e o poder do teste (probabilidade de rejeitar a hipótese de que as médias são iguais, quando são diferentes). A intenção é de que o nível de significância seja baixo e o poder do teste seja alto. Como a idéia era de rejeitar as hipóteses de que as médias fossem iguais com maior confiança, empregou-se o teste de Tukey, pois apresenta baixo nível de significância.

A análise dos resultados do índice fagocitário dos macrófagos para partículas de zimosan opsonizadas com soro de animal imunizado por uma, ou outra vacina, não apresentou diferença significativa, porém quando comparados com os macrófagos que fagocitaram partículas de zimosan opsonizadas com soro de animal não imunizado observou-se diferença significativa para um nível de significância de 1%. Assim pode-se afirmar que ocorreu uma estimulação do sistema imunológico após o uso do BCG, detectável pela análise do índice fagocitário dos macrófagos e que se mostrou semelhante para os BCG's Connaught e Moreau Butantan.

A capacidade fagocitária também foi maior para partículas de zimosan opsonizadas com soro de animal imunizado em relação às partículas opsonizadas com soro de animal não imunizado. Além de terem sido observadas nesta análise diferenças significativas entre os grupos do mesmo tratamento. Os macrófagos do grupo Connaught, tanto aqueles que fagocitaram partículas de zimosan opsonizadas com soro de animal não imunizado como aqueles que fagocitaram partículas de zimosan opsonizadas com soro de animal imunizado apresentaram uma capacidade fagocitária superior à dos macrófagos do grupo Moreau Butantan e estes em relação aos do grupo controle, para um nível de significância de 1% para o soro de animal imunizado e de 5% para o soro de animal não imunizado. Onde podemos concluir que o BCG Connaught apresentou por esta análise um maior potencial de estimulação que o BCG Moreau Butantan e este por sua vez foi superior ao do controle.



## ***6. Conclusões***

Através da análise dos resultados concluiu-se que:

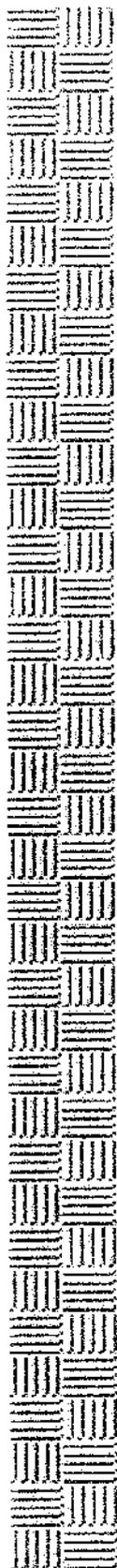
1. A presença de reação granulomatosa e/ou de células epitelióides e linfóides no estudo anátomo-patológico dos rins, fígado, bexiga e baço dos animais demonstrou que o BCG não só penetra na parede vesical como também produz uma reação sistêmica quando administrado por via intravesical;
2. A ação fagocitária dos macrófagos peritoneais de hamsters imunizados com BCG, tanto Moreau Butantan como Connaught, foi superior a do grupo controle;
3. O índice fagocitário dos macrófagos que receberam BCG Connaught e Moreau Butantan foi semelhante, portanto por esta análise os dois BCG's apresentaram o mesmo poder de ativação imunológica; no entanto o BCG Connaught apresentou as melhores médias na contagem de partículas fagocitadas (capacidade fagocitária) demonstrando por esta análise uma estimulação superior aquela produzida pelo BCG Moreau Butantan.



## ***7. Summary***

In order to evaluate and compare the local and the systemic effects produced by the Connaught and Moreau Butantan BCG strains, 21 hamsters (*Mesocricetus auratus*) were studied divided in three groups of seven animals. In the control group I only saline solution 0,9% was instilled. In the group II Moreau Butantan BCG, 100mg/ml and  $10^8$  bacillus/ml (Butantan Institute - São Paulo - Brazil) and in the group III Connaught BCG (Connaught Laboratories Limited, Willowdale - Ontario - Canada) lyophilized with 27mg/ml and  $10^9$  bacillus/ml, for six weeks in intravesical instillation weekly. After 30 days of the last instillation the animals were sacrificed and the peritoneals macrophages were made for the zimosan particles incubated in normal and immunized with Connaught and Moreau Butantan hamster serum (receptor detection for C3) and for the zimosan particles nonopsonized.

The phagocytosis for the immunized animals increased more than in the control group and Connaught presented the best results, however the immunized animals serum had the same potency as the normal serum in the zimosan opsonization. By the histopathological evaluation, granulomatous in immunized animals bladder wall, as well as other organs were observed (liver, spleen), in addition to an infiltration of mononuclear cells and lymphocytes, showing the BCG penetration through the bladder wall reaching other organs and making a systemic action with the immunological activation.



*De acordo com:*

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS;*

*NBR 6023 - Referências Bibliográficas Rio de Janeiro. 1989. 19p*

*NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of Journals Indexed in Index Medicus.*

*Washington, 1989. 18p. (NHI Publication, nº 89.267)*

## ***8. Referências bibliográficas***

- ADOLPHS, H.D.; THIELE, J.; KIEL, H. - Inhibition of experimental bladder tumor induction by systemic BCG treatment. **Eur Urol**, Basel, v. 7, p. 35-8, 1981.
- ALTHAUSEN, A.F.; PROUT, G.R. Jr.; DAL, J.J. - Non-invasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma *in situ*. **J. Urol.**, Baltimore, v. 116, p. 575-80, 1976.
- AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. **Manual for Staging Cancer 1983**. Philadelphia, JB Lippincott, 1983, 171p.
- ANDERSTRÖM, C.; JOHANSSON, S.; NILSSON, S. - The significance of lamina propria invasion on the prognosis of patients with bladder tumors. **J. Urol.**, Baltimore, v. 124, p. 23-6, 1980.
- (ANÔNIMO). BCG: Bad news from India. **Lancet**, London, v. 1, p. 73-4, 1980.
- ANDRESEN, R. - Adoptive transfer of tumor cytotoxic macrophages generated "*in vitro*" from circulating blood monocytes: a new approach to cancer immunotherapy. **Cancer Res**, Baltimore, v. 50, p. 7450-6, 1990.
- AUERBACH, O.; GARFINKELL, S. - Histologic changes in the urinary bladder in relation to cigarette smoking and use of artificial sweeteners. **Cancer**, Philadelphia, v. 64, p. 987-92, 1989.
- BACH, J.F.; LESAVRE, P. **Immunologia**. Roma, Marrapese Editore, 1981, 266p.
- BALDWIN, R.; PIMM, M.V. - BCG in tumor immunotherapy. **Adv Cancer Res**, Basel, v. 28, p. 91-147, 1978.
- BARLEBO, H.; SORENSEN, B.L.; OHLSEN, A.S. - Carcinoma *in situ* of the urinary bladder: flat intra-epithelial neoplasia. **Scand J Urol Nephrol**, Oslo, v. 6, p. 213-23, 1972.

- BAST,R.C.; ZBAR,B.; BORSOS,T.; RAPP, H.J. - BCG and cancer. **N Engl J Med**, Boston, v. 290 p. 1413-20,1972.
- BEEZHOLD, D.H.; PERSONIUS, C. - Fibronectin fragments stimulate tumor necrosis factor secretion by human monocytes. **J of Leukocyte Biology**, Bethesda, v. 51, p. 59-64,1992.
- BHATTCHARYYA, S.; CHAKRABARTY, N.G.; CHATTOPA, D.U. - Phagocyte activity of the tumor associated macrophages in relations to tumor growth: Modulation with levamisole. **Neoplasma**, Bratislava, v. 33, p. 519-26,1985.
- BLOMJOUS,C.E.M.; VOS,W.; SCHIPPER,N.W.; VYTERLINDE,A.M.; BAAK,J.P.A.; DE VOOGT,H.J.; MEIJER,C.J.L.M. - The prognostic significance of seletive nuclear morphometry in urinary bladder carcinoma. **Hum Pathol**, Philadelphia, v. 21, p. 409-13,1990.
- BOLKIER,M.; MOSKOVITZ,B.; GINESIN,Y.; LEVIN,D.R. - Effect of distilled water and bacillus Calmette-Guerin on exfoliated bladder tumor cells. **Eur Urol**, Basel, v. 19, p. 319-21,1991.
- BOWYER, L.; HALL, R.R.; READING, J.; MARSH, M.M. - The persistence of bacille Calmette-Guerin in the bladder after intravesical treatment for bladder cancer. **Br J Urol**, Edinburgh, v. 75, p. 188-92,1995.
- BROSSMAN,S.A. - Indications for BCG use in carcinoma in situ. **Urology**, Ridgewood, v. 37, p. 12-5,1991.
- BUSSAB,W. O.; MORETTIN,P. A. - Estatística Básica, Métodos Quantitativos. Atual Editora, São Paulo, 1991.
- BYAR, D.; BLACKARD, C. - Comparison of placenbo, pyridoxine and topical thiotepa in preventing recurrence of stage I bladder cancer. **Urology**, Ridgewood, v. 10, p. 556-61,1977.

- CATALONA, W.J. - Urothelial Tumors of the Urinary Tract. In Walsh P.C.; Retik A.B.; Stamey T.A.; Vaughan Jr, E.D. (ed) **CAMPBELL'S UROLOGY**. 6. ed. Philadelphia, Saunders, 1992. 3v.
- CASCINELLI, N.; VAGLINI, M.; ROVINI, D.; OREFICE, S.; MAROLDA, R.; VERONESI, U. - Aspetti immunologici nel trattamento del melanoma maligno. **Minerva Med**, Roma, v. 73, p. 1233-40,1980.
- CLAYSON, D.B.; COOPER, E.H.- Cancer of the urinary tract. **Adv Cancer Res**, Basel, v. 13, p. 271-6,1970.
- COHEN, M.H.; CHRETIEN, P.B.; FELIX, E.L.; LOYD, B.C.; KETCHAN, A.S.; ALBRIGHT, L.A.; OMMAYA, A.K. - Augmentation of lymphocyte reactivity in guinea pigs, mice, monkeys and humans sensitised to BCG, dinitrochlorobenzene or nitrogen mustard. **Nature**, London, v. 249, p. 656-8,1974.
- CORNEL, E.B.; VAN MOORSELAAR, R.J.A.; VAN STRATUM, P.; DEBRUYNE, F.M.J.; SHALKEN, J.A. - Antitumor effects of bacillus Calmette-Guerin in a syngenic rat bladder tumor model system, RBT 323. **J Urol**, Baltimore, v. 149, p. 179-82,1993.
- CUNHA, A.C. - **Estrutura e apresentação de dissertações e teses**. Serviço de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Medicina - USP. São Paulo, 1991, 48 p.
- D'ANCONA, C.A.L., BILLIS,A.; LIMA,M.L.; NETTO JR.,N.R.; MARIANO, M. - Aspectos anátomo-patológicos observados após o uso de BCG no Hamster. **J Bras Urol**, São Paulo, v. 14, p. 95-7,1988.
- DE JAGER, R.; GUINAN, P.; LAMM, D.; KHANA, O.; BROSMAN, S. DE KERNION; J. WILLIAMS, R.; RICHARDISO, C.; MUENZ, L.; REITSMA, D.; HANNA, M.G. - Long-term complete remission in bladder carcinoma in situ with intravesical Tice bacillus Calmette-Guerin. **Urology**, Ridgewood, v. 38(6), p. 507-13,1991.

- DINIZ, M. **Avaliação clínica e imunologia de pacientes com tuberculose refratária ao tratamento.** Campinas, 1992, 121p. Tese (Mestrado) - Instituto de Biologia - UNICAMP.
- DROLLER, M.J. - Bacillus Calmette-Guerin in the management of bladder cancer. [Editorial]. **J Urol**, Baltimore, v. 136, p. 331-2,1986.
- GIBAS, Z.; SANDBERG, A.A. - Chromosomal rearrangements in bladder cancer. **Urology**, Ridgewood, v. 23, p. 3-9, 1984. supplement 3.
- GILBERT, H.A.; LOGAN, J.L.; KAGAN, A.R. - The natural history of papillary transitional cell carcinoma of the bladder and its treatment in an unselected population on the basis of histologic grading. **J Urol**, Baltimore, v. 119, p. 488-92,1978.
- GOLUMBEK, P.; LEVITSKY, H.; JAFFEE, L.; PARDOLL, D.M. - The antitumor immune response as a problem of self-nonself discrimination: implications for immunotherapy. **Immunol Res**, Basel, v. 12, p. 183-92,1993.
- GORDON, H.L. - Only oncologists in clinical trials should use BCG vaccine for cancer treatment. **JAMA**, Chicago, v. 241, p. 24,1979.
- GUNBY, P. - Answer is still out regarding BCG's possible anticancer role. **JAMA**, Chicago, v. 248, p. 2209-10,1982.
- GUSTAFSON, H.; TRABUKAIT, B.; ESPOSTI, P.H. - DNA profile and tumor progression in patients with superficial bladder tumors. **Urol Res**, Berlin, v. 10, p. 13-18,1982.
- HAAFF, E.O.; CATALONA, W.J.; RATLIFF, T.L. - Detection of interleukin 2 in the urine of patients with superficial bladder tumors after treatment with intravesical BCG. **J Urol**, Baltimore, v. 136, p. 970-4,1986.

- HAKIN, S.; HEANEY, J.A.; HEANEY,J.A.; HEINZ,P.; ZWOLAK, R.W. - Psoas abscess following intravesical bacillus Calmette-Guerin for bladder cancer: A case report. **J Urol**, Baltimore, v. 150, p. 188-9,1993.
- HARRIS, R.E.; CHEN-BACKLUND, J.Y.; WYNDER, E.L. - Cancer of the urinary bladder in blacks and whites. **Cancer**, Philadelphia, v. 66, p. 2673-77,1990.
- HERR,H.W.; PINSKY,C.; WHITMORE,W.F.; SOGANI, P.C.; OETTGEN, H.F.; MELAMED, M.F. - Long term effect of intravesical bacillus Calmette-Guerin on flat carcinoma in situ of the bladder. **J Urol**, Baltimore, v. 135, p. 625-30,1986.
- HERR,H.W. & LAUDONE,U.P. - Intravesical therapy for superficial bladder cancer. **Cancer Princ Pract Oncol**, v. 2, p. 1-6,1988.
- HOOVER,R.N. - Bacillus Calmette-Guerin vaccination and cancer prevention: a critical review of the human experience. **Cancer**, Philadelphia, v. 36 p. 652-4,1978.
- HOROSZEWICZ, J.; MURPHY,G. - An assessment of the current use of human interferons in therapy of urological cancers. **J Urol**, Baltimore, v. 142, p. 1173-6,1989.
- HUBEN, R.P. - Tumor markers in bladder cancer. **Urology**, Ridgewood, v. 23, p. 10-4, 1984. supplement 3.
- KELLEY, D.R.; HAAFF, E.O.; BECICH, M.; LAGE, J.; BAUER,W.C.; DRESNER, S.M.; CATALONA,W.J.; RATLIFF, T.L. - Prognostic value of purified protein derivative skin test and granuloma formation in patients treated with intravesical bacillus Calmette-Guerin. **J Urol**, Baltimore, v. 136, p. 268-71,1986.
- KIEMENEY, L.A.L.; WTJES, J.A.; WTJES,J.A.; HEIJ BROEK,R.P.; VERBEEK,A.L.M.; DEBRUYNE, F.M.J. - Predictability of recurrent and progressive disease in individual patients with primary superficial bladder cancer. **J Urol**, Baltimore, v. 150, p. 60-4,1993.

- LAMM, D.; THOR, D.E.; WINTERS, W.D.; STOGDILL, V.D.; RADWIN, H.M.  
- BCG immunotherapy of bladder cancer: inhibition of tumor recurrence and associated immune responses. **Cancer**, Philadelphia, v. 48, p. 82-5,1981.
- LAMM,D.L.; STOGDILL,V.D.; CRISPEN,R.G. - Complications of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy in 1278 patients with bladder cancer. **J Urol**, Baltimore, v. 135, p. 272-4,1986.
- LAMM, D.L. - Prophylaxis for recurrent transitional cell carcinoma. **Urology**, Ridgewood, v. 37, p. 21-5, 1991. supplement 5.
- LAMM, D.L.; RIGGS, D.R.; SHRIVER, J.S.; VANGILDER, P.F.; RACH, J.F.; DEHAVEN, J.I. - Megadose vitamins in bladder cancer: a double-blind clinical trial. **J Urol**, Baltimore, v. 151, p. 21-6,1994.
- MATHÉ,G.; AMIEL,J.L.; SCHWARZENBERG,L.; SCHNEIDER,M.; CATTAN JR.,A.; SCHULUMBERGER,M.H.; VASSAL,F. - Active immunotherapy for acute lymphoid leukemia. **Lancet**, London, v.1, p. 697-701, 1969.
- MORALES, A.; EIDINGER, D.; BRUCE, A.W. - Intracavitary bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial tumors. **J Urol**, Baltimore, v. 116, p. 180-6,1976.
- MORALES, A.; PANG, A.S.D. - Experimental immunotherapy with NK-like cells. **Cancer Immunology Immunotherapy**, Berlin, v. 21, p. 156-60,1986.
- MURPHY, W.M.; EMERSON, L.D.; CHANDLER,R.W.; MOINUDDIN,S.M.; SOLOWAY,M.S. - Flow cytometry versus urinary cytology in evaluation of patients with bladder cancer. **J Urol**, Baltimore, v. 136, p. 815-8,1986.
- NAKAMURA,K. - Monocyte-mediated cytotoxicity on bladder cancer cells in vitro and its implications in the treatment of bladder cancer patients with bacillus Calmette-Guerin. **Keio J Med**, Keio, v. 3, p. 514-6,1982.

- NAKAMURA, K.; CHIAO, J.W.; NAGAMATSU, G.R.; ADDONIZIO, J.C. - Monocyte cytolytic factor in promoting monocyte-mediated lysis of bladder cancer cells by bacillus Calmette-Guerin. **J Urol**, Baltimore, v. 138, p. 867-70,1987.
- OLD, L.J. - Tumor necrosis factor (TNF). **Scient Amer**, New York, v. 230, p. 630-2,1988.
- PAGE, B.H.; LEVISON, V.B.; CURWEN,M.P. - The site of recurrence of non-infiltrating bladder tumors. **Br J Urol**, Edinburgh, v. 50, p. 237-42,1978.
- PANG, A.S.; MORALES, A. - Immunoprophylaxis of murine bladder cancer with high dose BCG immunizations. **J Urol**, Baltimore, v. 127, p. 1006-9,1982.
- RATLIFF,T.L. - Bacillus Calmette-Guerin (BCG): Mechanism of action in superficial bladder cancer. **Urology**, Ridgewood, v. 37, p. 8-12, 1991. supplement 5.
- RATLIFF, T.L.; GILLEN, D.; CATALONA,W.J. - Requirement of a thymus dependent immune response for BCG-mediated antitumor activity. **J Urol**, Baltimore, v. 137, p. 155-8,1987.
- RATLIFF, T.L.; KAVOUSSI, L.R.; CATALONA, W.J. - Role of fibronectin in intravesical BCG therapy for superficial bladder cancer. **J Urol**, Baltimore, v. 139, p. 410-4,1988.
- RATLIFF, T.L.; PALMER, J.O.; MCGARR, J.A.; BROWN, E.J. - Intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy for murine bladder tumors: initiation of response by fibronectin-mediated attachment of bacillus Calmette-Guerin. **J Urol**, Baltimore, v. 138, p. 867-70,1987.
- RATLIFF, T.L.; SHAPIRO, A.; CATALONA, W.J. - Inhibition of murine bladder tumor growth by bacille Calmette-Guerin: Lack of a role natural Killer cells. **Clinical Immunology and Immunopatology**, Orlando, v. 41, p. 108-15,1986.

- RICHIE, J.P. - Intravesical Chemotherapy, **Urol Clin North America**, Philadelphia, v. 19, p. 521-7, 1992.
- RICHIE, J.P.; BLOTE, R.D.Jr.; WAISMAN, J. - Immunologic indicators of prognosis in bladder cancer: The importance of cell surface antigens. **J Urol**, Baltimore, v. 123, p. 22-4, 1980.
- RIDDLE, P.R.; CHISHOLM, G.D.; TROTT, P.A.; PUGH, R.C.B. - Flat carcinoma in situ of bladder. **Br J Urol**, Edinburgh, v. 47, p. 829-33, 1976.
- RINTALA, E.; JAUHAINEN, K.; ALFTHAN, O.; HANSSON, E.; JUUSELA, H.; KANERVA, K.; KORHONEN, H.; PERMI, J.; SOTARAUTA, M.; VAALASTI, T.; VIITANEN, J.; USENIUS, R. - Intravesical chemotherapy (mitomycin C) versus immunotherapy (BCG) in superficial bladder cancer. **Eur Urol**, Basel, v. 20, p. 19-25, 1991.
- RUBENSTEIN, M.; MUCHNIK, S.; CHET, M.; SHAW, M.W.; MCKIEL, C.F.; GUINAN, P.D. - Tumor infiltrating lymphocytes: the effect of bacillus Calmette-Guerin on helper/suppressor-T cell ratios of treated and untreated tumors. **J Urol**, Baltimore, v. 146, p. 1650-3, 1991.
- SCHELLHAMMER, P.F. - BCG treatment of superficial transicional cellcarcinoma. **Urology**, Ridgewood, v. 37, p. 16-20, 1991. supplement 5.
- SHAW, M.; MICKIEL, C.F.; RAY, V.; RUBENSTEIN, M.; GUINAN, P. - Characterization of cellular infiltrates in the rat urinary bladder following BCG and thiotepa intravesical therapy. **Journal of Surgical Oncology**, New York, v. 46, p. 48-52, 1991.
- SINHORINI, I.L. - **Formação do granuloma induzido pelo BCG no hamster. Influência da Hipersensibilidade tardia e da administração do "PPD" na evolução e no número de bactérias das lesões.** São Paulo, 1983, 85 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP.

- SKINNER, D.G.; LIESKOVSKY, G. **Diagnosis and Management of Genitourinary Cancer**. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1988, 887p.
- SMITH, J.A.Jr. - Laser surgery for transitional cell carcinoma. **Urol Clin North America**, Philadelphia, v. 19, p. 473-83,1992.
- SPECTOR,W.G.; REICHHOLD,N.; RYAN,G.B. - Degradation of granuloma inducing micro-organisms by macrophages. **J. Path.**, Edinburg, v.101, p.339-54, 1970.
- STILMANT, M.M.; SIROKY, M.B. - Nephrogenic adenoma associated with intravesical bacillus Calmette-Guerin treatment: a report of 2 cases. **J Urol**, Baltimore, v. 135, p. 359-61,1986.
- SHORTLIFFE,L. - Intravesical alpha-2 interferon therapy for superficial bladder cancer. **Eur Assoc Urol**, Copenhagen, v. 203, 1984. [abstract].
- STANISIC, T.H.; BREWER, M.L.; GRAHAN, A.R. - Intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy and associated granulomatous renal masses. **J Urol**, Baltimore, v. 135, p. 356-8, 1986.
- STUDER, U.E.; BIEDERMAN, C.; CHOLLET, D. - Prevention of recurrent superficial bladder tumors by oral etretinate: preliminary results of a randomized double blind multicenter trial in Switzerland. **J Urol**, Baltimore, v. 131, p. 47-9,1984.
- STUHLBREHER, D.; FRANK, W.; SHAW, M.; MUCHNIK, S.; HUSSEIN,N.; RUBENSTEIN, M.; GUINAN,P. - The effect of BCG on thoracic duct lymphocytes. **Immunol Investigations**, New York, v. 21, p. 613-21,1992.
- TAUB,J.S.; HAGGERTY,R.J.: Active immunizations. **N Eng J Med**, Edinburg, v. 269, p. 573-6,1963.

- THATCHER, N.; SWINDELL, R.; CROWTHER, D. - Effects of *Corynebacterium parvum* and BCG therapy on immune parameters in patients with disseminated melanoma (NK, K and T cell) lymphodytotoxicity and delayed hypersensitivity skin reactions. **Clin Exp Immunol**, London, v. 35, p. 171-9,1979.
- THATCHER, N.; HASHIMI, K.; CHANG, J.; SWINDELL, R.; CROWTHER, D. - Anti-T antibody in malignant melanoma patients. Influence of response and survival following chemotherapy-changes in serum levels following *C. parvum*, BCG immunization. **Cancer**, Philadelphia, v. 46, p. 1378-82,1980.
- TSURUO, T.; IIDA, H.; TSUKAGOSHI, S.; SAKURAI, Y. - Supression of friend leukemia virus by bacillus Calmette-Guerin and a streptococcal preparation OK-432. **Int J Cancer**, New York, v. 25, p. 131-6,1980.
- YARKONI, E.; RAPP, H.J. - Regression by active specific immunotherapy of established dermal timor transplants and lymphnode metastases in guinea pigs. **Inf Immun**, Oxford, v. 31, p. 514-6,1981.
- VAN DER MEIJDEN, P.M.; BERT VAN KLINGEREN; STEERENBERG,P.A.; DE BOER,L.C.; DE JONG,W.H.; DEBRUYNE, F.M.J. - The possible influence of antibiotics of bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy for superficial bladder cancer. **J Urol**, Baltimore, v. 146, p. 444-6,1991.
- VERONESI, R. - **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1982, 1209p.
- VILELA, M.M.S. - **Fagocitose em crianças com doença falciforme**. Campinas, 1985, 184 p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia - UNICAMP.
- VILELA, M.M.S.- **Comparação da função CR3, CR1 e Fc de monócitos, em crianças com kala-azar sob tratamento**. Campinas, 1992, 115 p. (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP.

ZBAR, G.; BRENSTEIN, I.D.; RAPP, H.J. - Supression of tumor growth at the site of infection with living bacillus Calmette-Guerin. **J Nath Cancer Inst**, Bethesda, v. 46, p. 831-9,1979.

ZLOTTA, A.; DROWART, A.; VAN-VOOREN, J.P.; SIMON, J.; SCHULMAN,C.C. - Evolution of cellular and humoral response against tuberculin and antigen 85 complex during intravesical treatment with BCG of superficial bladder cancer. **Acta Urol. Belg.**, Brussels, v. 62, p. 63-68,1994.