Mem. Inst. Butantan
52 (2): 37-46, 1990

CONTROLE DE QUALIDADE DO ONCO-BCG ORAL: CONTRIBUIÇÃO DO TESTE BIOLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIGÊNICO

José Luiz Bernardino MERUSSE*
Idércio Luiz SINHORINI*
Maria Christina GAVIOLLE*
Gilda Almeida de SOUZA**

RESUMO: O processo de controle de qualidade do ONCO-BCG Oral inclui testes de curta e longa duração. O produto é liberado para o consumo após o resultado das provas de bacterioscopia, consumo de oxigênio e esterilidade. Essas provas asseguram um produto constituído por uma suspensão de bacilos álcool-ácido resistentes, dispersos, vivos e sem a presença de contaminantes. Por outro lado, essas provas por si só não são suficientes para caracterizar um produto imunoestimulante. Essa propriedade está intimamente relacionada aos componentes lipídicos da parede bacteriana, os quais são capazes de induzir a formação de uma resposta inflamatória granulomatosa no coxim plantar de hamsters. O presente trabalho sugere um teste de controle de qualidade do ONCO-BCG Oral, que avalie seu potencial imunoestimulante pelo acompanhamento das lesões induzidas no hamster, caracterizando, assim, uma prova biológica de controle de qualidade.

UNITERMOS: BCG; neoplasias, tratamento adjuvante; inflamação granulomatosa.

INTRODUÇÃO

A forma atenuada de *Mycobacterium bovis*, o Bacilo de Calmette Guerin (BCG) tem sido amplamente empregada como terapia coadjuvante no tratamento de diversos tipos de neoplasias[3,4,6,7,8,11,13,24,27].

Destacamos, em particular, o tratamento do melanoma maligno, para o qual altas doses do BCG são administradas pela via oral[17,26,34]. Essa

* Departamento de Patologia. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Cidade Universitária. 05508 — São Paulo — SP — Brasil.
** Seção de Tuberculose e BCG. Instituto Butantan.
Recebido para publicação em 04.9.1989 e aceito em 23.4.1990.

capacidade antineoplásica, exercida através de complexa interação com células do sistema imune, caracteriza o BCG como um imunoestimulante não específico, capaz de ativar direta ou indiretamente os diversos componentes do sistema[5].

Existem, porém, diferenças quantitativas, em termos da capacidade imunoestimulante, entre as diferentes cepas e preparações. Dentre as várias cepas testadas por Mackaness & Cols.[18], a cepa Pasteur demonstrou maior capacidade imunoestimulante que a cepa Glaxo. Além disso, os autores notaram que o BCG em fase estacionária, nas vacinas liofilizadas, provoca menor resposta que o proveniente diretamente das culturas em fase logarítmica. Várias observações evidenciaram, também, que na imunopotenciação pelo BCG, a presença da bactéria viva nos tecidos linfóides tem um papel preponderante[12,22]. A inoculação, em camundongos, de amostras de BCG submetidas ao tratamento por ultra-som, apresentando portando baixo grau de agregação entre as partículas, induz a formação de anticorpos duas vezes maior, quando comparadas com amostras não submetidas ao referido tratamento[2].

Independentemente dos fatores acima citados, a atividade imunoestimulante do BCG está relacionada aos componentes lipídicos da bactéria[28,36], sendo que a maior parte destes, se não todos, fazem parte da parede bacteriana[14]. Esse fato pode ser demonstrado pela análise do padrão inflamatório e imunológico, decorrente da inoculação de BCG desprovido de glicolipídios na parede celular. O BCG delipidado provoca uma resposta inflamatória de caráter agudo. Além disso, quando privado de seu componente glicolipídico, o bacilo perde sua capacidade imunoestimulante[29].

Além de seu efeito potenciador sobre o sistema imune, destacamos o uso do BCG no estudo da relação parasita-hospedeiro, tema sobre o qual temos desenvolvido diversos experimentos em nosso laboratório[15,21,30]. As micobactérias induzem um tipo específico de resposta inflamatória crônica denominada granulomatosa[1,20,31]. Particularmente, no estudo das lesões e imunologia da tuberculose, bem como no estudo de uma reação inflamatória granulomatosa, o hamster tem sido um dos modelos de escolha pois é sensível ao BCG, o qual, na dependência da dose e da via de inoculação, pode levar o animal à morte[9]. Histologicamente, as lesões induzidas pelo BCG no hamster são semelhantes às decorrentes da infecção desses animais pelo bacilo humano ou bovino da tuberculose[23], inclusive com a presença de células epitelióides, característica básica da lesão granulomatosa[20].

O presente trabalho sintetiza alguns anos de utilização do ONCO-BCG Oral, em especial quanto à sua capacidade de indução de lesão granulomatosa no hamster. Através desse modelo, sugerimos uma prova biológica para controle de qualidade do produto.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados hamsters *(Mesocricetus auratus*, variedade golden), machos. Os animais foram criados e mantidos em biotério tipo convencional recebendo água e ração peletizada ''ad libitum''. Esses animais foram originados pelo sistema não consangüíneo de acasalamento.

Ao longo do experimento, 137 grupos de 10 animais foram mantidos em caixas convencionais de polipropileno com aproximadamente 1140cm^2 de piso. Estabeleceu-se que o peso dos animais no início do experimento seria de 100 a 110g.

Inóculos: Utilizou-se o ONCO-BCG Oral na concentração de 100mg/ml em meio de Sauton, Cepa Moreau, obtido do Instituo Butantan de São Paulo (IB), preparado e submetido a provas de controle de qualidade conforme normas padronizadas[32,35]. As inoculações foram realizadas com partidas recém-fabricadas, logo após a liberação pelo Instituto. Foram utilizadas, no total, 136 partidas de ONCO-BCG Oral, no período compreendido entre 1984 e 1988.

Após agitação do flaconete, o produto foi inoculado no tecido conjuntivo subcutâneo do coxim plantar esquerdo na dose de 0,1ml (10mg). Durante o procedimento o produto foi mantido em recipiente original, resfriado a 4°C.

O meio de Sauton foi também inoculado em um lote de 10 animais, na concentração e sob as mesmas condições como empregado para a fabricação do ONCO-BCG Oral. O referido meio foi também cedido pelo IB.

As inoculações foram feitas com agulhas tipo tuberculina (13x4 ou 27G 1/2).

Acompanhamento das provas de controle de qualidade: As partidas de ONCO-BCG Oral por nós inoculadas foram acompanhadas no referente ao controle de qualidade efetuado pelo IB, pelas provas de bacterioscopia, consumo de oxigênio, esterilidade, vitalidade e inocuidade. Os resultados dessas provas foram-nos fornecidos pelo referido Instituto.

AVALIAÇÃO DAS LESÕES:

1. Mensuração — As lesões induzidas pela inoculação do produto foram avaliadas pela mensuração do diâmetro do coxim plantar. Utilizando-se micrômetro marca Moore & Wrigth, mediu-se a distância entre a face superior e a inferior da pata. As medidas foram tomadas a intervalos de 24 ou 72 horas a contar do momento da inoculação. Para todas as mensurações observou-se intervalos de centésimos de milímetro. Os animais foram marcados de modo a propiciar registro individual. Os valores em mm obtidos das mensurações foram registrados em Tabelas. As médias obtidas dos grupos de animais a cada intervalo de tempo foram, por sua vez registrados em gráficos. Os grupos foram acompanhados por períodos que variaram de 20 a 60 dias.

2. Ultraestrutura — para a visualização ultraestrutural do estado geral do inóculo do coxim plantar de hamsters, fragmentos representativos foram coletados 20 dias após a inoculação, fixados em uma solução de glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,1M, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%[10] e incluídos em Araldite 502[16].

Os cortes ultra-finos (60-70 mm de espessura), foram obtidos com navalhas de vidro, através da utilização do ultramicrótomo Sorvall MT-5000, contrastados pelo acetato de uranila[37] e citrato de chumbo[25] e visualizados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão EM 201, Phillips.

3. Análise estatística — As 136 partidas de ONCO-BCG Oral foram analisadas pela intensidade da lesão induzida no coxim plantar de hamsters.

Após a avaliação das lesões, conforme descrito no item 1 estas foram estatisticamente comparadas pela utilização do teste ''t'' Student[33]. A hipótese alternativa pressupunha as médias de um grupo como sendo inferiores às médias de outro grupo. Estabeleceu-se valor de 0,05 para o nível de rejeição da hipótese de nulidade.

RESULTADOS

Resultados das provas de controle de qualidade: Os resultados das provas de controle de qualidade efetuadas nas partidas por nós inoculadas, mostraram-se dentro dos padrões exigidos para o produto[32] não sendo constatadas quaisquer anormalidades.

Resultado da inoculação do meio de Sauton: O meio de Sauton não foi capaz de induzir qualquer alteração mensurável no coxim plantar dos animais. O aumento de volume foi decorrência da própria inoculação. Transcorrido um período de 24 horas, as medidas retornaram ao nível basal, após o que não se registraram quaisquer alterações mensuráveis.

Características da evolução da lesão granulomatosa induzida pelo ONCO--BCG Oral no coxim plantar de hamsters: Com o acompanhamento das diversas inoculações do ONCO-BCG Oral no coxim plantar do hamster, estabeleceu-se um padrão evolutivo básico e característico desse tipo de resposta inflamatória granulomatosa. Logo após a inoculação, iniciou-se a fase aguda com a absorção do componente líquido do inóculo. Avante essa fase, que perdurou até 4 ou 6 dias após a inoculação, notou-se, macroscopicamente, a diminuição do volume lesional. partir desse ponto, ou em período próximo, teve lugar a fase de proliferação e organização celular formando a lesão granulomatos característica da resposta do hospedeiro às micobactérias. Durante esse período notou-se um crescente aumento no volume local. Seguiu-se a essa fase uma outra também característica de uma lesão granulomatosa, qual seja, a de um relativo equilíbrio com o hospedeiro, e que perdurou por todo o tempo observado (60 dias em alguns casos). Nessa terceira fase, que teve início após o 14º ou 16º dia após a inoculação, o diâmetro médio do coxim plantar situou-se entre 6 e 7mm. À lesão acima descrita convencionou-se chamar de padrão clássico de resposta granulomatosa desenvolvida no coxim plantar do hamster ao ONCO-BCG Oral e está ilustrada no conjunto A da Figura 1. A grande maioria das partida inoculadas desenvolveu resposta inflamatória que se enquadrou nesse padrão. Não foram constatadas diferenças estatiscamente significativas entre as diversas médias do conjunto A para um mesmo intervalo de tempo.

Por outro lado, registraram-se outros padrões de evolução das lesões de coxim plantar em resposta à inoculação de determinadas partidas de ONCO-BCG Oral. Constituíram-se em padrões anômalos, quando comparados ao conjunto anteriormente descrito, sendo, por isso, incluídas no Conjunto B da Figura 1. Nesse caso, o único padrão comum a todas as respostas foi a sua menor intensidade. Em alguns casos, o único aumento de volume registrado foi aquele decorrente da própria inoculação; após o período de absorção do componente líquido do inóculo, as medidas retornaram ao nível basal, não sendo verificadas, posteriormente, quaisquer alterações mensuráveis. Em outros casos a resposta inflamatória ocorreu, sendo, porém, menos intensa que aquela verificada com os inóculos do Grupo A.

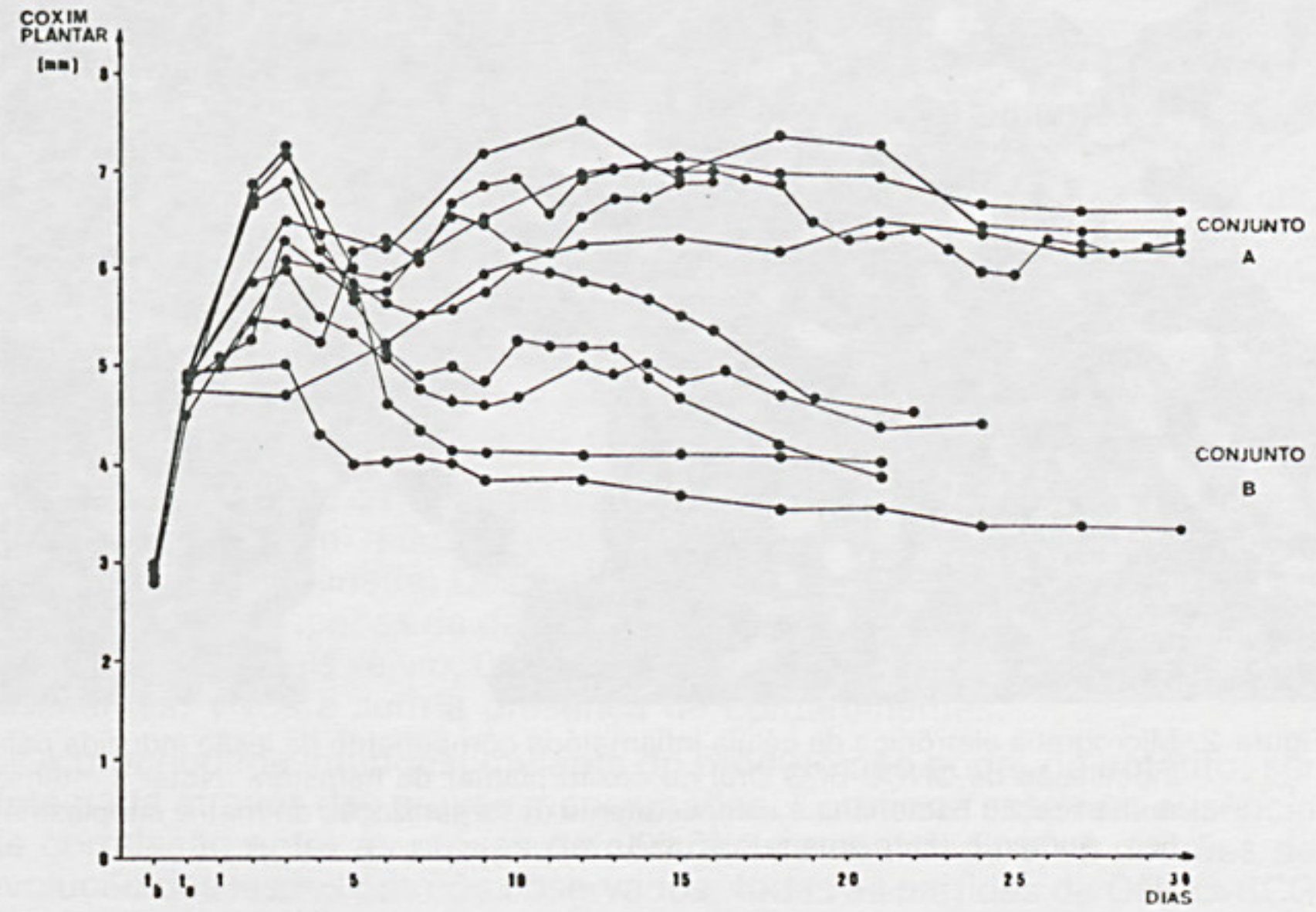

Figura 1. Curvas representativas da cinética da evolução das lesões induzidas pela inoculação de ONCO-BCG Oral no coxim plantar de hamsters. Cada ponto representa a média de 10 animais. Conjunto A. padrões clássicos de evolução; Conjunto B. padrões anômalos de evolução.

Análise ultra-estrutural das lesões induzidas pelo ONCO-BCG Oral no coxim plantar de hamsters: A análise ultra-estrutural dos sítios de inoculação dos bacilos das diferentes partidas de ONCO BCG Oral que desenvolveram no coxim plantar do hamsters padrões inflamatórios característicos do Conjunto A, expresso na Figura 1, apresentaram alta concentração de bacilos no interior do citoplasma das células inflamatórias presentes na lesão. Além disso, apresentaram esses bacilos morfologia característica. Essas observações sugerem um alto grau de multiplicação da micobactéria no interior das células inflamatórias. Essas células, por outro lado, apresentaram evidentes alterações, caracterizadas pelo comprometimento e desorganização da matriz intracitoplasmática, conforme mostra a Figura 2.

As células inflamatórias presentes nas lesões desenvolvidas em decorrência da inoculação do ONCO-BCG Oral proveniente das partidas cujo padrão inflamatório no coxim plantar do hamster foi classificado como anômalo (Conjunto B, Figura 1), deixaram evidente uma relativa integridade celular. Os poucos bacilos presentes na matriz citoplasmática pareciam fugir dos padrões de viabilidade, apresentando-se como pequenas massas eletron-densas, lembrando um estado de total desintegração (Figura 3).

MERUSSE, J. L. B.; SINHORINI, I. L.; GAVIOLLE, M. C.; SOUZA, G.A. de. Controle de qualidade do ONCO-BCG oral; contribuição do teste biológico para avaliação do potencial antigênico. **Mem. Inst. Butantan, 52**(2): 37-46, 1990.

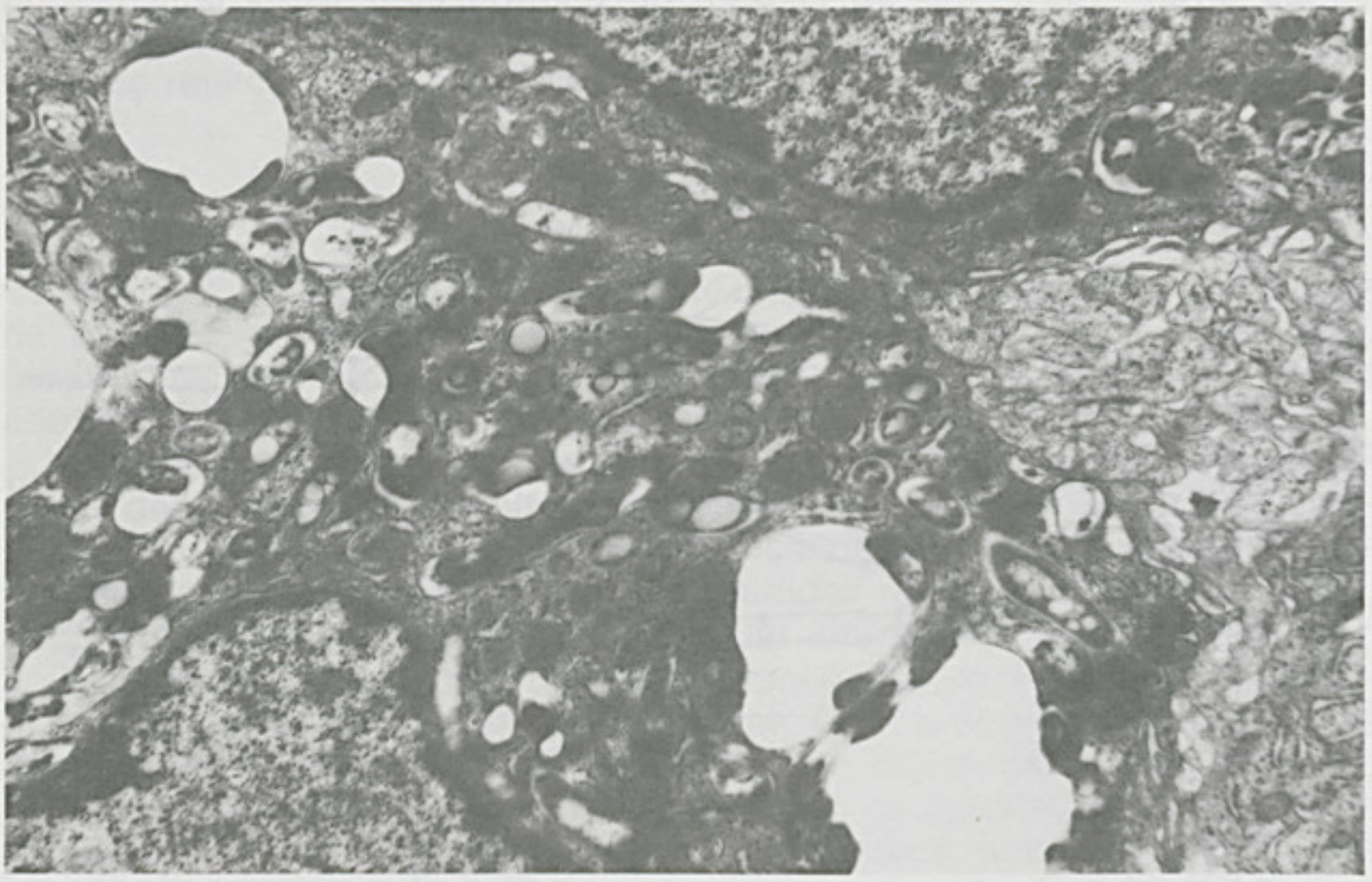

Figura 2. Micrografia eletrônica de célula inflamatória componente da lesão induzida pela inoculação de ONCO-BCG Oral no coxim plantar de hamsters. Notar a intensa multiplicação bacteriana e a conseqüente desorganização da matriz citoplasmática. Aumento (aproximado): 45.600 X.

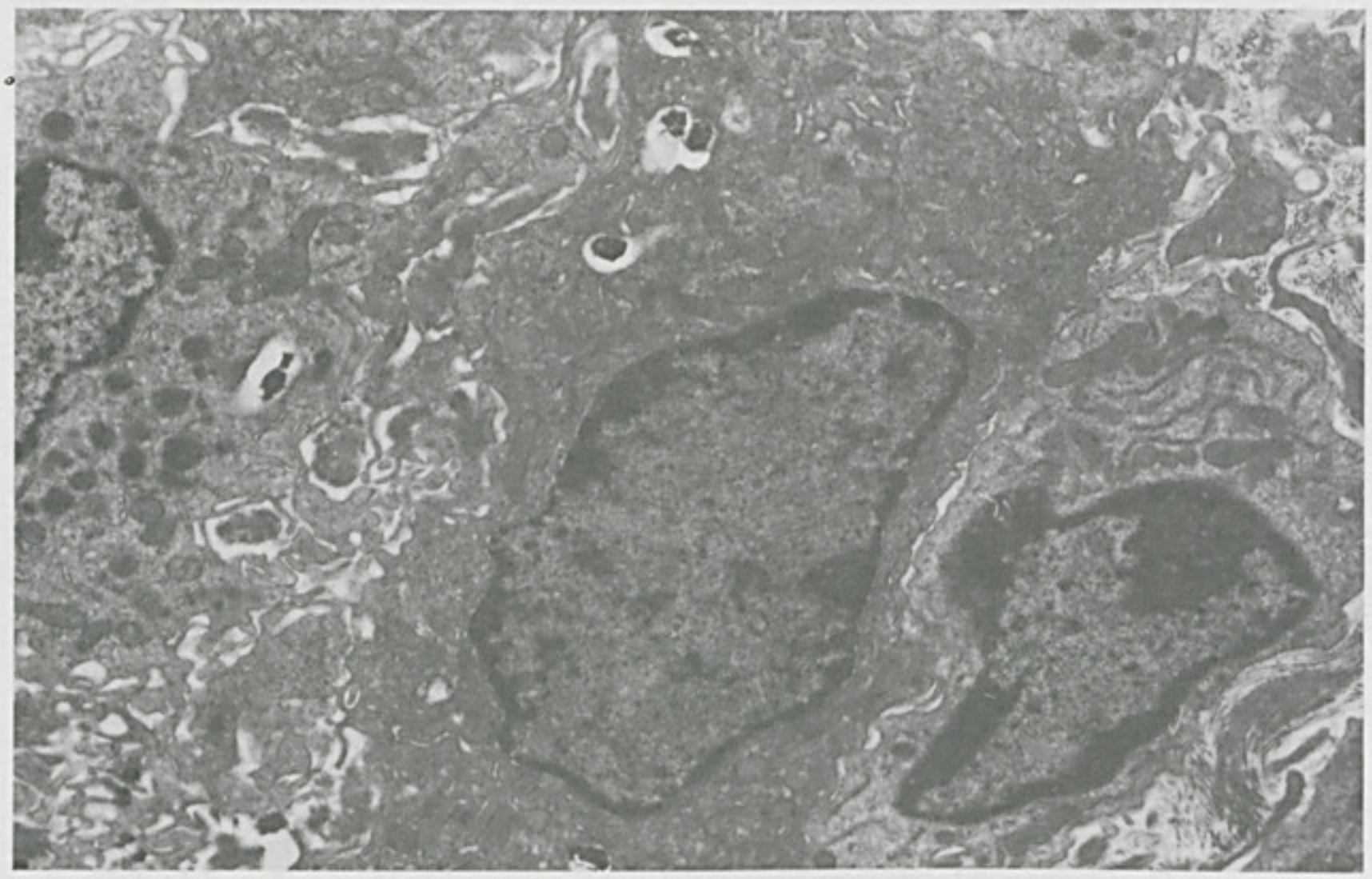

Figura 3. Micrografia eletrônica dè célula inflamatória componente de lesão induzida no coxim plantar de hamsters pela inoculação de ONCO-BCG Oral. Notar o comprometimento dos poucos bacilos existentes e matriz celular aparentemente íntegra. Aumento (aproximado): 14.600 X.

DISCUSSÃO

O processo de controle de qualidade do ONCO-BCG Oral é efetuado pelas provas de bacterioscopia, consumo de oxigênio, esterilidade, contagem de unidades viáveis (vitalidade) e inocuidade. A liberação do produto dá-se pelos resultados dos testes de bacterioscopia, consumo de oxigênio e esterilidade[32]. O teste de bacterioscopia constitui-se na execução dos métodos de Gram e Ziehl-Nielsen, através dos quais procede-se, respectivamente, à verificação da presença eventual de contaminantes e a identificação dos bacilos com as características tintoriais específicas. Além disso, essa prova permite a verificação do grau de dispersão entre as bactérias, fator importante na propriedade imunoestimulante de uma suspensão de BCG[2]. O teste de consumo de oxigênio assegura a presença de um número mínimo de bacilos vivos por unidade de volume. Esse dado reveste-se de importância, considerando-se que tanto maior será a capacidade imunoestimulante do BCG quanto menores forem as manipulações desde o meio de cultura até o hospedeiro[12,22].

O reduzido prazo de validade do ONCO-BCG Oral (25 dias), faz com que se tenha um também reduzido período disponível para a execução dos testes de controle de qualidade. Dessa forma, o produto é liberado para o consumo dispondo-se apenas de dados que assegurem as características acima mencionadas, quais sejam, uma suspensão dispersa de bacilos álcool-ácido resistentes, vivos e sem a presença de contaminantes.

A propriedade imunoestimulante do produto não pode, no entanto, ser detectada através das provas mencionadas. Comfirma esse fato ausência de correlação entre as provas de controle de qualidade e os padrões de evolução das lesões por nós observados: todas as partidas de ONCO-BCG Oral utilizadas mostraram-se dentro dos padrões para essas provas; determinadas partidas induziram respostas anômalas (Figura 1-B). Por outro lado, essa capacidade imunopotencializadora está limitada aos componentes lipídicos da parede micobacteriana, os quais são também os responsáveis pela indução da resposta inflamatória granulomatosa no hospedeiro[14,28,29,36].

Neste contexto, a avaliação das lesões granulomatosas induzidas no coxim plantar dos hamsters assume a configuração de uma prova biológica sensível para avaliar o potencial imunoestimulante do ONCO-BCG Oral.

A presença de bacilos álcool-ácido resistentes vivos, característica comum a todas as partidas de ONCO-BCG Oral estudadas não significa necessariamente capacidade imunoestimulante. O fato de que determinadas partidas de ONCO-BCG Oral tenham desenvolvido cinética lesional diferente do que estabelecemos como normal, indica uma drástica redução nos constituintes lipídicos da parede micobacteriana [28,29] e, conseqüentemente, da capacidade imunoestimulante dessas partidas.

A observação ultraestrutural dos componentes celulares das lesões foi suficiente para confirmar os dados obtidos pelo acompanhamento das lesões induzidas pelas diversas partidas de ONCO-BCG Oral. Micobactérias multiplicam-se no interior de células do hospedeiro, comprometendo-as estrutural e funcionalmente; já foi demonstrado que somente micobactérias íntegras em sua parede conseguem sobreviver e multiplicar nesse meio [29]. A concentração de bacilos íntegros no interior do citoplasma das células inflamatórias, bem como o comprometimento citoplasmático dessas,

conforme ocorrido em resposta a determinadas partidas de ONCO-BCG Oral, atestam a integridade dessas bactérias (Fig. 1-A; Fig. 2). Em contrapartida, bacilos de outras amostras de ONCO-BCG Oral, incapazes de provocar uma resposta inflamatória conforme os padrões clássicos no coxim plantar do hamster (Fig. 1-B) exibiram-se em baixo número e, ultraestruturalmente, em formas incompatíveis com a viabilidade no interior de células inflamatórias cuja morfologia correspondeu a um padrão aparentemente inalterado (Figura 3).

A simples comparação das mensurações das lesões do coxim plantar fornecem parâmetros suficientes para a avaliação do potencial antigênico e imunoestimulante do ONCO-BCG Oral. À semelhança das provas de vitalidade e inocuidade, a avaliação do potencial antigênico através da inoculação em hamster, também é um teste de longa duração, embora menos demorado que estes, sendo necessários apenas 15 dias para a constituição da celularidade característica de uma lesão granulomatosa. Em virtude da simplicidade do método e da importância dos resultados por ele fornecidos, consideramos viável sua aplicação periódica nos laboratórios de controle de qualidade de ONCO-BCG Oral.

AGRADECIMENTOS

À Diva Helena Melchiori Nogueira pelo excelente trabalho de datilografia.

ABSTRACT: The quality control process of oral ONCO-BCG includes short time and long time proofs. The product is released for use after results obtained in the following proofs: bacterioscopy, oxygem comsumption and sterelity these tests guarantee that the product's a contaminant — free suspension of disperse, live acid-fast bacilli. On the other hand, these assays alone are insuficient to characterize an immunostimulant product. This property is closely related to the fattyacid components of the bacteria's cell wall, witch can induce a granulomatous inflammatory response in the foot pad of hamster. The present study suggests a quality control test for Oral ONCO-BCG. Considering its immunostimulant properties through the kinetics of the lesions induced in hamsters thus establishing a biological quality control proof.

KEYWORDS: BCG; neoplasias, adjuvant treatment; granulomatous inflammation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, D.O. The granulomatous inflammatory response. *Amer. J. Path., 84*:164-91, 1976.
2. BROWN, C.A. L. & BROWN, I.N. Mycobacterium bovis BCG modulation of murine antibody response: influence of dose and degree of aggregation of live or dead organisms. *Brit. J. Exp. Path., 63*: 133-43, 1982.
3. COMSTOCK, G.W. Leukaemias and BCG. A controlled trial. *Lancet, 2:*1062-3, 1971.
4. COMSTOCK, G.; MARTINEZ, I.; LIVESAY, V.T. Efficacy of BCG vacination in prevention of cancer. *J.Nat. Cancer Inst., 54*:835-9, 1975.
5. DAVIES, M. BCG as a anti-tumor agent. The interaction with cells of mammalian immune system. *Biochim.Biophis.Acta, 651*: 143-74, 1982.
6. DAVIGNON, L.; ROBILLARD, D.; LEMONDE, P.; FRAPIER, A. BCG vaccination and leukaemia mortality. *Lancet, 2*:638, 1970.

MERUSSE, J. L. B.; SINHORINI, I. L.; GAVIOLLE, M. C.; SOUZA, G.A. de. Controle de qualidade do ONCO-BCG oral; contribuição do teste biológico para avaliação do potencial antigênico. **Mem. Inst. Butantan, 52**(2): 37-46, 1990.

7. FARACI, R.P.; BARONE, J.J; MARRONE, J.C.; SCHOUR, L. In vitro evidence of specific BCG induced immunity to malignant melanoma in BALB/C mice. *J.Nat. Cancer Inst., 52:*1913-5, 1974.
8. FARACI, R.P. & SCHOUR, L. Malignant melanoma: specific immunity induced by BCG in BALB/C mice. *Science, 185:* 68-9, 1974.
9. HAUDUROY, P. & ROSSET, W. Sensibilité du hamster au bacille BCG. *Presse Med., 59*: 121, 1951.
10. HAYAT, M.A. *Fixation for Electron Microscopy*. New York, Academic Press, Inc., 1984. 501 p.
11. HUDSON, M.A.; RATLIEF, T.L.; GILLEN, D.P.; HAAF, E.O.; DRESNER, S.M.; CATALONE, W.J. Single course versus mantenaince BCG the rapy for superficial bladder tumors: A prospective, randomized trial. *J.Urol., 138*:295-8, 1987.
12. ISHIBASHI, T.; HARADA, Y.; HARADA, S.; YAMADA, H.; TAKAMOTO, M.; SUGYAMA, K. Mode of immunopotenciating action of BCG: Persistence and spread of BCG infection. *Jap.J.Exp.Med., 48*:227-32, 1978.
13. LAMM, D.L. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy. *J.Urol., 138*: 291-2, 1987.
14. LEDERER, E. Structure de constituants mycobactériens: relation avec l'activité immunologique. *Ann.Microbiol.* (Inst. Pasteur), *129-A*: 91-3, 1978.
15. LOMBARDINI, F.; BOTTINO, J.A.; SINHORINI, I.L.; MERUSSE, J.L.B. GAVIOLLE, M.C.; GRECCHI, R. Preliminary study on a new immunostimulant by examining lymphatic cells formula and distribution in hamster. *Zoot. Intern., 10*:52-4, 1988.
16. LUFT, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem, Cytol., N. York, 9:* 409-17, 1961.
17. MAC GREGOR, A.B.; FALK, R.; LANDI, S.; AMBUS, U.; LANGER, B. Oral BCG immunostimulation in malignant melanoma. *Surg.Gynecol. Obstet., 141*:747-54, 1975.
18. MACKANESS, G.B.; AUCLAIR, D.J.; LAGRANE, P.H. Immunopotentiation with BCG. Immune response to different strains and preparations. *J.Nat. Cancer Inst., 51:*1655-67, 1973.
19. MARIANO, M. Functional caracterization and possible role played by E-macrophages (epitelioid cells) in experimental granulomas. In: WILLIAMS, W.J. & DAVIES, B.H. *Sarcoidosis and other granulomatous diseases*. Cardif, Alfa-Omega, 1980. p. 68-74.
20. MARIANO, M. The experimental granuloma. Em fase de redação.
21. MERUSSE, J.L.B. Influência do sexo e da gestação na cinética do granuloma experimental induzido pelo BCG no hamster. São Paulo, 1988. 66 p. Tese de Doutoramento — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
22. NETTELESHIP, E.M.; COLLON, J.L.; LUM, G. Studies on the mechanism of BCG activation for immunotherapy. *Bol.Assoc.Med.P.Rico, 73:* 168-72, 1981.
23. NICOD, J.L. Hamster et BCG. *Rev. Immunol. (Paris), 19*:330-6, 1955.
24. PANSADORO, V. & De PAULA, F. Intravesical BCG in the treatment of superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *J.Urol., 138*:299-301, 1987.
25. REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pas an eletron opaque stain in electron microscopy. *J.Cell.Biol., 17*:208-13, 1963.
26. RODRIGUES NETTO JR.; REINATO, J.S.; TEIXEIRA, L.C.; DEBELLIS, N. Imunoterapia pelo BCG Oral no câncer da bexiga. *Rev.Ass.Med.Bras., 24:*358-60, 1978.
27. ROSENTHAL, S.R. BCG in cancer and leukaemia treatment and prophylaxis a review. *J.Med., 6*:193-212, 1975.
28. SILVA, C.L. Inflammation induced by mycolic acid-containing glycolipids of *M.bovis* (BCG). *Brit.J.Med.Biol.Res., 18*:327-35, 1985.
29. SILVA, C.L.; EKIZLERIAN, S.M.; FRAZIOLI, R.A. Role of cordfactor in the modulation of infection caused by mycobacteria. *Amer.J.Path., 118*:238-47, 1985.
30. 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, 84 p. Tese de Doutoramento — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
31. SINHORINI, I.L. Comunicação Pessoal.
32. SOERENSEN, B.; PEREIRA, M.M.M.; SOUZA, G.A.; YAMAGUSHI, I.K.; SCALABRELLI, R. Normas para a preparação do BCG Oral destinado ao tratamento coadjuvante das neoplasias. *Vac. Soros, 1:* 64-70, 1985.

MERUSSE, J. L. B.; SINHORINI, I. L.; GAVIOLLE, M. C.; SOUZA, G.A. de. Controle de qualidade do ONCO-BCG oral; contribuição do teste biológico para avaliação do potencial antigênico. **Mem. Inst. Butantan, 52**(2): 37-46, 1990.

33. SPIEGEL, M.R. *Estatística*. São Paulo, McGraw-Hill, 1972. 580p.
34. VARELA, A.D.; BANDIERA, D.; AMORIM, A.R.; CALVIS, L.; SANTOS, I.O.; ESCALEIRA, N.; GENTIL, F. Treatment of disseminated malignant melanoma with high dose of oral BCG. *Cancer, 48:* 1353-62, 1981.
35. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tecnical Report Series, nº 638, Geneva, 1979.
36. WATSON, M.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J.Biophys.Biochem.Cytol. (N.York),4:* 475-8, 1958.
37. YARKONI, E.; WANG, L.; BEKIERKUNST, A. Stimulation of macrophages by cordfactor and by heat killed and living BCG. *Inf.Immun., 16*: 1-8, 1977.