

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**Imunoterapia com IL-2 e TRAIL expressas por *Salmonella*  
recombinante contra o câncer de bexiga**

Bruna Dias de Lima Fragelli

**São Carlos – SP  
2022**

Universidade Federal de São Carlos  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**Imunoterapia com IL-2 e TRAIL expressas por *Salmonella*  
recombinante contra o câncer de bexiga**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração Bioquímica e Biologia Molecular.

**Aluna:** Bruna Dias de Lima Fragelli  
**Orientadora:** Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal

**São Carlos – SP  
2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Bruna Dias de Lima Fragelli, realizada em 19/12/2022.

**Comissão Julgadora:**

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal (UFSCar)

Profa. Dra. Sandra Regina Costa Maruyama (UFSCar)

Profa. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius (UFSCar)

Prof. Dr. Marcelo de Assis (UJI/Espanha)

Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari (USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Dedico este trabalho aos meus amados pais Edinho e Valéria e ao meu namorado e futuro esposo, Jonathas. Aos meus avós Aparecida, Helio e Maria. Saudades! A minha orientadora Fernanda e às minhas amigas Joice, Krissia, Luciana e Cynthia.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Deus, ao Senhor Jesus Cristo e à minha amada mãe e protetora Nossa Senhora Aparecida por tudo o que me ocorreu na vida, fatos bons e ruins. Foi graças a isso que cresci, fortaleci meu caráter e sou feliz. E são eles quem me presenteiam todos os dias com a energia da vida, que me dão força e coragem para atingir os meus objetivos.

Aos meus pais, Valéria e Edinho, que recebo apoio e incentivo desde a infância em realizar meu sonho de cursar Biologia. Tenho certeza de que abdicaram de muitas coisas para eu realizar o meu sonho. Pai, mãe, meu muito obrigada. Eu amo vocês!

Ao meu irmão, Helio Raphael, pelo amor, amizade e por ter me dado a pessoa mais linda do mundo, meu sobrinho Antônio. Aos meus falecidos avós Vó Cida, Vó Maria e Vô Helio que me ajudaram de tantas formas e que me ensinaram o que é bondade e coragem. Saudades eternas!

Ao amor da minha vida, Jonathas Betune, que me ensina todo dia que o amor é paciente, generoso e leve. Eu te amo!

A minha amada tia Maria Angela pela amizade, incentivo e amor. Muito obrigada!

Ao meu amigo Gustavo que enfrentou comigo todos os obstáculos e os momentos de felicidade. Obrigada!

A minha querida orientadora, Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, por acreditar em mim e me dar um projeto lindo no qual me orgulho muito. Obrigada pela confiança e pela paciência ao longo desses anos. Mais do que uma orientadora é uma grande amiga. Muito obrigada!

Aos professores Dr. Adilson José da Silva e Dr. Ricardo Carneiro Borra, que contribuíram de maneira fundamental para a realização desse trabalho. Obrigada!

A Thaianne Robeldo que apoiou e me socorreu diversas vezes. Serei eternamente grata!

À equipe do LIDI, principalmente as minhas amigas Joice, Krissia, Luciana, Cynthia e Patty que ao longo desses anos se tornaram mais do que colegas de bancada, se tornaram amigas e irmãs, que me ajudaram nos experimentos, nos estudos e principalmente, nos momentos de medo e de dúvida. Não teria feito nada sem vocês. Muito obrigada!

À toda equipe do Departamento de Morfologia e Patologia, pela convivência feliz e pela contribuição nos trabalhos. Em especial ao Dr. Paulo Andrade, um grande exemplo. Obrigada!

À equipe do Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio Limitada, que forneceu os animais usados nesse trabalho. Obrigada!

Às equipes do Laboratório de Fábrica Celular do Departamento de Engenharia Química, pelo auxílio e contribuição nesse trabalho.

À equipe da Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular e à Equipe da Profa. Dra., Márcia Regina Cominetti do Laboratório de Biologia do Envelhecimento pela ajuda ao disponibilizar equipamentos. Muito obrigada!

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular por toda a formação acadêmica e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 que forneceu a bolsa de estudos. E pela apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da PETROBRAS. Obrigada.

*“Depois de aceitar suas falhas, ninguém poderá usá-las contra você.”*  
Tyrion Lennister/ George R. R. Martin

## RESUMO

IL-2 e TRAIL são agentes terapêuticos conhecidos por seu papel antitumoral, mas podem ser depurados rapidamente pelo organismo ou serem tóxicos, comprometendo sua função. Para reverter esse impasse, a síntese desses agentes por bactérias vivas diretamente no tumor é uma abordagem viável, devido à preferência das bactérias em infectar as células tumorais. Isso acontece devido à alta grade de nutrientes neste microambiente e fuga da ação protetora das células imunológicas, já que os tumores sólidos são isquêmicos e possuem regiões de hipóxia. Nesse contexto, *Salmonella* representa um vetor vivo promissor para entrega de moléculas com papel antitumoral. Este estudo investigou os efeitos de IL-2, TRAIL e MIX das proteínas expressas por *Salmonella* recombinante, linhagem SL3261, que contém plasmídeo para a sequência gênica de IL-2 e TRAIL, em células tumorais de bexiga no modelo *in vitro* e *in vivo*. Foram utilizadas as linhagens celulares de câncer de bexiga murina MB49 e humana RT4 e camundongos fêmea C57BL/6. Nos ensaios *in vitro* as células foram expostas por 24 e 48 horas a essas proteínas e as análises foram realizadas por citometria de fluxo, ELISA, corantes e anticorpos fluorescentes para detectar diversos parâmetros celulares: viabilidade, morfologia, recuperação, síntese de óxido nítrico, secreção de LDH, produção de citocinas inflamatórias e apoptose. Para o ensaio *in vivo* um tumor de bexiga foi induzido em camundongos fêmea pela inoculação de células MB49 seguida por tratamento intravesical, com posterior análise de sobrevida, peso das bexigas, regressão tumoral, perfil celular, liberação de citocinas e biodistribuição das linhagens bacterianas. Os dados obtidos apontam que ambos os agentes são citotóxicos para a célula tumoral, pois causam diminuição da viabilidade celular, modificação de sua morfologia própria e indução de apoptose tanto em MB49 quanto em RT4. Esse efeito é causado pela ativação da enzima iNOS pela IL-2, que induz a síntese de óxido nítrico com consequente ativação de genes que determinam a degradação do DNA, e pela ativação da família Caspase por TRAIL, levando à apoptose. Já nos testes *in vivo*, houve acentuada regressão tumoral, ativação de resposta imunológica devido a ação das proteínas, recrutamento celular contra células tumorais sem causar danos em tecidos saudáveis com efeito somente no tumor. Portanto, IL-2 e TRAIL expressas e veiculadas por SL3261 apresentam potencial promissor na terapia do câncer de bexiga, sendo que as proteínas apresentam sinergismo e que o MIX é mais efetivo.

**Palavras-chave:** SL3261; IL-2; TRAIL; Câncer de bexiga; Imunoterapia; Vetor vivo.



## ABSTRACT

IL-2 and TRAIL are therapeutic agents known for their antitumor role, but they can be rapidly cleared by the body or be toxic, compromising their function. To reverse this impasse, the synthesis of these agents by living bacteria directly in the tumor is a viable approach, due to the preference of bacteria to infect tumor cells. This happens due to the high nutrient grid in this microenvironment and escape from the protective action of immune cells since solid tumors are ischemic and have regions of hypoxia. In this context, *Salmonella* represents a promising live vector for delivering molecules with an antitumor role. In this context, *Salmonella* represents a promising live vector for delivering molecules with an antitumor role. This study investigated the effects of IL-2, TRAIL and MIX of proteins expressed by recombinant *Salmonella*, strain SL3261, which contains a plasmid for the gene sequence of IL-2 and TRAIL, in bladder tumor cells in *in vitro* and *in vivo* models. The murine MB49 and human RT4 bladder cancer cell lines and C57BL/6 female mice were used. In *in vitro* tests, the cells were exposed for 24 and 48 hours to these proteins and the analyzes were performed by flow cytometry, ELISA, dyes and fluorescent antibodies to detect several cellular parameters: viability, morphology, recovery, nitric oxide synthesis, secretion of LDH, production of inflammatory cytokines and apoptosis. For *in vivo* test, a bladder tumor was induced in female mice by inoculation of MB49 cells followed by intravesical treatment, with subsequent analysis of survival, bladder weight, tumor regression, cell profile, cytokine release and biodistribution of bacterial strains. The data obtained indicate that both agents are cytotoxic for the tumor cell, as they cause a decrease in cell viability, modification of its own morphology and induction of apoptosis in both MB49 and RT4. This effect is caused by the activation of the enzyme iNOS by IL-2, which induces the synthesis of nitric oxide with consequent activation of genes that determine DNA degradation, and by the activation of the Caspase family by TRAIL, leading to apoptosis. In the *in vivo* tests, however, there was marked tumor regression, activation of the immune response due to the action of proteins, cell recruitment against tumor cells without causing damage to healthy tissues with an effect only on the tumor. Therefore, IL-2 and TRAIL expressed and conveyed by SL3261 have promising potential in the therapy of bladder cancer and that the proteins present synergism and that the MIX is more effective.

**Keywords:** SL3261; IL-2; TRAIL; Bladder cancer; Immunotherapy; Live vector.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – O desenvolvimento do câncer-----	17
<b>Figura 2</b> – Causas do câncer -----	18
<b>Figura 3</b> – Incidência estimada conforme a localização primária do tumor e sexo em 2020 no Brasil	19
<b>Figura 4</b> – Mecanismo de Imunoedição -----	20
<b>Figura 5</b> – Processos de evasão do sistema imunológicos de células tumorais -----	21
<b>Figura 7</b> – Anatomia das regiões da bexiga acometidas pelo câncer-----	23
<b>Figura 8</b> – Taxa de sobrevida entre os sexos, sintomas e fatores de risco para o câncer de bexiga e sintomas -----	24
<b>Figura 9</b> – Taxas de incidência padronizadas por idade estimadas (Mundial) em 2018, bexiga, homens e mulheres, todas as idades -----	25
<b>Figura 10</b> – Câncer de bexiga no Brasil -----	26
<b>Figura 12</b> – Tratamentos alternativos para o câncer -----	29
<b>Figura 14</b> – Características inerentes das bactérias para tratamento antitumoral -----	32
<b>Figura 15</b> – Crescimento bacteriano em tumores sólidos por bioluminescência -----	33
<b>Figura 16</b> – Hipóxia tumoral-----	35
<b>Figura 18</b> – Eficiência de diversas linhagens de <i>Salmonella</i> contra tumores sólidos no modelo animal-- -----	37
<b>Figura 19</b> – Atenuação de SL3261 com deleção do gene <i>aroA</i> -----	40
<b>Figura 20</b> – Ação da IL-2 no combate ao câncer -----	42
<b>Figura 21</b> – Mecanismo de ativação de TRAIL -----	44
<b>Figura 22</b> – Cultivo das linhagens de SL3261 -----	47
<b>Figura 23</b> – Testes in vitro com as linhagens MB49 e RT4 -----	49
<b>Figura 24</b> – Design experimental em camundongos C57BL/6 -----	56
<b>Figura 25</b> – Emissão de fluorescência e dosagem dos níveis por ELISA das proteínas IL-2 e TRAIL em cultivo bacteriana -----	59
<b>Figura 26</b> – Viabilidade celular em % em células MB49 pelo ensaio com MTT-----	60
<b>Figura 27</b> – Viabilidade celular em % em células MB49 com as proteínas purificadas pelo ensaio MTT -----	61
<b>Figura 28</b> – Microscopia óptica da morfologia das células tumorais MB49 após 24 horas de exposição -----	62
<b>Figura 29</b> – Microscopia óptica da morfologia das células tumorais MB49 após 48 horas de exposição -----	62
<b>Figura 30</b> — Detecção dos níveis de LDH em células MB49 -----	63
<b>Figura 31</b> – Produção de óxido nítrico (NO) em células MB49 -----	64
<b>Figura 32</b> – Recuperação de células MB49 por meio da formação de colônias-----	64
<b>Figura 33</b> – Imagens do número de colônias formadas após recuperação celular após 24 horas de tratamento-----	65

<b>Figura 34</b> – Imagens do número de colônias formadas após recuperação celular após 48 horas de tratamento -----	<b>65</b>
<b>Figura 35</b> – Imagens de epi fluorescência de alta resolução de células MB49 para análise de morte celular por apoptose após 24 horas de exposição -----	<b>66</b>
<b>Figura 36</b> – Imagens de epi fluorescência de alta resolução de células MB49 para análise de morte celular por apoptose após 48 horas de exposição -----	<b>67</b>
<b>Figura 37</b> – Análise representativa da apoptose inicial e tardia por citometria de fluxo em células---	<b>68</b>
<b>Figura 38</b> – Apoptose inicial e tardia em células MB49 por citometria de fluxo -----	<b>69</b>
<b>Figura 39</b> – Viabilidade celular em % em células RT4 pelo ensaio com MTT -----	<b>70</b>
<b>Figura 40</b> – Viabilidade celular em % em células RT4 com o corante vermelho neutro -----	<b>71</b>
<b>Figura 41</b> – Autofagia em células RT4 -----	<b>71</b>
<b>Figura 42</b> – Microscopia óptica da morfologia das células tumorais RT4 após 24 horas de exposição -----	<b>72</b>
<b>Figura 43</b> – Microscopia óptica da morfologia das células tumorais RT4 após 48 horas de exposição -----	<b>72</b>
<b>Figura 44</b> – Produção de NO em células RT4 pela Reação de Griess-----	<b>73</b>
<b>Figura 45</b> – Recuperação de células RT4 por meio da formação de colônias-----	<b>74</b>
<b>Figura 46</b> – Imagens do número de colônias formadas de células RT4 após recuperação celular após 24 horas de tratamento -----	<b>75</b>
<b>Figura 47</b> – Imagens do número de colônias formadas de célula RT4 após recuperação celular após 48 horas de tratamento-----	<b>75</b>
<b>Figura 48</b> – Níveis de IL-6, IL-8 e TNF secretados por célula RT4 -----	<b>76</b>
<b>Figura 49</b> – Emissão de fluorescência e dosagem de níveis de Caspase 3 em células RT4 -----	<b>77</b>
<b>Figura 50</b> – Análise representativa da apoptose inicial e tardia por citometria de fluxo em -----	<b>78</b>
<b>Figura 51</b> – Apoptose inicial e tardia em células RT4 por citometria de fluxo -----	<b>79</b>
<b>Figura 52</b> – Curvas de crescimento das linhagens SL3261, SL3261_IL-2 e SL3161_TRAIL-----	<b>80</b>
<b>Figura 53</b> – Implantação tumoral e sobrevida dos animais C57BL/6-----	<b>80</b>
<b>Figura 54</b> – Peso das bexigas de camundongos C57BL/6-----	<b>81</b>
<b>Figura 55</b> – Biodistribuição das linhagens bacterianas na bexiga, fígado e baço de camundongos C57BL/6 -----	<b>81</b>
<b>Figura 56</b> – Perfil celular no plasma e sangue dos animais C57BL/6-----	<b>82</b>
<b>Figura 57</b> – Perfil celular no LCP dos animais C57BL/6-----	<b>83</b>
<b>Figura 58</b> – Dosagem dos níveis das citocinas TNF, IL-12 e IFN- $\gamma$ no plasma e no LCP dos animais C57BL/6 -----	<b>84</b>
<b>Figura 59</b> – Mecanismos desencadeados pela ação das proteínas IL-2 e TRAIL <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ---	<b>85</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 - Grupos e tratamentos</b>	<b>50</b>
--	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BCH** – Bacilo de Calmette e Guérin
- BID** – *BH3 Interacting Domain Death Agonist*
- cDNA** – Complementary Deoxyribonucleic Acid
- DIABLO** – *Diablo homolog*
- DISC** – *Death-Inducing Signaling Complex*
- DHB** – 2,3-dihidroxibenzóico
- DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DNA** – Deoxyribonucleic Acid
- D.O.** – Densidade ótica
- EDTA** – *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- ELISA** – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- EmGFP** - *Emerald Green Fluorescent Protein*
- HE** – Hematoxilina-Eosina
- HPV** – *Humana Papiloma Virus*
- IAP** – *Inhibitor of Apoptosis*
- NOS** – *Nitric Oxide Synthases*
- IL** – Interleucina
- INCA** – Instituto Nacional do Câncer
- IFN** – Interferon
- kDa** – Kilodalton
- LCP** – Líquido da Cavidade Peritoneal
- LPS** - Lipopolissacarídeo
- MHC** – *Major histocompatibility complex*
- MIBC** – Muscular Invasive Bladder Cancer
- mRNA** – Ácido Ribonucleico Mensageiro
- NB2** – Nível de Biossegurança 2
- NK** – Natural Killer
- LPS** – Lipopolissacarídeo
- NO** – Óxido Nítrico
- pABa** – Ácido p-aminobenzóico
- PAMP**– *Molecular Patterns Associated With Pathogens*

**PBS** – *Phosphate Buffered Saline*

**RNA** – *Ribonucleic Acid*

**SBCAL** – *Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório*

**TNF** – *Fator de Necrose Tumoral*

**TRAIL** – *TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*

**VN** – *Vermelho Neutro*

**WHO** – *World Health Organization*

**YFP** – *Yellow Fluorescent Protein*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
1.1 Câncer	17
1.2 Câncer de bexiga	21
1.3 Tratamentos convencionais	27
1.4 Tratamentos alternativos para câncer	28
1.5 Uso de bactérias como terapia antitumoral	30
1.6 <i>Salmonella</i>	36
1.7 Interleucina - 2 (IL-2)	40
1.8 TRAIL - Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF	42
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
2.1 Objetivo geral	45
2.2 Objetivos específicos	45
Mais especificamente pretende-se:	45
<i>In vitro</i> :	45
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Cultivo e manutenção de linhagens recombinantes de SL3261, SL3261_IL-2 e SL3261_TRAIL</b>	<b>46</b>
3.1.1 Linhagens recombinantes de <i>S. Typhimurium</i>	46
3.1.2 Cultivo, manutenção das linhagens de SL3261 e expressão de IL-2 e TRAIL	46
3.1.3. Curva de crescimento das linhagens SL3261, SL3261_IL-2 e SL3261_TRAIL	47
3.1.4 Leitura de fluorescência das cepas bacterianas	48
3.1.5 Dosagem dos níveis de IL-2 e TRAIL por ELISA	48
<b>3.2 Cultivo de células tumorais e ensaios <i>in vitro</i></b>	<b>49</b>
3.2.1 Cultivo de célula tumoral de bexiga murina (MB49) e humana (RT4)	49
3.2.2 Ensaio <i>in vitro</i>	50
3.2.3 Viabilidade celular pelo método MTT	51
3.2.4 Viabilidade celular pelo método com vermelho neutro	51
3.2.5 Morte celular por autofagia	52
3.2.6 Morfologia celular por microscopia óptica	52
3.2.7 Produção de Óxido Nitrico (NO) pela Reação de Griess	52
3.2.8 Recuperação celular via formação de colônias pelo ensaio clonogênico	53
3.2.9 Dosagem das citocinas IL-6, IL-8 e TNF	53
3.2.10 Dosagem dos níveis de Caspase 3	54
3.2.11 Apoptose por citometria de fluxo com os marcadores PE Anexina V e 7AAD	54
<b>3.3 Ensaio <i>in vivo</i></b>	<b>55</b>
3.3.1 Animais	55
3.3.2 Grupos experimentais, indução do câncer e tratamento	55
3.3.3 Eutanásia, obtenção e contagem das células do sangue	57
3.3.4 Plaqueamento de culturas do baço, fígado e tumor para contagem de UFC – Biodistribuição	57
3.3.5 Análise do peso das bexigas	57
3.3.6 Quantificação de citocinas IL-12, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$	57
<b>3.4 Análise estatística</b>	<b>58</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>58</b>

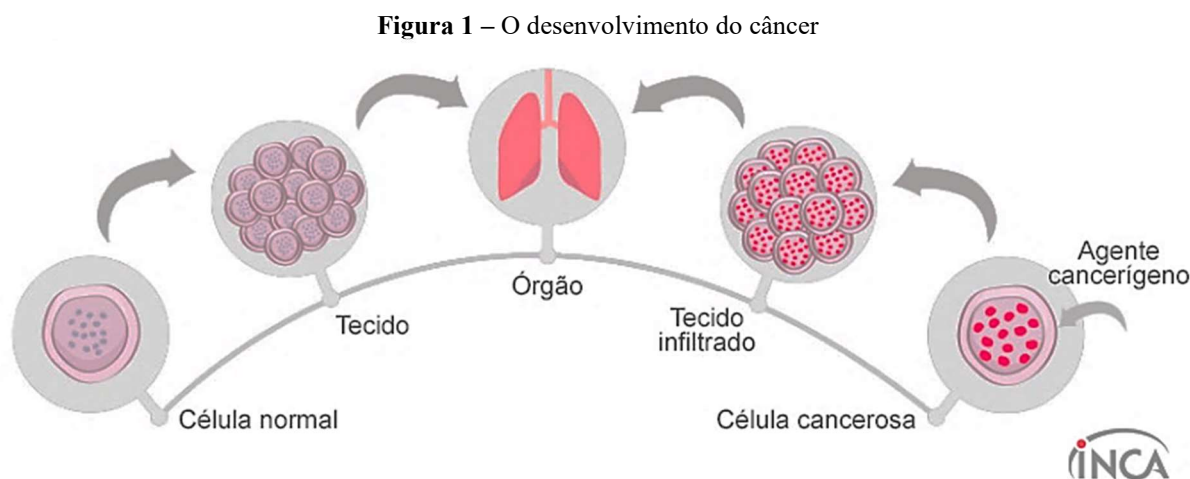
4.1 Cultivos bacterianos -----	58
4.2 Ensaio <i>in vitro</i> com a linhagem celular MB49 -----	59
4.3 Ensaio <i>in vitro</i> com a linhagem celular RT4 -----	69
4.4 Ensaio <i>in vivo</i> com camundongos da linhagem C57BL/6 -----	79
<b>4. DISCUSSÃO</b> -----	<b>85</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> -----	<b>95</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----	<b>96</b>
<b>7.1 Anexo 1: Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais - nº 8915061118</b> -----	<b>105</b>
<b>7.2 Anexo 2: Artigo publicado: Antitumor Effect of IL-2 and TRAIL Proteins Expressed by Recominant <i>Salmonella</i> in Muride Bladder Cancer Cell</b> -----	<b>106</b>
<b>7.3 Anexo 3: Artigo em processo de submissão</b> -----	<b>107</b>
<b>7.4 Anexo 4: Artigos publicados ao longo do Doutorado</b> -----	<b>107</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

A denominação câncer é dada para um grupo com mais de 100 tipos de doenças malignas, caracterizadas por células que crescem desordenadamente capazes de invadir tecidos e de se espalharem pelo organismo, gerando a metástase, isto é, proliferação celular em outros tecidos que não o de sua origem. Devido à alta velocidade de divisão, as células tumorais podem se tornar agressivas e incontroláveis, formando os tumores, que são acúmulos de células cancerosas gerando uma neoplasia maligna. Em contrapartida, um tumor primário é somente o acúmulo localizado de células que se multiplicam vagarosamente sem malignidade (INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2020). Outras nomenclaturas que a doença pode receber são tumores secundários e neoplasias (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022). Um resumo esquemático do desenvolvimento do câncer está representado na Figura 1.

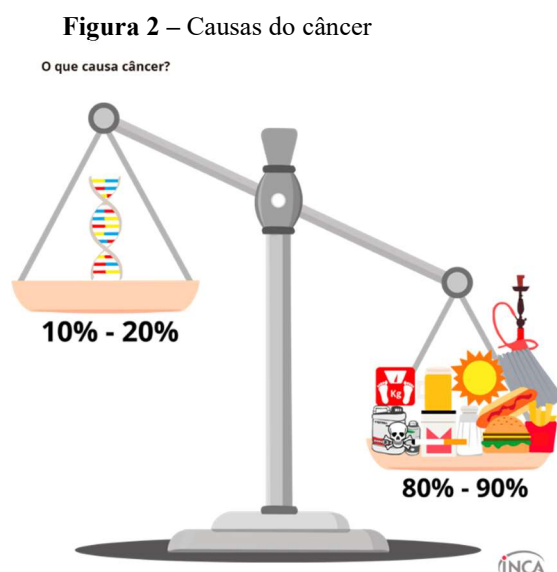


Células saudáveis se tornam cancerígenas levando a formação de tumores e metástases. Fonte: Adaptado de (INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2020).

Os diversos tipos de câncer variam com o tipo celular de origem. Cânceres de origem epitelial são denominados de carcinoma. Os que se originam de tecidos conjuntivos são denominados sarcoma, dos linfonodos são os linfomas e de origem sanguínea são as leucemias (INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2020).

As células cancerosas aparecem via uma sequência de alterações e mutações no material genético. As causas do surgimento do câncer são variadas, podendo ser externas, representando cerca de 85% das causas, ou internas, que representam cerca de 15%, como apresentado na Figura 2. As causas externas estão relacionadas à hábitos diversos e ao meio ambiente como raios ultravioleta, tabagismo, infecções virais, alimentação e substâncias químicas. Já as

internas são ligadas a fatores intrínsecos, a características genéticas, como mutações genéticas herdadas, a deficiência do sistema imune contra as primeiras alterações e aos erros na replicação do material genético (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022; INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022a; ONUCHIC; CHAMMAS, 2010). O envelhecimento também é um fator importante para o surgimento do câncer devido aos erros na reparação celular (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022).



Cerca de 10 a 20% das causas do câncer são de origem genética e de 80 a 90% são de origem ambiental. Fonte: (INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022a).

A morte por câncer ocupa o segundo lugar no ranking mundial, uma vez que doenças cardiovasculares ocupam o primeiro lugar (FITZMAURICE et al., 2017) e representa 1 a cada 6 mortes ((OMS) ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022). Em 2015, 8,7 milhões de pessoas morreram devido ao câncer e em 2020 o número aumentou para 10 milhões ((OMS) ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022; FITZMAURICE et al., 2017). Os cânceres de mama, pulmão, colorretal e próstata apresentam maior prevalência. Cerca de 30 % das mortes por câncer são decorrentes do tabagismo, alto índice de massa corporal, consumo de álcool, baixa ingestão de frutas e vegetais e falta de atividade física. Infecções causadoras de câncer, como papilomavírus humano (HPV) e hepatite, são responsáveis por aproximadamente 30% dos casos de câncer em países de baixa e média renda. A cada ano, aproximadamente 400.000 crianças desenvolvem câncer ((OMS) ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020).

Os tipos de cânceres mais comuns variam entre os países ((OMS) ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2022). Os cânceres de próstata, cólon, mama feminina, pulmão e reto

são os mais predominantes em países desenvolvidos e estão associados a processos de urbanização. Em contrapartida, nos países em desenvolvimento é alta a incidência de cânceres associados a doenças infecciosas (esôfago, estômago, fígado e colo do útero) (FERLAY et al., 2015). No Brasil, para homens mais comumente são os cânceres de próstata, colo e reto, traqueia, brônquio e pulmão. Nas mulheres são mama, colo e reto e útero (INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022b). A incidência dos demais tipos de câncer no Brasil é mostrada na Figura 3.

**Figura 3 - Incidência estimada conforme a localização primária do tumor e sexo em 2020 no Brasil**

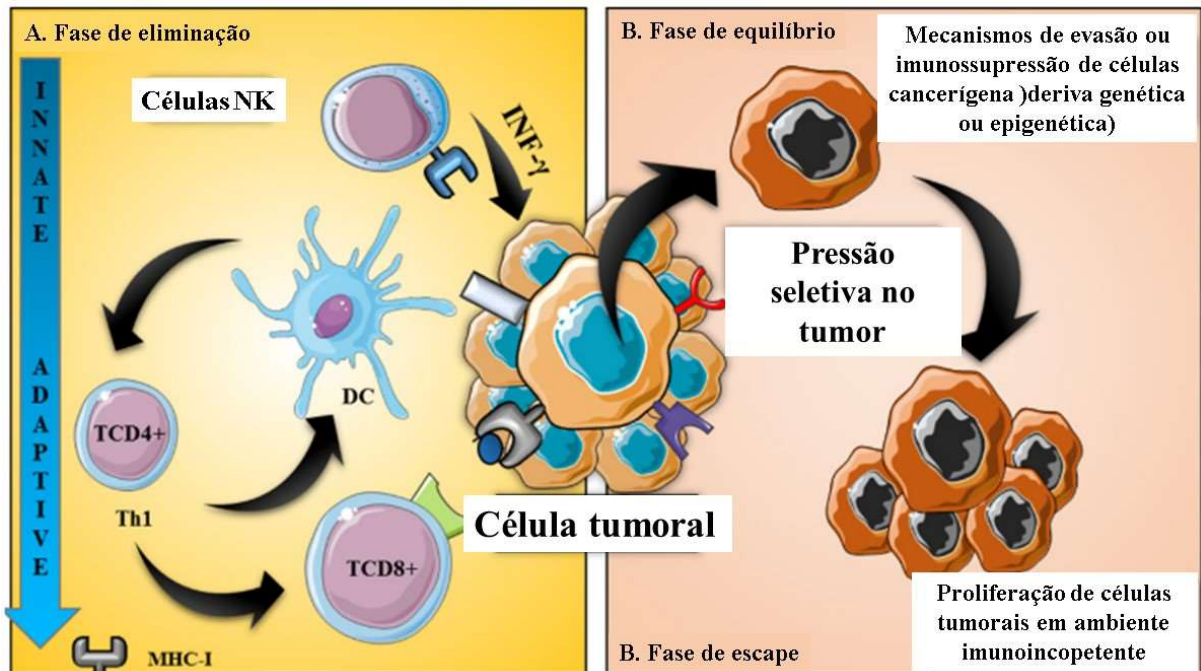
- Em mulheres, Brasil, 2020			- Em homens, Brasil, 2020		
Localização Primária	Casos Novos	%	Localização Primária	Casos Novos	%
Mama feminina	66.280	29,7	Próstata	65.840	29,2
Cólon e Reto	20.470	9,2	Cólon e Reto	20.540	9,1
Colo do útero	16.710	7,5	Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9
Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6	Estômago	13.360	5,9
Glândula Tireoide	11.950	5,4	Cavidade Oral	11.200	5,0
Estômago	7.970	3,5	Esôfago	8.690	3,9
Ovário	6.650	3,0	Bexiga	7.590	3,4
Corpo do útero	6.540	2,9	Laringe	6.470	2,9
Linfoma não-Hodgkin	5.450	2,4	Leucemias	5.920	2,6
Sistema Nervoso Central	5.230	2,3	Sistema Nervoso Central	5.870	2,6
Todas as Neoplasias, exceto pele não melanoma	223.110	100,0	Todas as Neoplasias, exceto pele não melanoma	225.960	100,0
Todas as Neoplasias	316.280		Todas as Neoplasias	309.750	

Incidência dos tipos de câncer no Brasil entre mulheres, com maior prevalência de câncer de mama e homens, com maior prevalência de câncer de próstata. Fonte: Adaptado de (INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022b)

A cada ano, mais de 18 milhões de novos casos de câncer são diagnosticados em todo o mundo. Globalmente, uma em cada cinco pessoas desenvolverá a doença antes dos 75 anos, mas isso varia de 1 em cada 10 na Ásia Central do Sul e em regiões da África, e 1 em 2,5 na Austrália e Nova Zelândia. Atualmente, existem aproximadamente 44 milhões de pacientes com câncer vivos que foram diagnosticados há menos de 5 anos. Quase 10 milhões de pessoas morrem de câncer anualmente (BRAY et al., 2018).

Há um processo chamado imunovigilância em que as células de defesa têm a capacidade de identificar células anormais, como as tumorais, e eliminá-las. As células *natural killers* (NK), os linfócitos T citotóxicos (TCD8) e os macrófagos são as principais envolvidas nesse processo contínuo e bidirecional entre os tipos de resposta inato e adaptativo. O câncer ocorre quando esse sistema falha e se torna detectável clinicamente em estágios cuja doença está avançada e está sob o processo de imunoeedição em que há favorecimento do desenvolvimento tumoral devido ao ambiente imunossuprimido (TORRES et al., 2018). Esse processo de imunoeedição tem 3 fases: eliminação, equilíbrio e escape, que são mostrados na Figura 4. A etapa de eliminação tem mecanismos similares à imunovigilância (TORRES et al., 2018).

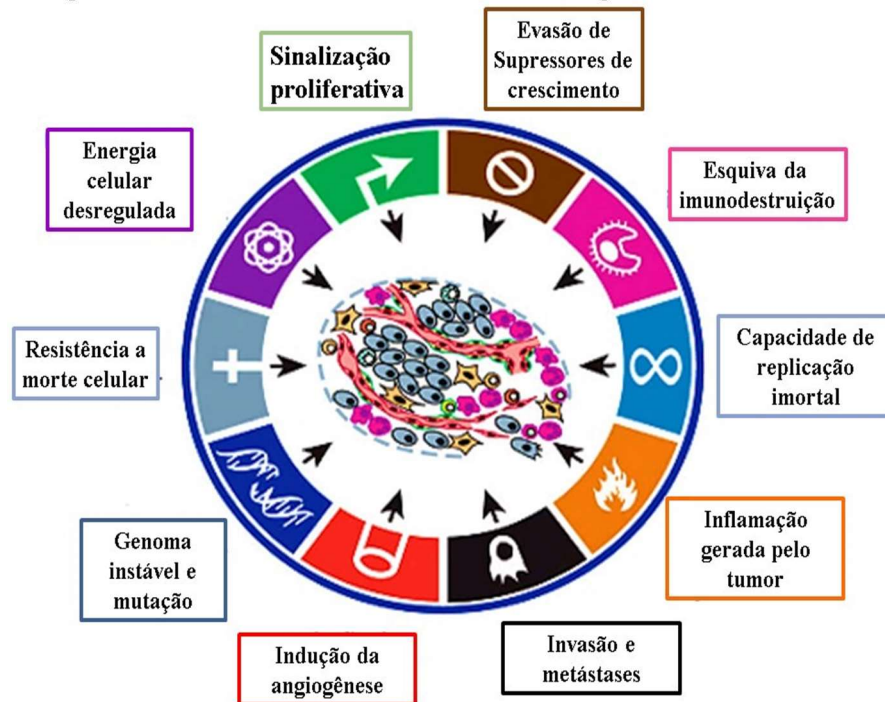
**Figura 4 – Mecanismo de Imunoedição**



A Imunoedição apresenta três fases: A. Eliminação: após a proliferação das células tumorais ocorre indução de resposta inflamatória pelo tecido lesionado, tendo como consequência a ativação da resposta imune inata com a migração de células de defesa; B. Fase de equilíbrio: devido a esse processo de eliminação ser contínuo, uma pressão seletiva nas células que pode causar rearranjo genético ou epigenético, que faz com que certas células esquivem desses mecanismos efetores imunológicos; C. Fase de escape: há células que conseguiram driblar desses mecanismos e ganham capacidade de crescimento descontrolada. DC: células dendríticas; MHC: complexo principal de histocompatibilidade; NK: *Natural Killer*. Fonte: Adaptado de (TORRES et al., 2018).

A modificação de uma célula saudável em uma célula tumoral depende de alterações fisiológicas da célula, mostradas na Figura 5, que dão 10 características para essa célula anormal (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Essas modificações incluem a sinalização proliferativa sustentada, evasão de supressores de crescimento, evasão de apoptose, potencial replicativo ilimitado, indução de angiogênese e invasão tecidual, metástase, reprogramação do metabolismo energético, evasão da destruição imunológica, instabilidade do genoma que leva a diversidade genética e aceleração dessas aquisições, e por fim a inflamação, que promove múltiplas alterações de funções.

**Figura 5** – Processos de evasão do sistema imunológicos de células tumorais



As dez características desenvolvidas nas células anormais adquiridas do câncer que permitem a sobrevivência, proliferação e disseminação de células tumorais. Fonte: Adaptado (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Os tumores cancerosos são massas de células malignas que afetam e corrompem a função e a saúde de outras células do corpo (BALKWILL; CAPASSO; HAGEMANN, 2012). No entanto, não somente células cancerígenas compõem um tumor, mas sim as células normais adjacentes, como os fibroblastos e células endoteliais, e estas são importantes na progressão tumoral, formando o chamado microambiente tumoral. O tumor é um tecido de alta complexidade com homeostasia tecidual original prejudicada que força as células saudáveis adjacentes a agir de acordo com a dinâmica tumoral. Cada alteração, que é oriunda de um mecanismo molecular distinto, torna a célula tumoral mais capaz de superar estratégias de combate. Quanto mais alterações, maior é a malignidade do tecido (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

## 1.2 Câncer de bexiga

A bexiga é o órgão responsável pelo armazenamento e eliminação da urina de maneira periódica e, para que essas funções ocorram adequadamente, é necessária a preservação dos tecidos. A bexiga é oca e possui tecido de revestimento interno, denominado urotélio. Externamente a este tecido há a lâmina própria e as musculaturas lisa e adventícia (GOMES; HISANO, 1975). O câncer de bexiga (Figura 6) é uma das principais causas de mortes



relacionadas ao câncer nos países ocidentais. É o nono tipo de câncer mais comum no mundo. Por razões ainda não bem compreendidas, acometem de três a quatro vezes mais os homens do que em mulheres (INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022c).

**Figura 6 – Câncer de bexiga**

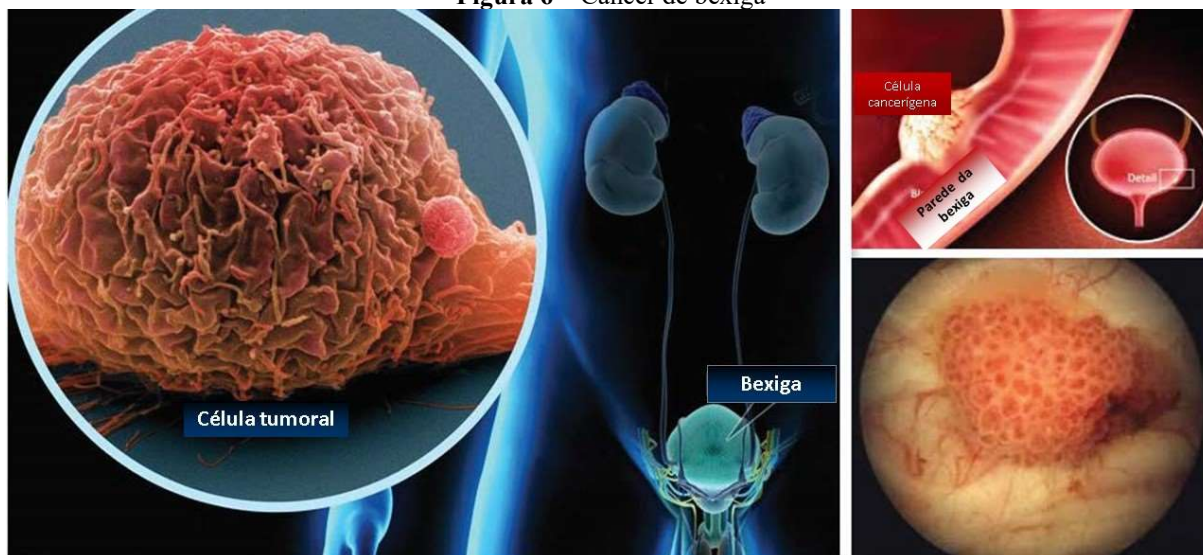
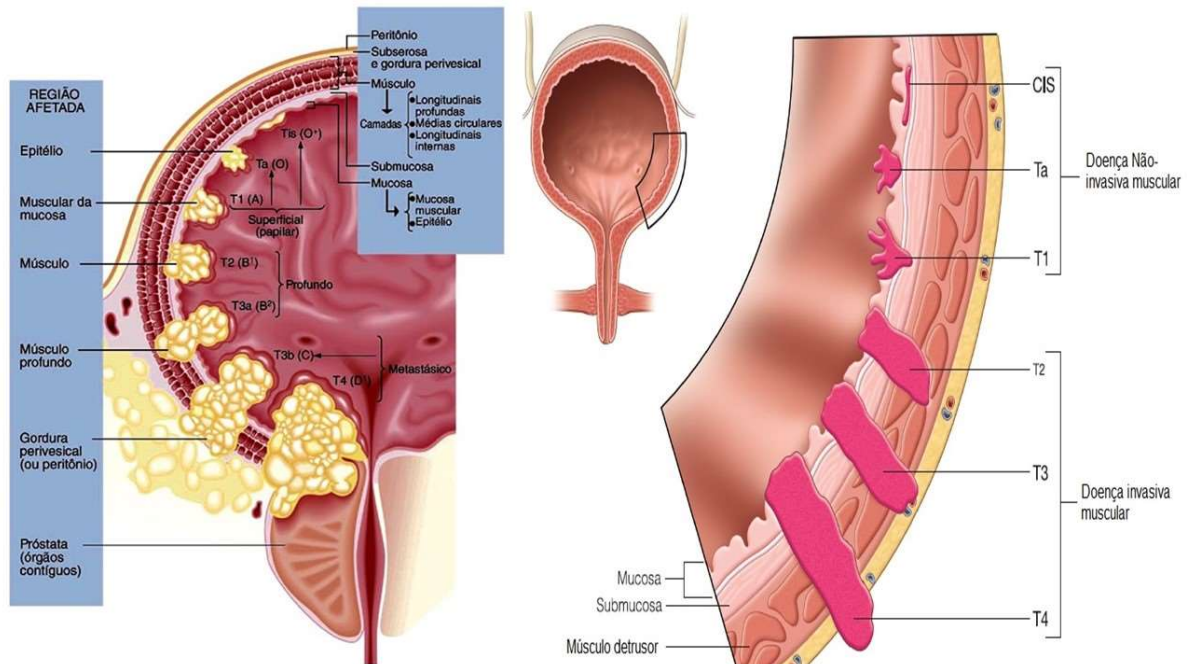


Imagem esquemática da localização da bexiga; Esquema de uma massa tumoral localizada na porção interior do órgão; Foto real de um tumor na bexiga. Fonte: Adaptado de (COMPARATIVE BIOSCIENCES, 2020).

O câncer de bexiga acomete as células que recobrem o órgão e é subdividido em tipos de acordo com a célula que sofreu alteração (Figura 7): 1. Carcinoma de células de transição, que acomete a porção mais interna do órgão e representa a maioria dos casos; 2. Carcinoma de células escamosas, surge em células planas e delgadas e ocorre depois de uma infecção prolongada e; 3. Adenocarcinoma, que acomete as células glandulares também após longo período de inflamação. Quando o câncer se limita ao tecido de revestimento da bexiga, é chamado de superficial. O câncer que começa nas células de transição pode se disseminar através do revestimento da bexiga, invadir a parede muscular e alcançar os órgãos próximos ou gânglios linfáticos, transformando-se num câncer invasivo (INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022c).

**Figura 7 – Anatomia das regiões da bexiga acometidas pelo câncer**

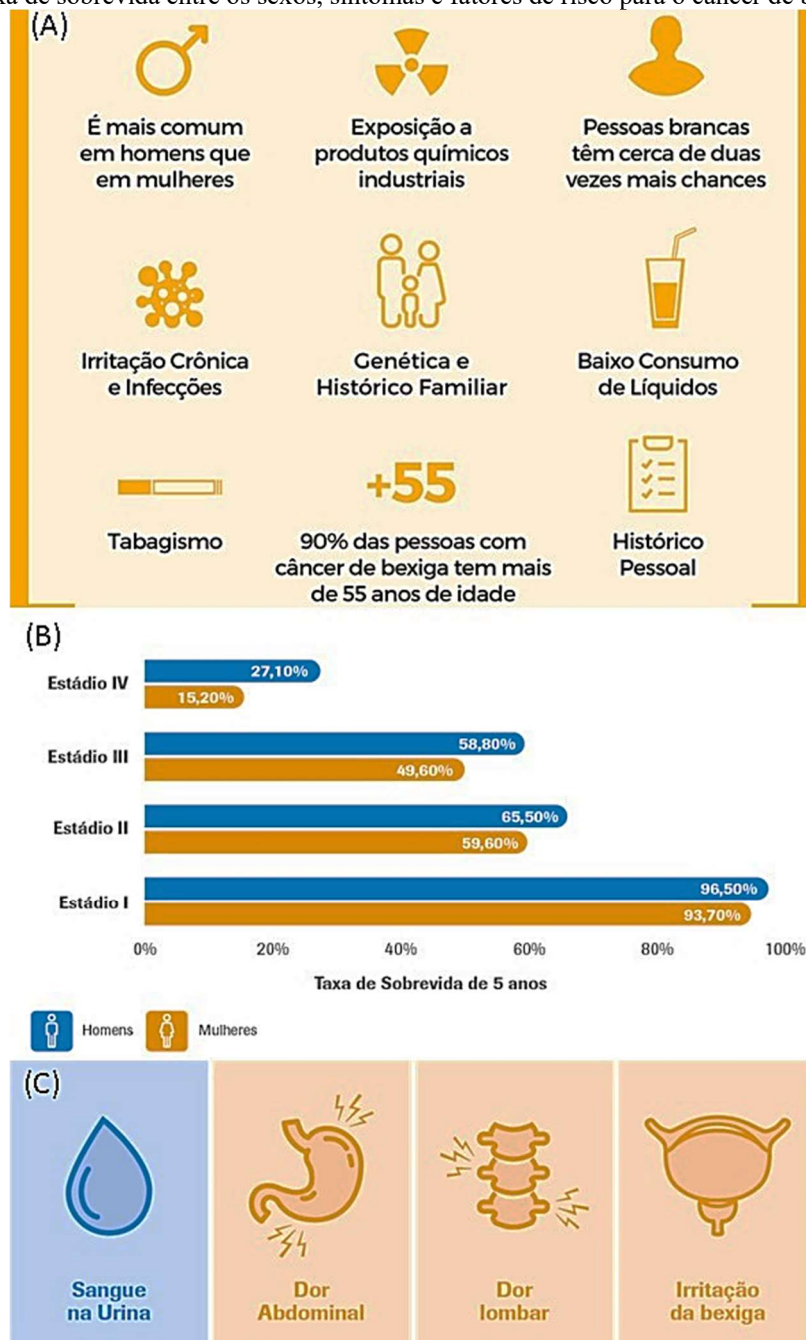


O câncer de bexiga afeta as células de revestimento do órgão e muscular. Fonte: Adaptado de (MEDICINANET, 2015; NÚCLEO DE ESTUDO EM ONCO-UROLOGIA, 2014).

A maioria dos cânceres de bexiga é derivada do urotélio. Um número consideravelmente menor se desenvolve na pelve renal e no ureter (trato superior), que também são revestidos por urotélio. Tumores que invadem o músculo detrusor são considerados câncer de bexiga músculo-invasivo (MIBC) e são mais propensos a metástase para linfonodos ou outros órgãos (NADAL; BELLMUNT, 2019). Aproximadamente 75% dos pacientes recém-diagnosticados têm câncer de bexiga não invasivo ao músculo, com os 25% restantes tendo MIBC (ANTONI et al., 2017) ou doença metastática (SMITH et al., 2014). Embora o diagnóstico precoce e a terapia multimodal resultem em ótimos resultados para o paciente, a doença metastática geralmente é incurável, com uma taxa de sobrevivência global de 5 anos relativa de 15% (NADAL; BELLMUNT, 2019).

O tabagismo é a maior causa externa do surgimento desse tipo de câncer, além da exposição a certas substâncias, como o arsênico. No entanto, inflamações crônicas também são responsáveis pelo aparecimento da doença, principalmente infecções causadas por *Schistosoma haematobium*, um parasita que habita trato urinário (STEWART; WILD, 2014). Além disso, os demais fatores de risco, resumidos na Figura 8C, são o baixo consumo de água, idade superior a 55 anos e histórico familiar além de ter maior prevalência em homens (Figura 8A). Os sintomas são sangue na urina, dor durante o ato de urinar e necessidade frequente de urinar, mas sem conseguir fazê-lo (Figura 8B).

**Figura 8** – Taxa de sobrevivência entre os sexos, sintomas e fatores de risco para o câncer de bexiga e sintomas



O câncer de bexiga é mais comum em homens do que em mulheres e em pessoas com mais de 55 anos. A principal causa é o tabagismo, mas também ocorre por infecções, baixa ingestão de líquidos e fatores genéticos. Quanto maior o avanço da doença, menor é a taxa de sobrevivência. Os principais sintomas são sangue na urina, dor abdominal e lombar e irritação na bexiga. Fonte: Adaptado de (INSTITUTO AMERICAS, [s.d.]).

O câncer de bexiga é uma doença altamente maligna. A maioria dos dados disponíveis é baseada em análises retrospectivas, e cada fator de risco para esse tipo de doença deve ser visto à luz das interações genético-ambientais para melhor avaliar seu impacto. Estudos mostram, no entanto, que a principal causa do câncer de bexiga é a alta prevalência de tabagismo e, além da importância da prevenção primária ser enfatizada, programas de cessação

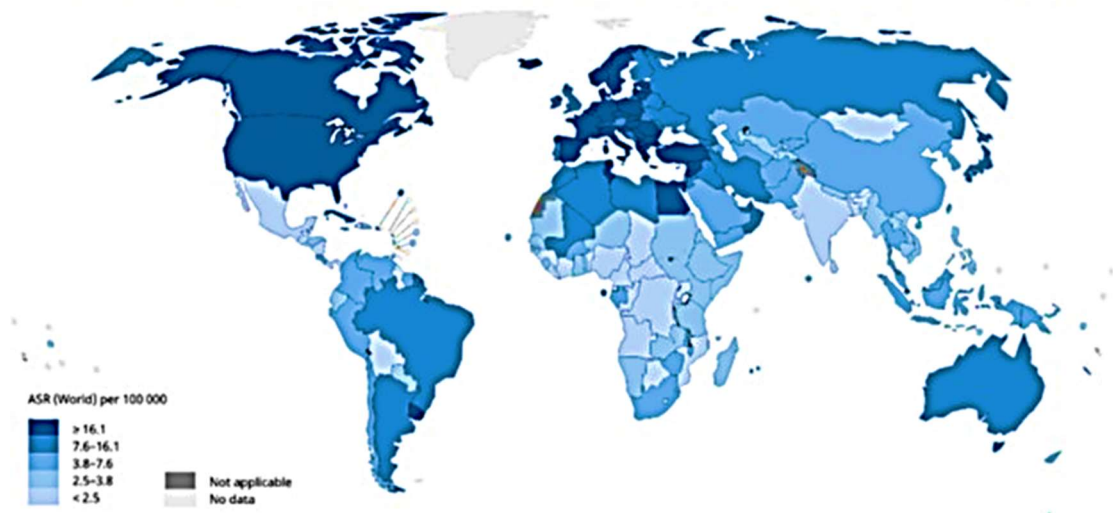


do tabagismo devem ser incentivados e apoiados, uma vez que o número de pacientes e doenças relacionadas, como o câncer de bexiga, é exorbitante (BURGER et al., 2013). É necessário investigar novos tratamentos, terapias e medicamentos para melhorar o quadro mundial do câncer de bexiga.

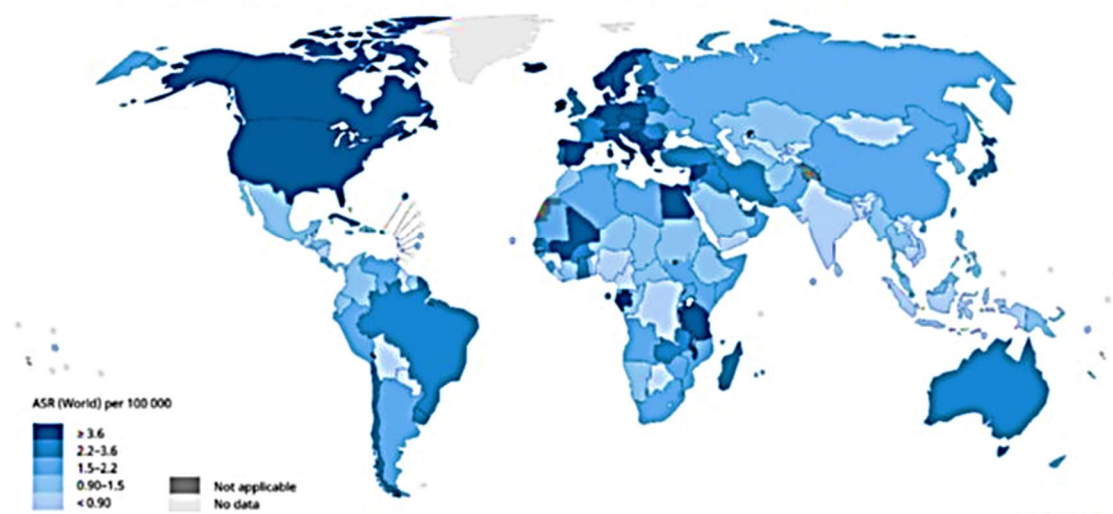
A maioria dos casos de câncer de bexiga está atualmente caindo nas comunidades mais desenvolvidas em todo o mundo, embora ainda seja prevalente nessas regiões do globo (Figura 9). Com uma mudança prevista na demografia mundial com populações crescentes e envelhecidas, principalmente no continente africano, e mudanças importantes na exposição a diferentes fatores de risco, é provável que isso mude nas próximas décadas (RICHTERS; ABEN; KIEMENEY, 2020).

**Figura 9** - Taxas de incidência padronizadas por idade estimadas (Mundial) em 2018, bexiga, homens e mulheres, todas as idades

**Taxas de incidência padronizadas por idade estimadas (Mundial) em 2018, bexiga, homens, todas as idades**

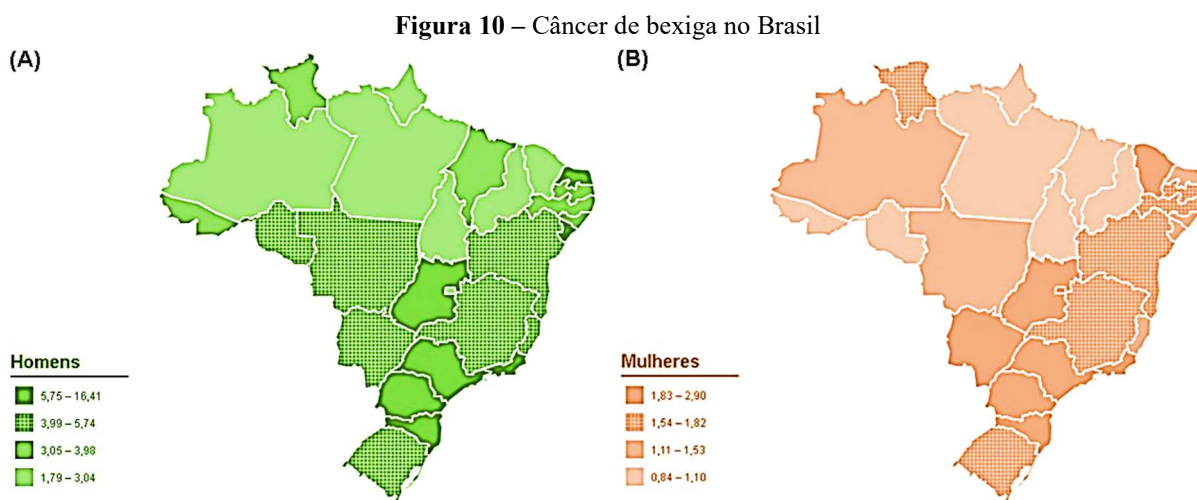


**Taxas de incidência padronizadas por idade estimadas (Mundial) em 2018, bexiga, mulheres, todas as idades**



Países ocidentais e em desenvolvimento apresentam maior incidência de câncer de bexiga. Fonte: (RICHTERS; ABEN; KIEMENEY, 2020).

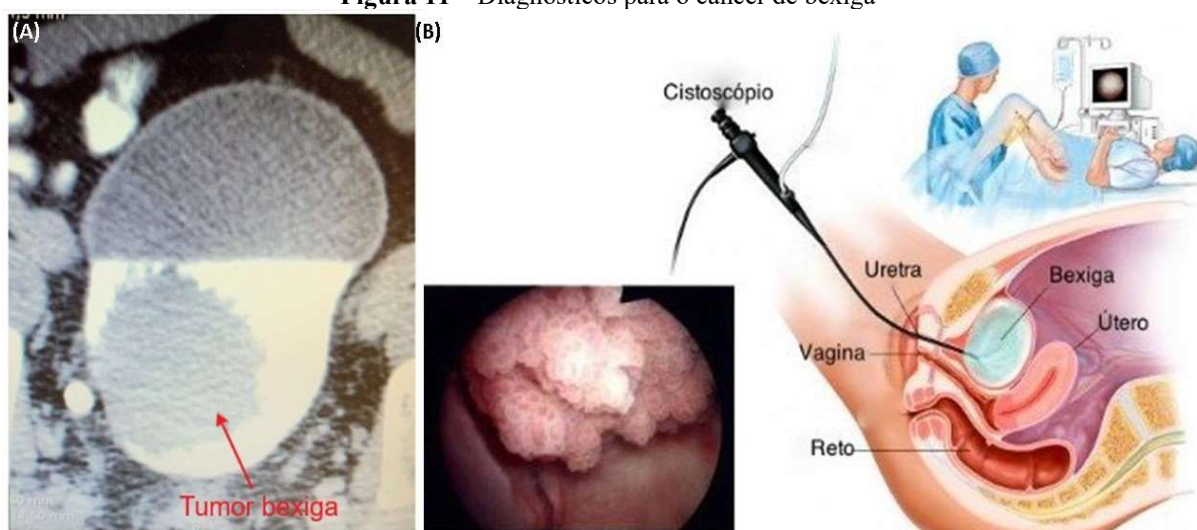
O câncer de bexiga é um dos 10 tipos de câncer mais incidentes no Brasil (Figura 10), com uma incidência de 3,4%, sendo as regiões Sul e Sudeste as que apresentam maior prevalência de casos. O número de novos casos foi de 10.640, sendo 7.590 em homens e 3.050 em mulheres em 2020 e o número de mortes foi de 4.595, sendo 3.097 homens e 1.498 mulheres (INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022c).



Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2020, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da bexiga). (A) em homens. (B) em mulheres. Fonte: (INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2021).

O diagnóstico do câncer de bexiga pode ser feito por exames de urina ou de imagem, como tomografia computadorizada (Figura 11.A) e a cistoscopia (Figura 11.B) em que o interior da bexiga é examinado por um instrumento com câmera acoplada e pode ser retirado uma porção do órgão para biópsia. A probabilidade de cura do câncer de bexiga dependerá do estado geral de saúde do paciente e a extensão ou estadiamento do câncer, sendo superficial ou invasivo (INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022c).

**Figura 11** – Diagnósticos para o câncer de bexiga



Os dois tipos de diagnóstico são mostrados. Em A há imagem de tomografia computadorizada. Em B esquema de cistoscopia. Fonte: Adaptado de (INCA (RIO PRETO) - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016).

### 1.3 Tratamentos convencionais

Embora haja evidências da imunogenicidade do tecido tumoral, a fraca resposta do sistema imunológico no controle e eliminação do câncer é um obstáculo importante enfrentado na terapia. A existência de linfócitos T específicos de células tumorais no sangue e nos linfonodos com infiltração tumoral é, muitas vezes, incapaz para controlar o desenvolvimento tumoral (AL-RAMADI et al., 2008). A quimioterapia, a radioterapia e os processos cirúrgicos configuram os tratamentos convencionais.

Em relação ao câncer de bexiga, a quimioterapia ocorre de duas maneiras: a sistêmica, em que a ingestão na forma de medicamentos é oral ou venosa, ou mesmo intravesical, isto é, medicamento aplicado via tubo introduzido na uretra. A radioterapia é aplicada em tumores muito agressivos, a fim de preservar a bexiga. E por fim, há a cirurgia, que ocorre de 3 maneiras: 1. ressecção transuretral (remoção do tumor por via uretral); 2. cistectomia parcial (retirada de uma parte da bexiga) e; 3. cistectomia radical (remoção completa da bexiga, com a posterior construção de um novo órgão para armazenar a urina) (INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2022c).

A quimioterapia e a radioterapia são os tratamentos utilizados para o controle e cura do câncer. A quimioterapia convencional ou radioterapia por si só não são suficientes para erradicar todas as células malignas no câncer avançado, resultando em recorrência da doença com múltiplas desvantagens, como afetar não especificamente células normais, incluindo células imunes eficazes e promover uma geração de células cancerígenas resistentes a drogas e radioterapia, induzindo toxicidade sistêmica e local durante o tratamento (QIAO; LIU; FU,

2016). Ademais, as áreas tumorais são isquêmicas e carentes em vascularização, limitando o tratamento quimioterápico. O desenvolvimento de uma terapia mais seletiva e eficiente busca contornar esses obstáculos, principalmente no controle das metástases (CHOROBK; MARCINKIEWICZ, 2011).

Outro problema na quimioterapia padrão é a resistência à múltiplas drogas, o que limita a eficiência do tratamento, inclusive e, mais preocupante, em estágios avançados da doença. A resistência surge a partir de dois processos. O primeiro é a diminuição da sensibilidade das células e o segundo é a limitação do fármaco ao penetrar a célula, que ocorrem devido à heterogeneidade do ambiente tumoral e características inerentes ao tumor, como vasculatura caótica, presença de grandes distâncias entre os capilares e fluxo sanguíneo bem variável. Isso gera células com alta perfusão e proliferação, células pouco alcançadas, quiescentes e, por fim, células apoptóticas e necróticas, isto é, sem vascularização. A perfusão deficiente limita a entrega dos fármacos pelo sangue, já que as substâncias devem percorrer uma distância maior através dos tecidos intersticiais, quando a inoculação é distante do tumor, o que leva a diminuição das concentrações de fármaco necessária (KASINSKAS; FORBES, 2006a).

Devido aos tratamento convencionais apresentarem limitações, como alta toxicidade para células de tecidos normais, gerando efeitos colaterais devastadores, dificuldade de fármacos atingirem tecidos tumorais profundos e resistência a drogas em células tumorais, abordagens alternativas têm sido buscadas (LIANG et al., 2019a).

#### **1.4 Tratamentos alternativos para câncer**

Existem tratamentos alternativos à quimioterapia e radioterapia (Figura 12). São eles: fototerapia, plantas medicinais, anticorpos monoclonais, quimionebulização e bactérias vivas (VICKERS, 2004).

A fototerapia é uma terapia promissora que busca erradicar os tumores via irradiação de luz. O procedimento é combinada com diversas imunoterapias através de moléculas ativadas por luz, atuação em vias metabólicas, regulação de células T e principalmente uso de nanopartículas e tem se mostrado extremamente eficiente (NG; LI; PU, 2018).

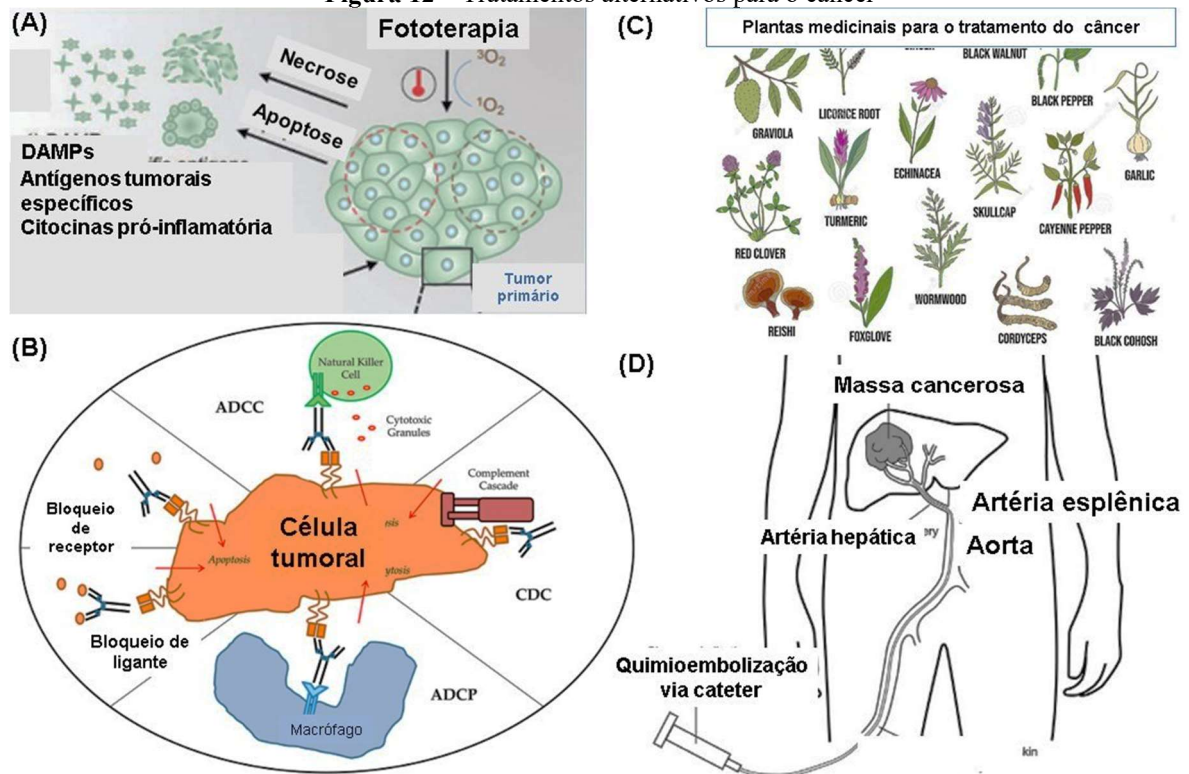
A imunoterapia com anticorpos monoclonais já é considerada um componente importante do tratamento do câncer, juntamente com a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Os anticorpos monoclonais têm uma variedade de mecanismos de ação clinicamente relevantes e podem ser direcionados às células tumorais, facilitando a estimulação de uma resposta imune

antitumoral de longo prazo, através do bloqueio de ligantes e receptores, ativação de vias do sistema complemento e síntese de citocinas (NG; LI; PU, 2018).

Os compostos fitoterápicos configuram potenciais fontes de agentes antitumorais e apresentam vantagens como disponibilidade dos materiais, acessibilidade, baixo custo e pouco ou nenhum efeito colateral, ampla aplicabilidade e eficácia terapêutica. A Organização Mundial de Saúde (OMS) apoia o uso de medicamentos tradicionais que são eficazes e não tóxicos. Há um número grande de espécies estudadas com efeito antitumoral corroborado em diferentes modelos (NG; LI; PU, 2018).

Quimioembolização é uma outra técnica que utiliza a combinação da injeção local de medicamentos de quimioterapia com o procedimento de embolização para tratar o câncer. As drogas anticancerígenas são injetadas diretamente no vaso sanguíneo que alimenta o tumor e o agente embólico. Foi demonstrado que o uso da quimioembolização transarterial proporciona um benefício de sobrevida com base em ensaios clínicos randomizados (NG; LI; PU, 2018).

Figura 12 – Tratamentos alternativos para o câncer



(A) Fototerapia. (B) Anticorpos monoclonais. (C) Plantas medicinais com compostos antitumorais. (D) Quimioembolização. Fonte: Adaptado de (JAIN et al., 2016; NG; LI; PU, 2018; SCOTT; ALLISON; WOLCHOK, 2012; TAM; LEUNG; WANG, 2011).

Outra possibilidade para o tratamento do câncer é aplicação de bactérias vivas. Essa abordagem se baseou em estudos que tiveram início no final do século XIX e foram amplamente investigadas e hoje é um tratamento adjuvante promissor.



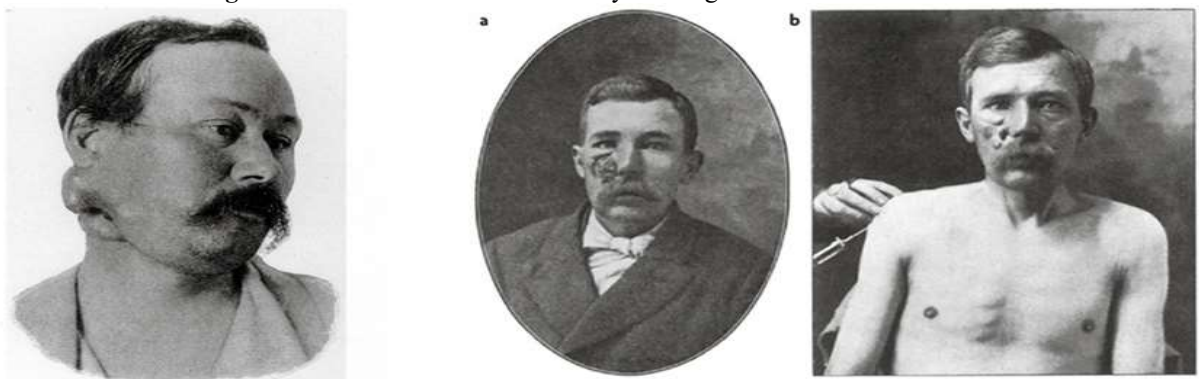
### 1.5 Uso de bactérias como terapia antitumoral

As bactérias são microrganismos procariontes de tamanho diminuto, com micrômetros de comprimento e com diversas formas como bastonetes, esferas e espirais. Primariamente, as bactérias eram somente consideradas agressores que interagiam com o hospedeiro gerando doenças. Contudo, é sabido que a interação entre hospedeiro e patógeno não é sempre nociva (PATYAR et al., 2010).

Novos tratamentos para o câncer vêm sendo testados há décadas pela ciência. A abordagem que utiliza bactérias vivas é um deles, sendo que o primeiro registro data de mais de 100 anos (PAWELEK; LOW; BERMUDES, 2003). Foi observado pelos médicos W. Busch e F. Fehleisen, na Alemanha, que determinados cânceres retrocediam após pacientes se infectarem, de maneira acidental, com a bactéria *Streptococcus pyogenes*, no decorrer do período de internação e hospitalização (PATYAR et al., 2010).

O médico William Coley, em Nova York, no ano de 1893 observou os mesmos padrões identificados pelos médicos alemães e criou a “Toxina de Coley”, uma combinação de *Streptococcus pyogenes* e *Serratia marcescens*. Ao injetar a mistura de bactérias mortas em pacientes, os tumores regrediram, como mostrado na Figura 13 (COLEY, 1893). Posteriormente, ele refinou o método matando as bactérias por calor e tratou de maneira extremamente satisfatória as diversas classes de câncer (sarcoma, mieloma, o carcinoma, melanoma e linfoma). Estes estudos de Coley foram a base para a elaboração de uma imunoterapia usando linhagens bacterianas atenuadas. As espécies bacterianas mais estudadas e aplicadas são: *Listeria monocytogenes*, *Clostridium novyi* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (daqui em diante referida como *Salmonella* Typhimurium) (KAIMALA et al., 2018).

**Figura 13** – Paciente de William Coley com regressão de tumor na face



Após a aplicação da terapia o tumor facial regrediu e o paciente se curou. Fonte: Adaptado de (ENGELKING, 2016).

James Ewing, patologista renomado na época e chefe de Coley, o convenceu a interromper todos os seus estudos alegando que os dados eram inconsistentes e se manifestou a favor de estudos com radioterapia (KRAMER et al., 2018). Coley faleceu em 1936 e a radioterapia e a quimioterapia passaram a ser os tratamentos convencionais do câncer, contudo haviam ressalvas pois, eram muito imunossupressores (PATYAR et al., 2010). Contudo, os pacientes tratados com quimio e radioterapia não apresentaram taxa de sobrevida superiores aos estudos de Coley (PATYAR et al., 2010).

Nos anos seguintes, os estudos indicavam que se o câncer estivesse em estágio inicial, assim como a infecção causada pelas bactérias, a regressão do tumor ocorria e o paciente sobrevivia. Porém, a sociedade científica não aceitava os dados pois, o modelo era difícil de reproduzir e não se encaixava nas normas de ensaios clínicos. Estudos foram realizados em camundongos e demonstraram que o sistema imunológico do animal, através do estímulo da infecção bacteriana, reduziu as dimensões tumorais. Além disso, estudos relataram que o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de bactérias gram negativas era responsável pela síntese e liberação da citocina Fator de Necrose Tumoral (TNF), que leva a ativação do sistema imunológico e diminuição dos tumores (CARSWELL et al., 1975). Nos anos seguintes, pesquisas com adjuvantes bacterianos resultaram num vasto conhecimento sobre o assunto em que Willian Coley é considerado o fundador (PAWELEK; LOW; BERMUDES, 2003).

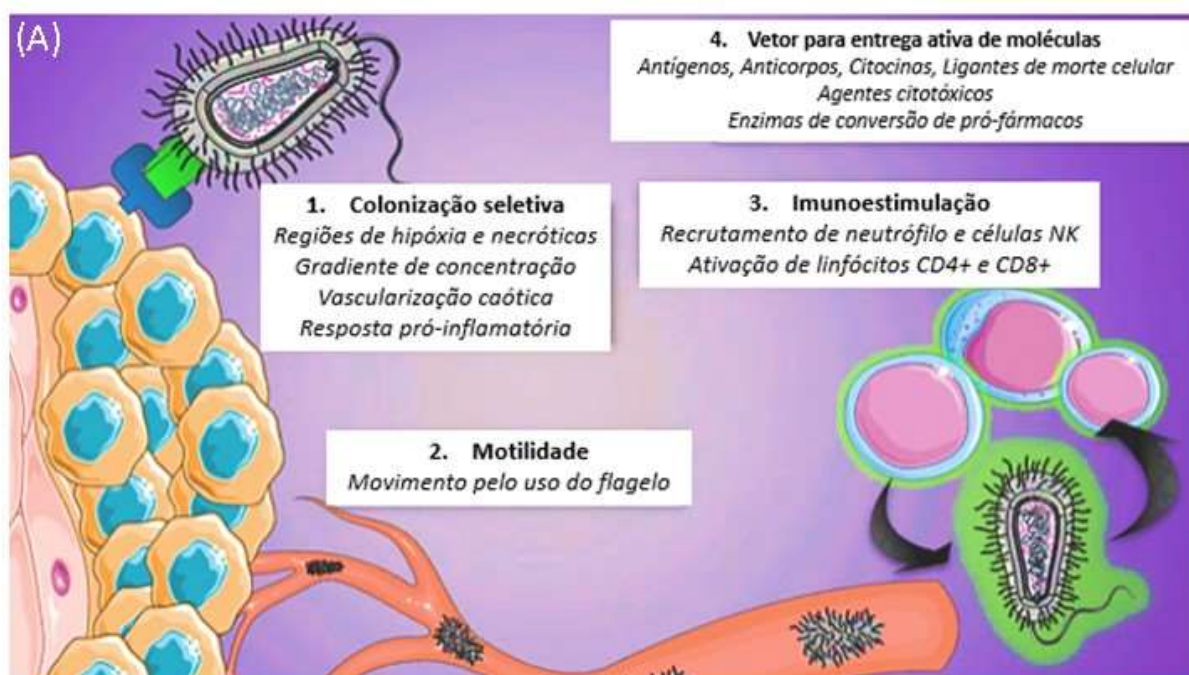
Nos últimos anos, a pesquisa nessa área aumentou e pesquisadores comprovaram a eficiência da aplicação de organismo procariontes no tratamento de tumores sólidos (LIANG et al., 2019). O que corrobora isso foram estudos modernos em genética, biologia molecular, cultivo de células cancerígenas e imagens que mostram que ocorre: acumulação preferencial em células cancerosas, replicação seletiva e destruição de massas malignas sólidas em roedores, ação antitumoral via resposta imune e condução direta para nódulos metastáticos de pequeno tamanho e distribuídos pelo organismo, inibindo o desenvolvimento tumoral. Porém, ainda há alguns impasses para essa terapia como o alto potencial mutagênico das bactérias que pode reverter o fenótipo expresso e comprometer o paciente. Com isso, estudos para construir um quadro mais vasto e integrado deve ser feito para garantir avanços nesse assunto (KRAMER et al., 2018).

Devido ao avanço de ferramentas de manipulação genética, a terapia antitumoral com bactérias está ganhando espaço. Esses microrganismos interagem de maneira muito íntima com seu nicho no organismo do hospedeiro e estão sintonizadas com o processo evolutivo no sentido

de sintetizar moléculas de interesse. A combinação desses recursos com propriedades únicas de sistemas biológicos mais complexos, como quimiotaxia e capacidade de secretar moléculas, permite que sistemas bacterianos projetados superem as modalidades convencionais de diagnóstico e terapêutica. (RIGLAR; SILVER, 2018). Ainda, as evidências demonstram que elementos presentes nas bactérias, por exemplo as exotoxinas, promovem efeitos antitumorais ao ativar indiretamente a resposta imune e diretamente agir nas células tumorais (ZHAO et al., 2005).

Bactérias apresentam inúmeras propriedades que podem estar associadas a terapia anticâncer, o que lhes conferem inúmeras aplicações (Figura 14). Os caracteres antitumorais diretos e mediados pela resposta imune derivam da interação biológica entre a bactéria e o tumor e seu microambiente. Propriedades bacterianas importantes como locomoção, quimiotaxia para a região do tumor, invasividade, citotoxicidade potencial e presença de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), alteram com a cepa e podem ser usadas para ativar o sistema imunológico. Ademais, foram identificados genes específicos que estão presentes na colonização preferencial do tumor após inoculação com bactérias sistêmicas (SILVA-VALENZUELA et al., 2016).

**Figura 14** – Características inerentes das bactérias para tratamento antitumoral

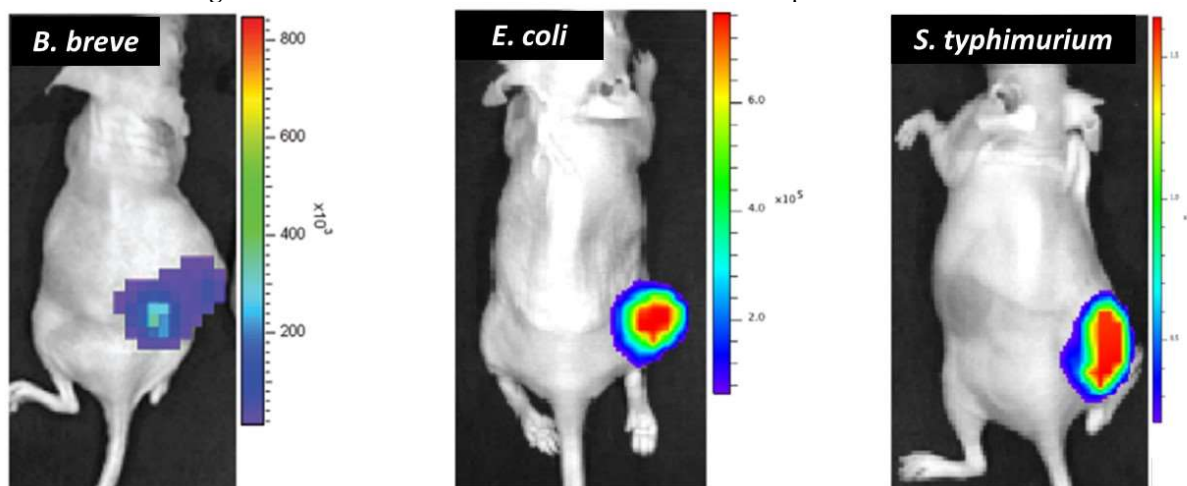


(A) Distintas propriedades das bactérias para novas terapias do câncer. (B) Aplicações bacterianas na terapia. Fonte: Adaptado de (TORRES et al., 2018).



Atualmente há diversas cepas de diferentes espécies como variantes de *Salmonella*, *Clostridium*, *Listeria*, *Bifidobacterium*, *Shigella*, *Lactococcus*, *Vibrio* e *Escherichia* que foram testados para tratar células tumorais em modelo *in vivo* (FELGNER et al., 2017; FORBES, 2010; KRAMER et al., 2018; PAWELWK; LOW; BERMUDES, 2003) que visam colonizar especificamente tumores. Com o auxílio de sequenciamento do genoma e ferramentas da engenharia genética, as bactérias se tornaram alvo de pesquisas para síntese de vetores vivos para *delivery* de agente antitumorais de maneira específica. Os gêneros *Salmonella*, *Clostridium* e *Bifidobacterium* apresentaram replicação seletiva e preferencial em tumores sólidos, mesmo quando inoculados em regiões do corpo distantes do tumor, sendo utilizados no transporte e amplificação de genes codificantes para fármacos anticâncer, como enzimas conversoras de pró-fármacos, inibidores de angiogênese, citocinas e toxinas (CHOROBK; MARCINKIEWICZ, 2011; PAWELEK; LOW; BERMUDES, 2003). O trabalho de Cronin e colaboradores mostrou, por bioluminescência, a colonização de três gêneros de bactérias, *B. breve* (linhagem UCC2003), *E. coli* (linhagem MG1655) e *S. Typhimurium* (linhagem SL7207) em tumores sólidos em camundongos (CRONIN et al., 2012). Com o passar dos dias, o número de bactérias cresceu nos tumores (Figura 15).

Figura 15 - Crescimento bacteriano em tumores sólidos por bioluminescência



Após 11 dias de observação, a colonização bacteriana se deu, preferencialmente, nos tumores sólidos. Fonte: Adaptado de (CRONIN et al., 2012).

Essa abordagem é eficiente porque as bactérias preferem infectar células cancerígenas no tecido tumoral e a quimiotaxia é fundamental nesse processo. Isso ocorre porque o tumor apresenta microambiente com alta concentração de nutrientes e consegue driblar a depuração pelas células imunes do hospedeiro (LIANG et al., 2019; ZHENG; MIN, 2016). Os tumores sólidos podem ter células imunossupressoras que apresentam a habilidade de alterar e

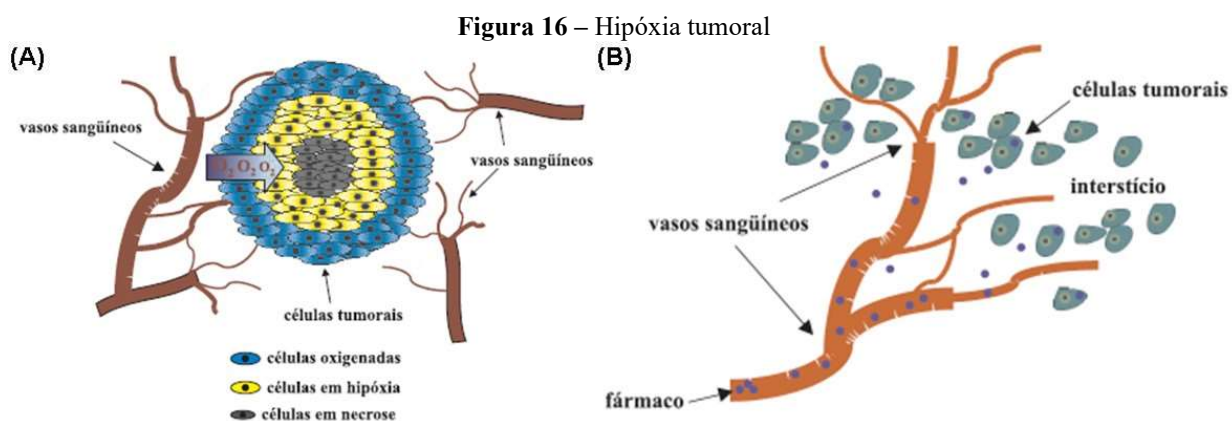
reprogramar o desempenho de células apresentadoras de antígenos e de macrófagos (KERKAR; RESTIFO, 2012). Outro acontecimento que favorece a colonização bacteriana nos tumores é o impedimento direto da resposta imune pela acumulação de proteínas que se ligam a proteínas receptoras imunossupressoras (THEURICH; SHIMABUKURO-, 2014).

A quimiotaxia é um mecanismo que acontece naturalmente nos organismos e é observada tanto em ensaios celulares quanto em animais e decorre em resultado da secreção de nutrientes pelos tumores sólidos (ZHENG; MIN, 2016). As bactérias têm a capacidade de detectar a formação do gradiente de ribose e galactose e de aspartato e serina, que são secretados por tumores. Então, a quimiotaxia é desencadeada pela estimulação dos receptores específicos dessas moléculas. Isto posto, quando inicia-se o processo para inativar o receptor de ribose/galactose se dá o acúmulo dos microrganismos em regiões tumorais em estado de quiescência (CHOROBK; MARCINKIEWICZ, 2011). A ativação após ligação do receptor de aspartato dá início a quimiotaxia da bactéria diretamente para o microambiente tumoral. Já o estímulo do receptor para serina a bactéria consegue penetrar o tecido e as células malignas e, por fim, ao ativar o receptor de gradiente de ribose/galactose faz o direcionamento da bactéria para as necróticas (LIANG et al., 2019).

Uma distinta característica presente nos tumores sólidos, quase universal no câncer (Figura 16), que favorece a colonização bacteriana é a hipóxia (< 1% de oxigênio), pois esses seres utilizam o oxigênio para identificar o tumor. Como este local apresenta crescimento celular veloz e angiogênese contínua, os vasos formados recentemente são prematuros nas extremidades de ligações e revestimento endotelial, o que gera uma corrente sanguínea mais lenta e pobre em nutrientes e oxigênio. A hipóxia gera resistência à quimioterapia e a radioterapia, pois o tratamento não alcança o tumor (ZHENG; MIN, 2016).

Os vasos presentes no tumor apresentam estrutura irregular e geralmente têm uma camada interna defeituosa que consiste em células endoteliais desordenadas, sobrepostas e/ou com ramificações. Como muitos agentes quimioterápicos macromoleculares, pensava-se que os microrganismos invadiam o tecido tumoral por essas lacunas presentes entre as células desordenadas. O escape bacteriano do sangue corrente para o tumor acontece de forma ativa ou passiva. Conforme os mecanismos ativos, as bactérias procuram aberturas nos sistemas de quimiotaxia e motilidade. Em um cenário passivo, bactérias podem penetrar no tumor através dessas brechas e depois se multiplicam. Evidências apontam que esses microrganismos conseguem induzir um robusto fluxo sanguíneo no microambiente do tumor, o que leva a síntese de proteínas vasolíticas, aumentando ainda mais a secreção de bactérias na massa

maligna. Ambos os mecanismos podem ocorrer simultaneamente e as bactérias se utilizam dos dois para atingir especificamente os tumores (LIANG et al., 2019). Essa desorganização de artérias e veias leva a restrição para o fornecimento dos fármacos antitumorais clássica e, como consequência, há formação de regiões sem oxigênio e com a presença de necrose (SILVA-VALENZUELA et al., 2016). Contudo, pesquisas comprovaram que bactérias anaeróbias e anaeróbias facultativas são encontradas nessas regiões (KASINSKAS; FORBES, 2007).



(A) Corte transversal esquemático de tumor sólido mostrando a como a concentração de oxigênio diminui em função do espaçamento entre os vasos. (B) Barreiras que o agente antineoplásico deve vencer para alcançar as células em hipóxia. Fonte: Adaptado de (OLIVEIRA; ALVES, 2002).

Por conseguinte, os anaeróbios facultativos com capacidade de locomoção, como *Salmonella Typhimurium*, entram nos tumores atacando as células cancerígenas adormecidas, que não são alcançáveis com a quimioterapia convencional, e superando as limitações da difusão passiva, podem evitar a resistência a drogas e substâncias nocivas (KASINSKAS; FORBES, 2006b, 2007).

As bactérias apresentam vantagens em relação as demais imunoterapias. A maioria desses organismos é autotrófica, ou seja, depende de fontes externas de substâncias essenciais como aminoácidos e bases nitrogenadas. Além disso, são seres capazes de se locomover, o que possibilita sua entrada em células malignas. Dentro destas, podem sintetizar agente terapêuticos, funcionando como biofábricas. Uma bactéria pode ser modificada para ser encaminhada ao tumor, gerando um sinal para ativar a resposta imune do paciente. Tais modificações devem ser adequadas, para maximizar e potencializar os efeitos da terapia e minimizar a toxicidade. Como resultado, os efeitos terapêuticos são concentrados no tumor, deixando o resto do corpo exposto a efeitos colaterais moderados. (CHOROBK; MARCINKIEWICZ, 2011).

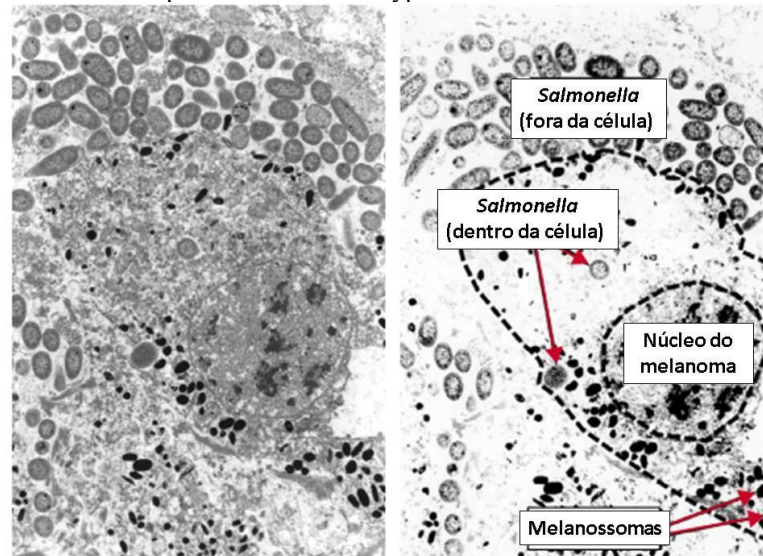
Especificamente no câncer de bexiga, o tratamento para os cânceres não invasivos varia com o estágio da doença. No período inicial da doença ocorre a ressecção transuretral com fulguração seguida por terapia intravesical em 24 horas e quimioterapia intravesical semanal. Em casos de recidiva é aplicado tratamento com o Bacilo de Calmette e Guérin (BCG), sendo mais eficaz do que a quimioterapia e aplicado também em estágios mais avançados (ONCOGUIA, 2015). Em tumores invasivos ocorre cistectomia parcial ou radical, dependendo do estágio da doença (ARAÚJO et al., 2014). No câncer invasivo e em estágios avançados, muitas vezes a retirada total do órgão não é suficiente devido à metástases (QIAO; LIU; FU, 2016). A quimioterapia não é suficiente pois a taxa mutacional da bactéria é elevada. O uso de BCG também apresenta problemas pois, por se tratar de uma bactéria, é rapidamente depurada pelo organismo e, principalmente apresenta alto potencial mutacional das bactérias que pode reverter o fenótipo expresso e comprometer o paciente (KRAMER et al., 2018) além de causar reações indesejáveis como febre, dor, calafrios, calafrios, fadiga, sensação de queimação na bexiga e necessidade de urinar com frequência (LAMM; MORALES, 2021).

## **1.6 *Salmonella***

*Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, popularmente conhecidas como salmonelas, e são microrganismos conhecidos por causarem doenças que afetam o sistema digestório, sendo um grande problema para a saúde pública mundial (LIST OF BACTERIAL NAMES WITH STADING IN NOMENCLATURE, 2000). São bactérias gram-negativas, do tipo bacilo, móveis com flagelos peritríquios, não esporuladas, não capsuladas, sendo que a maioria não fermenta a lactose (INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM, 2012). As salmonelas configuram um grupo muito heterogêneo, com três espécies: *Salmonella subterranea*, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. Esta última espécie atualmente possui 2.610 sorotipos, como a *Salmonella Typhimurium* (NCBI, 2020).

*Salmonella* é o gênero de bactérias mais utilizado atualmente para o tratamento de diversos cânceres. Ela se acumula seletiva e preferencialmente em tumores sólidos (Figura 17) devido ao metabolismo defeituoso, quimiotaxia, motilidade e imunossupressão local (PAWELEK; LOW; BERMUDEZ, 2003).

**Figura 17** – Microscopia eletrônica de *S. Typhimurium* em melanoma de camundongo



Fonte: Adaptado de (PAWELEK; LOW; BERMUDES, 2003).

Na literatura existem muitas linhagens com a habilidade de colonizar, de maneira seletiva, esses tumores sólidos (Figura 18), dado que a quantidade de bactérias no ambiente tumoral chega a exceder de 1.000 a 10.000 vezes o número de bactérias no fígado e no baço, órgãos que são naturalmente colonizados por *Salmonella* durante uma infecção sistêmica (CHOROBK; MARCINKIEWICZ, 2011).

**Figura 18** – Eficiência de diversas linhagens de *Salmonella* contra tumores sólidos no modelo animal

Salmonella strain	Tumor model	Therapeutic regimen	Outcome
<i>S. typhimurium</i> SL7207 with murine prostate stem cell antigen expressing plasmid <sup>4</sup>	s.c. TRAMPC1 murine prostate carcinoma cells in C57Bl/6 mice	oral gavage of bacteria in 2-week intervals followed by injection of tumor cells	over 50% of mice remained tumor-free
<i>S. typhimurium</i> YS1646 (VNP20009) with plasmid coding shRNA for STAT3 and <i>S. typhimurium</i> MVP728 with survivin expression plasmid <sup>5</sup>	s.c. B16F10 melanoma in C57Bl/6 mice	i.v. followed by oral gavage (4 days later)	decreased phospho-STAT3 levels in tumor F4/80+ macrophages, enhanced tumor-specific cytotoxicity, tumor growth inhibition
<i>S. typhimurium</i> SL3261 expressing tumor antigen TRP2 fused to heat shock protein 70 <sup>5</sup>	s.c. B16F10 melanoma in C57Bl/6 mice	3 bacterial oral gavages in 10-day intervals followed by B16F10 s.c. injection 7 days after last bacteria dose; therapeutic settings: B16F10 s.c. inoculation followed by 4 oral doses of bacteria in 5-day intervals	tumor rejection in 75% of mice in prophylactic settings; significant suppression of tumor growth after therapeutic administration
<i>S. typhimurium</i> A1-R <sup>7</sup>	XPA-1 human pancreatic cancer cells injected into the spleen of nude mice	3 intrasplenic bacteria injection at day 3, 10, and 17 after cancer cell injection	suppression of tumor growth in the spleen and liver metastases
<i>S. typhimurium</i> SL7207 carrying TRAIL and apoptin genes <sup>8</sup>	human gastric cancer cell line SGC-7901 injected s.c. in Balb/c nude mice	intratumoral injection 7 days after tumor implantation, repeated every 7 days	cancer cell apoptosis in tumor tissue and tumor regression
<i>S. typhimurium</i> VNP20009 expressing TRAIL <sup>9</sup>	attenuated mammary carcinoma cell line 4T1/red s.c. injected at mammary fat pad of Balb/c mice	i.v. injectat 21 days after tumor implantation	tumor growth retardation and improved survival death risk reduced up to 76%
<i>S. typhimurium</i> VNP20009 producing IL-18 <sup>10</sup>	s.c. CT26 colon carcinoma in Balb/c mice	i.v. injectat 14 days after tumor implantation	enhanced antitumor activity, tumor growth inhibition; leukocyte infiltration into tumor

Diversas linhagens de *Salmonella* foram desenvolvidas e apresentaram ótimos resultados no tratamento de diversos tipos de câncer e em diferentes modelo. Fonte:(CHOROBK; MARCINKIEWICZ, 2011)

Uma estratégia para direcionar *Salmonella* para regiões específicas tumorais é a modificação da capacidade bacteriana para reagir com nutrientes específicos (CHOROBİK; MARCINKIEWICZ, 2011). Células defeituosas, como as tumorais, são identificadas por células de defesa, porém muitas vezes não ocorre sinalização de que algo está errado suficiente e elas conseguem escapar. *Salmonella* consegue suprir o tumor via citotoxicidade direta combinada com resposta imune via inflamação aguda. No organismo, *Salmonella* secreta moléculas que estimulam a resposta imunológica. Com base nisso, um dos obstáculos centrais na terapia antitumoral é a síntese de moléculas supressoras secretadas por células mieloides e T do tumor. Então, a aplicação de microrganismos atenuados, como *Salmonella*, configura abordagem promissora capaz de modificar o caráter imunossupressor do microambiente tumoral para imunogênico (CHOROBİK; MARCINKIEWICZ, 2011; ZHAO et al., 2005).

Mais uma característica de *Salmonella* que contribui para a diminuição da massa maligna é habilidade inibitória da angiogênese destruindo os vasos, o que retarda o desenvolvimento tumoral. Um estudo demonstrou que *Salmonella* reduz a expressão do gene que codifica uma proteína angiogênica relacionada ao desenvolvimento de vasos endoteliais (VEGF), (LIANG et al., 2019).

Depois de entrar no corpo, *Salmonella* atua como um veículo que pode se replicar e sobreviver e fornecer agentes terapêuticos às células por meio de seu DNA codificado (cDNA). A proteína-alvo, incluindo o gene codificado, é então expressa por bactérias, produzindo um produto proteico ativo sem a necessidade de moléculas ou drogas prontas para uso. Então, preferencialmente quando a bactéria atinge o tumor, o material genético é amplificado e a proteína terapêutica é sintetizada e secretada. Existem várias abordagens que fornecem DNA que codifica antígenos associados a tumores ou cânceres específicos, RNAs reguladores, enzimas conversoras de pró-fármacos, fatores indutores de apoptose, moléculas antiangiogênicas e muito mais. (CHOROBİK; MARCINKIEWICZ, 2011; WANG; KAZMIERCZAK; EISENSTARK, 2016).

*Salmonella* Typhimurium caracteriza-se por células em forma de bacilos, diâmetro entre 0,7 a 1,5  $\mu\text{m}$  e comprimento de 2 a 5  $\mu\text{m}$ , gram-negativas, asporogênicas, anaeróbias facultativas, móveis por flagelos (DA SILVA, A. J., 2012). A linhagem Typhimurium causa inúmeras infecções que acometem pássaros e mamíferos, gerando intoxicação na espécie humana, devido ao consumo de determinados alimentos contaminados. Já o sorotipo Typhi é o causador da febre tifoide em humanos (MASTROENI et al., 2001).

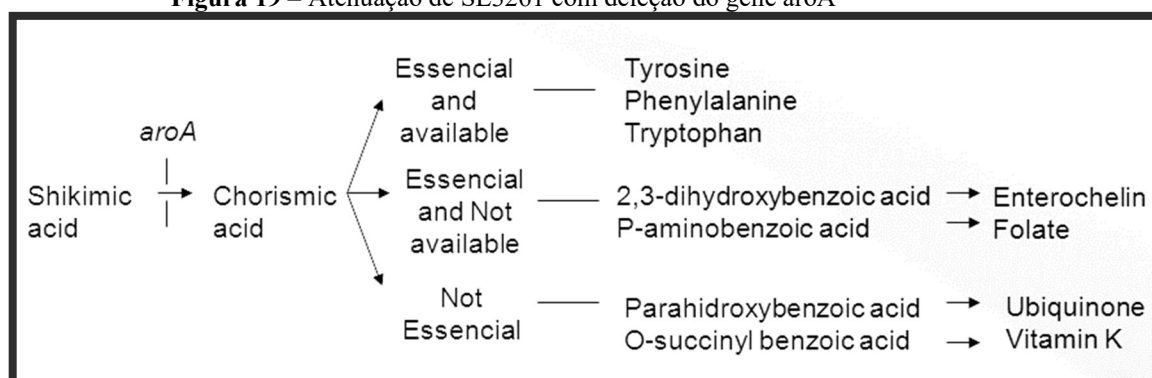
Esse gênero é utilizado como vetor e, para isso, diversas atenuações foram testadas, culminando em linhagens apropriadas, principalmente dos sorotipos Typhi e Typhimurium. Tais atenuações devem garantir que o microrganismo não seja capaz de se manter no paciente receptor e, principalmente, que o desenvolvimento do vetor não seja capaz em indivíduos imunocomprometidos. A atenuação excessiva é inadequada, pois prejudica a habilidade bacteriana de permanecer nos tecidos por um período suficiente e necessário para a síntese e secreção de moléculas antitumorais que são codificadas pelo plasmídeo. (MASTROENI et al., 2001).

Para garantir uma terapia eficiente, é necessário a construção de um vetor biológico que não traga riscos para os indivíduos. *S. Typhimurium* da linhagem SL3261 apresenta deleção do gene *aroA* (Figura 19), que leva ao bloqueio da via sintética de compostos aromáticos e, então, inibe sua reprodução. Esses organismos dependem do ácido p-aminobenzóico (pABa) para sintetizar, por exemplo, 2,3-dihidroxibenzóico (DHB) e ácido fólico, que são precursores de compostos para aquisição de ferro da bactéria. *Salmonella* também sintetiza pABa e DHB de corismato, produto final da via de biossíntese de aromáticos. O impedimento de qualquer passo desta via faz o microrganismo se tornar auxotrófica para dois componentes, os quais não são presentes nos tecidos de vertebrados e, portanto, atenua a virulência (FELGNER et al., 2016).

A síntese de aminoácidos aromáticos e a glicólise estão ligadas pela direta ação do gene *aroA* que pertence a via do chiquimato (BENTLEY, 1990). Quando o gene *aroA* é deletado, o gênero *Salmonella* depende de modo auxotrófico de aminoácidos aromáticos ausentes nos mamíferos, tornando essa atenuação segura e gera ótimos vetores vivos apropriados já que sua reprodução está extinta (HOISETH; STOCKER, 1981). A principal consequência disso é que esses seres não consegue se reproduzir e crescer no organismo e pode ser verificado em testes *in vivo* (MASTROENI et al., 2001). Os compostos aromáticos deletado são o ácido 2,3-diidroxibenzóico, composto sólido incolor que ocorre naturalmente, sendo formado pela via do chiquimato. É incorporado em vários sideróforos, que são moléculas que fortemente complexam íons de ferro para absorção em bactérias (O'BRIEN; COX; GIBSON, 1970). O ácido 4-aminobenzóico é caracterizado por tratar-se de um pó cristalino de cor branca ou branco-amarelado, inodoro, de sabor amargo e ligeiramente solúvel em água, porém altamente solúvel em álcool absoluto. A sua molécula consiste de um anel de benzeno ligado a um grupo amina e a um grupo carboxila. É essencial para algumas bactérias e às vezes designado vitamina B10, no entanto como não é essencial para os seres humanos não é considerado uma vitamina (VAN DE GRAAF, B., HOEFNAGEL, A. J., & WEPSTER, 1981).



**Figura 19** – Atenuação de SL3261 com deleção do gene *aroA*



Após a deleção do gene pertencente a via do chiquinato *Salmonella* torna-se auxotófica para compostos aromáticos não disponíveis no tecido de seu hospedeiro. Fonte: (AKAJIMA, 2010).

A linhagem SL3261 já foi usada para imunoterapia e tratamento de diversas neoplasias como o câncer colorretal, o melanoma, de pâncreas e de pulmão (ARGORIO et al., 2007; JIANXIN et al., 2013; LIN et al., 2012; SALTZMAN et al., 2018; ZHU et al., 2010). Um estudo demonstrou que a terapia com a *S. Typhimurium* atenuada no câncer de bexiga foi capaz de estimular células TCD8+, o que é essencial na terapia antitumoral (DOMINGOS-PEREIRA et al., 2015). Demais estudos utilizando o gênero *Salmonella* atenuado foram feitos e mostraram que o desenvolvimento do tumor sofreu inibição por um intervalo de tempo longo, inclusive mesmo depois de algumas semanas em que os camundongos não receberam nenhum tratamento morrerem pela doença (AKAJIMA, 2010). Então, este gênero, que também é de fácil manipulação genética, é candidato potencial para terapias que controlem e inibem a progressão tumoral.

Extremamente amplo é o potencial que microrganismos procariontes apresentam como sistemas de expressões proteicas. Através da produção de moléculas alvo diretamente no tumor, bactérias vivas que atuam como vetores podem proporcionar uma potente alternativa para tratamento adjuvante em muitos tipos de câncer. A codificação de genes que são expressos via aparelhos de transcrição bacteriana, para obter como produto uma proteína ativa não apresentam carência da presença prévia de qualquer droga pré-formada. Em contra partida, o gene que o plasmídeo contém é amplificado e liberam os agentes terapêuticos diretamente no microambiente tumoral (AKAJIMA, 2010).

### 1.7 Interleucina - 2 (IL-2)

As interleucinas são moléculas sintetizadas por leucócitos, principalmente linfócitos T, macrófagos e eosinófilos com função de ativação ou inativação do sistema imunológico e divisão celular (BEN MENACHEM-ZIDON et al., 2011). É sabido que algumas citocinas e



proteínas auxiliam no tratamento contra o câncer. As mais estudadas são a IL-2, IL-12, IL-10 e TRAIL (FARKONA; DIAMANDIS; BLASUTIG, 2016).

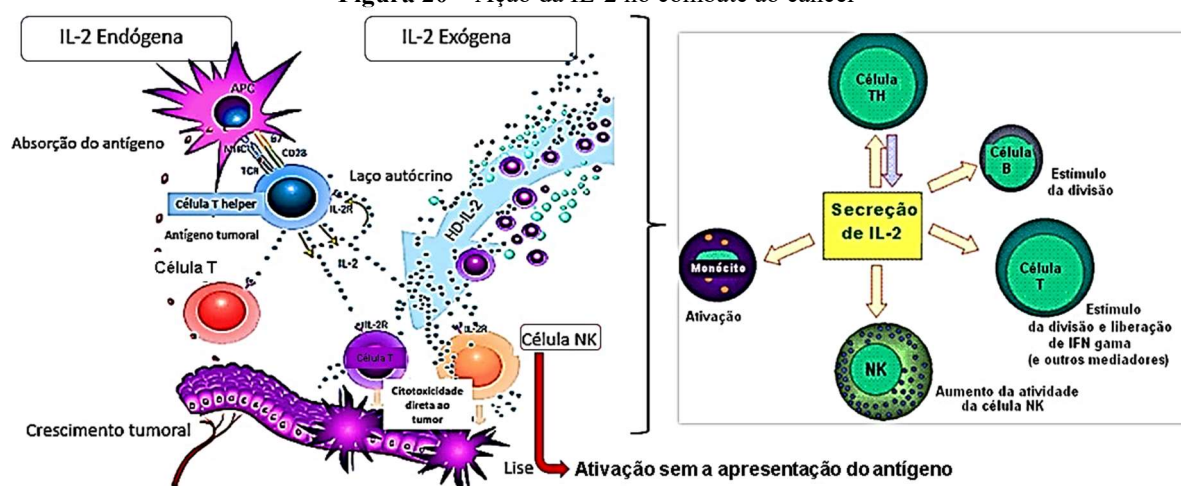
IL-2 está envolvida na maturação de linfócitos B e T (LIAO; LIN; LEONARD, 2011). É uma proteína de 15 kDa secretadas pelas células dendríticas ativadas, linfócitos T CD4+ ativados, células T CD8+ e células NK. São responsáveis pela estimulação dos tipos celulares com expressão de dois tipos de receptores: o trimérico para IL-2 com afinidade alta formado por cadeias  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -; e o receptor dimérico com afinidade reduzida, formado apenas pelas cadeias  $\beta$ - e  $\gamma$ - (MOSMANN et al., 1987).

Trabalhos demonstraram que a *S. Typhimurium* recombinante que expressa e secreta IL-2 potencializou a resposta imunológica e acentuou o efeito anticâncer em melanoma altamente tumorigênico, quando comparado a terapia com a linhagem com bactéria que não expressa a citocina (AL-RAMADI et al., 2008). Essa ação anticâncer está correlacionada a uma resposta intratumoral robusta que combate a angiogênese e a apoptose. Quando a IL-2 é secretada no tumor, gera-se um combate imunológico do hospedeiro, elevando populações de células NK, para promover a destruição de células tumorais, o que pode levar à regressão tumoral, à prevenção de metástases e otimização da taxa de sobrevivência (YUHUA et al., 2001).

A IL-2 sintetizada por *Salmonella* foi capaz de reduzir o crescimento tumoral e otimizar a sobrevivência dos camundongos com melanoma quando comparado a cepa que não sintetizava a interleucina, pois a IL-2 gerou resposta intratumoral antiangiogênica e pró-apoptótica que foi preferencialmente induzida pela cepa bacteriana que expressa IL-2 (AL-RAMADI et al., 2009).

Tanto a IL-2 murina quanto a humana tem a habilidade de induzir a proliferação de células de espécies homólogas de maneira extremamente eficiente. Isso significa que camundongos e humanos apresentam reatividade cruzada (MOSMANN et al., 1987). Nos linfócitos CD8, a IL-2 ativa a proliferação de células e a formação de linfócitos de memória e diferenciados. Então, IL-2 tem como função a proliferação de linfócitos e aumentar a ação dos mesmos e das células NK, que são responsáveis pela eliminação de células tumorais (GUPTA; AGARWAL, 2016). Com base em todo esse conhecimento, a IL-2 tem sido investigada há décadas como um potencial agente imunoterapêutico no tratamento do câncer em modelos de tumor humano e de camundongo (Figura 20). (ROSENBERG, 2014).

**Figura 20 – Ação da IL-2 no combate ao câncer**



Os efeitos de IL-2 tanto endógenas quanto exógenas são: estimulação da proliferação e função das células T; aumento da proliferação de células Natural killer e atividade citotóxica; e desencadear a liberação de citocinas por linfócitos ativados, como interferon gama e fator de necrose tumoral. Fonte: Adaptado de (GUPTA; AGARWAL, 2016).

As células NK estimuladas por IL-2 suprimem a carcinogênese na resposta imune inata, via secreção de perforinas e granzimas e IFN- $\gamma$ . NK entra e atinge as células malignas cuja moléculas MHC classe I foram perdidas, portanto, podem sofrer lise, processo que ocorre sem a presença de apresentação de antígeno (MARTINOVIĆ et al., 2016), fazendo com que o processo de ativação de células NK pela IL-2 configure uma potencial terapia anticâncer (SEKI et al., 2011).

Diversos estudos mostraram efeito da IL-2 *in vitro* explicado pelo fato de que a IL-2 é indutora da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) que produz óxido nítrico (NO) que tem efeito antitumoral (SAKKOULA; PIPILI-SYNETOS; MARAGOUDAKIS, 1997). Para verificar os efeitos da IL-2, o gene que codifica a IL-2 foi clonado em 1983, e sua produção e caracterização em *E. coli* foi realizada em 1984, estabelecendo um método de administração de IL-2. Observou-se que a terapia com IL-2 induz regressão tumoral terapêutica de longa duração em melanoma metastático e câncer renal.(ROSENBERG, 2014). Contudo, também notou-se altas doses de IL-2 gerou alta toxicidade em um número elevado de pacientes (SALTZMAN, 2005). Para tentar reverter esse impasse, foi desenvolvida uma linhagem de *S. Typhimurium* capaz de sintetizar IL-2. O estudo mostrou redução significativa de metástase hepáticas oriundas de adenocarcinoma de cólon em camundongos (SALTZMAN et al., 1997).

### 1.8 TRAIL - Ligante Indutor de Apoptose Relacionado ao TNF

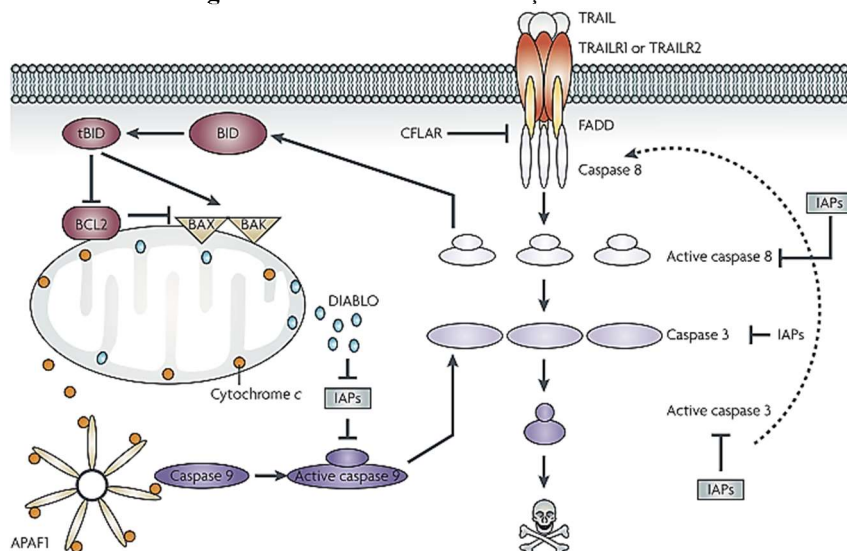
O TRAIL (*Tumor-Necrosis-Factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) ou Apo2 é um receptor para o TNF relacionado ao processo de apoptose e foi descrito em 1995 (WILEY et

al., 1995). É uma proteína receptora transmembranar tipo II. Foi originalmente identificado e clonado com base em seu domínio extracelular e homologia de sequência com CD95L e TNF. Forma homotrímeros que se ligam a moléculas receptoras, permitindo ampla expressão de seu mRNA em diversos tecidos. É promissor para a terapia do câncer porque induz seletivamente a apoptose nas células tumorais em comparação com o tecido normal. (MONGKOLSAPAYA et al., 1999; WILEY et al., 1995).

TRAIL é eficaz contra diversos tipos de câncer como do cólon, da mama, do pulmão, da próstata, renal, do ovário, da bexiga, gliomas, e tumores pancreáticos (GANAI et al., 2009). O TRAIL desempenha ação pelo receptor de morte por apoptose, ativando a caspase-8 e conduz à ativação de caspase-3, mediador central da apoptose (LEBLANC; ASHKENAZI, 2003). Como consegue controlar a entrega espacial e temporal de maneira seletiva, vincular o TRAIL com a linhagem de *Salmonella* SL3261 apresenta potencial para ser uma terapia alternativa adjuvante para o tratamento antitumoral.

A ação de TRAIL é primeiro ativada pela ligação de TRAIL aos receptores TRAILR1 ou TRAILR2 (Fig. 21), levando à oligomerização e recrutamento do domínio de morte FAS (FADD) e caspase-8, iniciando assim a morte funcional e formam um complexo de - Sinalização Induzível (DISC). No DISC, a caspase-8 é clivada e ativada, e a caspase-3 e a proteína BID (BH3-interacting domain death agonist) são clivadas e ativadas. Como resultado da ativação de BID, tBID se liga a BAX e BAK pró-apoptóticas, levando à permeabilização da membrana mitocondrial e liberação de proteínas mitocondriais, como DIABLO e citocromo c. O primeiro pode suprimir os inibidores de caspases. O citocromo c e a caspase-9 se combinam para formar apoptose funcional, levando à clivagem e ativação da caspase-9, que pode clivar a caspase-3. O DIABLO inibe a atividade inibitória da caspase de IAP. A clivagem na caspase-3 ocorre para ativar a caspase-8 e amplificar o sinal apoptótico. (JOHNSTONE; FREW; SMYTH, 2008).

**Figura 21**– Mecanismo de ativação de TRAIL



Ao se ligar aos seus receptores na célula TRAIL inicia processos de sinalização celular que resultam em ativação de apoptose. Fonte: (JOHNSTONE; FREW; SMYTH, 2008).

*S. Typhimurium* tem a capacidade de expressar e secretar proteínas TRAIL funcionais. Quando o TRAIL é secretado, a via do receptor de morte induz a apoptose nas células do câncer de mama, reduzindo consideravelmente o crescimento do tumor e aumentando a sobrevivência do hospedeiro. (GANAI; ARENAS; FORBES, 2009). O TRAIL sintetizado e secretado por *S. Typhimurium* atenuada inibiu de maneira significativa o crescimento de células tumorais de estômago (CAO et al., 2010). Contudo, TRAIL solúvel não demonstrou eficiência nos testes clínicos, devido a sua curta meia vida e foi depurado pelos rins muito rapidamente (KELLEY et al., 2001). Administrar TRAIL junto com fármacos quimioterápicos se mostrou mais promissora. Porém, os quimioterápicos clássicos não apresentam seletividade e geram efeitos colaterais graves, pois atacam células saudáveis. Com o *delivery* direcionado e específico do TRAIL no microambiente tumoral, ocorre aumento da concentração localmente e diminuição da diluição do TRAIL circulante. Atualmente há dois protocolos para *delivery* direcional de substâncias e moléculas sendo investigadas. O primeiro consiste no direcionamento passivo com base na permeabilidade e retenção aprimoradas, como a aplicação de nanopartículas. O segundo ocorre de forma ativa com peptídeos ou anticorpos que induzem TRAIL a atingir o tumor via antígenos específicos. Bactérias atenuadas que direcionam a síntese e secreção de TRAIL diretamente no tumor tem como objetivo reduzir danos colaterais tóxicos nos tecidos saudáveis ao mesmo tempo que consegue manter concentrações intratumorais de TRAIL altas (DE MIGUEL et al., 2016). A junção do tratamento com IL-2 e TRAIL fusionadas com proteínas fluorescentes sendo sintetizadas e entregues por SL3261 com promotor para anaerobiose proposta nesse estudo é nova e promissora.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Verificar o efeito antitumoral das proteínas IL-2, TRAIL e o MIX das duas proteínas expressas por *Salmonella* Typhimurium atenuada, linhagem SL3261, contra câncer de bexiga *in vitro* em linhagens celulares de câncer de bexiga MB49 e RT4 e *in vivo* em camundongos fêmea C58BL/6.

### 2.2 Objetivos específicos

Mais especificamente pretende-se:

*In vitro:*

- Avaliar a viabilidade celular através de alterações na integridade da membrana lisossomal, das enzimas mitocondriais e capacidade de recuperação celular;
- Observar as alterações na morfologia celular;
- Dosar a produção de óxido nítrico (NO);
- Dosar a secreção de citocinas inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF;
- Verificar a ativação do processo de autofagia e apoptose;

*In vivo:*

- Analisar a taxa de sobrevivência dos animais;
- Avaliar a progressão tumoral nos animais através do peso das bexigas;
- Determinar a resposta leucocitária e a dosagem dos níveis de citocinas (TNF, IL-12 e IFN- $\gamma$ ) no sangue e no lavado da cavidade peritoneal (LCP) dos animais;
- Verificar a biodistribuição das três linhagens de SL3261 clonadas com as proteínas no fígado, baço e tumor dos animais.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Cultivo e manutenção de linhagens recombinantes de SL3261, SL3261\_IL-2 e SL3261\_TRAIL**

##### **3.1.1 Linhagens recombinantes de *S. Typhimurium***

As linhagens utilizadas SL3261, SL23162\_IL-2 e SL3261\_TRAIL foram cedidas pela Dra. Luciana Camillo e em parceria com o Prof. Dr. Adilson José da Silva do Laboratório de Fábrica Celular (LAFAC), do Departamento de Engenharia Química (DEQ), da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) cujo laboratório apresenta nível de biossegurança 2 (NB2).

A construção das linhagens propostas nesse estudo foi realizada pela Dra. Luciana Camillo e se deu utilizando as sequências gênicas murinas de TRAIL e IL-2 que foram obtidas a partir da biblioteca do GenBank (códigos de acesso: AF470537.1 e AY147902.1, respectivamente). sintetizadas pela empresa Biomatik, das proteínas IL-2 e TRAIL murinas clonadas primeiro em *E. coli* DH5 $\alpha$  e posteriormente em SL3261. A TRAIL foi produzida fusionada com a proteína fluorescente EmGFP (*Emerald Green Fluorescent Protein*) e a IL-2 foi fusionada com a proteína fluorescente YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) (CAMILLO, 2019) para observação em microscopia.

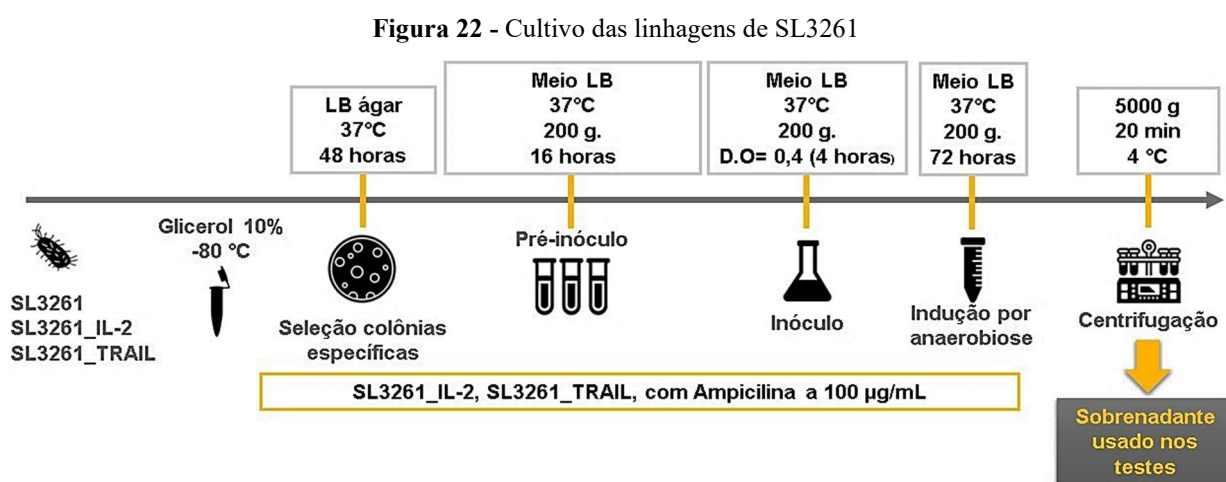
O plasmídeo escolhido para a fusão desses genes foi o pAE contendo o promotor nirB, que é induzido em anaerobiose e já é utilizado para esse tipo de abordagem (OXER et al., 1991; RAMOS et al., 2004) e foi gentilmente cedido pela pesquisadora Dra. Elizabeth A. L. Martins, do Instituto Butantan de São Paulo, SP. Os plasmídeos foram extraídos com o uso de kits comerciais de extração plasmidial Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep da Cellco Biotec e as transformações feitas por choque térmico. A confirmação dos clones foi feita por digestão com enzimas de restrição específicas e análise de gel de agarose e *western blot*, comparando com o marcador molecular (CAMILLO, 2019).

##### **3.1.2 Cultivo, manutenção das linhagens de SL3261 e expressão de IL-2 e TRAIL**

Cada cepa bacteriana foi armazenada em glicerol a 10% e mantida a -80 °C. O meio utilizado é o LB (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura e 5 g de NaCl para 1 L de água destilada) contendo 100  $\mu$ g/mL de antibiótico ampicilina para as linhagens SL3261\_IL-2 e SL3261\_TRAIL. Para as placas contendo meio LB ágar, uma alça de transferência foi removida da suspensão bacteriana e a placa foi estriada. O cultivo foi mantido a 37 °C por 48 horas. Para o pré-inóculo, uma colônia isolada foi inoculada em 20 mL de meio LB líquido. A cultura foi mantida por 16 horas a 37 °C e a 200 g em frasco de rosca. Em seguida, a densidade óptica

(D.O.) foi lida a 600 nm e uma alíquota corrigida para D.O.= 0,1 e foi adicionada em 50 mL de meio LB para o cultivo do inóculo em Erlenmeyer. O cultivo foi mantido a 37 °C e a 200 g até atingir D.O.= 0,4. A partir daí, a expressão das proteínas IL-2 e TRAIL foi induzida por anaerobiose por 72 horas a 37 °C e em 200 g. Para a condição anaeróbia, utilizada nos ensaios *in vitro*, foram utilizados frascos de rosca com meio de cultura até a boca e selados com Parafilm M®. A cultura foi então centrifugada a 10.000 g, por 20 min e a 4 °C. O pellet foi descartado, uma vez que as proteínas são secretadas no meio de cultivo e o sobrenadante a ser utilizado nos experimentos *in vitro* foi esterilizado em filtro de seringa com poro de 0,22 µm. Para cada teste *in vitro*, foram realizadas culturas bacterianas frescas.

Para os ensaios *in vivo* foi retirado 1 mL de cada Erlenmeyer, seguido de centrifugação por 20 minutos, a 20 °C e 4000 g. Então, o sobrenadante foi descartado e o pellet contendo as células vivas ressuspendido em 1 mL de salina estéril (NaCl 0,9 %) com dose de  $5 \times 10^7$  UFC/mL para inoculação intravesical nos camundongos. Um esquema resumido de todo esse processo é mostrado na figura 22.



As linhagens celulares foram armazenadas em glicerol a -80°C. Para cultivo foram realizados pré-inóculo e inóculo em meio LB líquido. Para testes *in vitro* a condição de anaerobiose foi realizada com adição de meio LB até a boca e selados, tendo o sobrenadante deste cultivo utilizado. Para os teste *in vivo* foram utilizados o pellet do cultivo celular contendo as células vivas em que a anaerobiose foi induzida no organismo do animal na região necrótica do tumor sólido. Fonte: autora.

### 3.1.3. Curva de crescimento das linhagens SL3261, SL3261\_IL-2 e SL3261\_TRAIL

A curva de crescimento foi realizada a partir de inóculos das 3 linhagens recombinantes em duplicata. A leitura da D.O. foi feita nos seguintes horários: 0h, 1h00, 2h00, 3h00, 3h30, 4h00, 4h30 e 5h de cultivo. A cada intervalo de tempo também foram feitos o plaqueamento dos cultivos em diluição de  $10^4$  e  $10^5$  em solução salina estéril (NaCl 0,9 %).

### 3.1.4 Leitura de fluorescência das cepas bacterianas

Para confirmar a produção e liberação das proteínas IL-2 e TRAIL pelas linhagens bacterianas SL3261\_IL-2 e SL3261\_TRAIL descritas acima, foi feita a leitura de fluorescência em que 100 µL do sobrenadante dos cultivos bacterianos foram adicionados em uma microplaca preta de fundo chato transparente de 96 poços. Para o controle foi adicionado sobrenadante da linhagem SL3261. A emissão de fluorescência foi lida a 527 nm para IL-2 e 509 nm para TRAIL no equipamento Spectra MAX i3™ (Molecular Devices).

### 3.1.5 Dosagem dos níveis de IL-2 e TRAIL por ELISA

A partir do sobrenadante do cultivo bacteriano descrito anteriormente foi realizada a identificação da presença de proteínas por ELISA Indireto (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – Ensaio Imunoenzimático) (Thermo Fisher Scientific ®), em que as proteínas presentes no cultivo bacteriano foram fixadas na placa, que posteriormente foram detectados por conjugados específicos contra as possíveis proteínas presentes neste sobrenadante, sendo feita a detecção de IL-2 e TRAIL seguindo o protocolo abaixo descrito.

Foram utilizadas placas de microtitulação de alta afinidade com 96 poços sendo aplicados 100 µL/poço das proteínas analisadas (IL-2 e TRAIL) e SL3261 para comparação como controle negativo para sensibilização das placas e incubação por 16 horas a 4 °C. A cada etapa as placas eram lavadas com 300 µL/poço com solução de lavagem (PBS 1X [Tampão fosfato salino: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,15 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1 L de água destilada] + Tween 20 a 0,05%, pH 7,4). Após a sensibilização foram acrescentados 200 µL/poço de solução bloqueio com leite 10% (0% de gordura) e as placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Então foi realizada a aplicação do anticorpo de captura anti-IL-2 e anti-TRAIL, sendo aplicados 100 µL/poço, sendo que o mesmo foi diluído em tampão carbonato (7,13 g de NaHCO<sub>3</sub> e 1,59 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para 1 L de água mili-q), na proporção 1:10000 e a placa foi incubada por 2 horas a 37 °C. Foi então preparado, ao abrigo de luz, o anticorpo secundário conjugado com enzima peroxidase diluindo-o em PBS 1X, na proporção 1:10000, recomendada pelo respectivo fabricante, e posteriormente foi aplicado 100 µL/poço. As placas foram então incubadas por 1 hora e 30 minutos a 37 °C ao abrigo de luz. Então foi aplicado, ao abrigo de luz, 100 µL/poço do substrato TMB (3,3',5,5' - Tetrametilbenzidina) e as placas foram incubadas em temperatura ambiente, ainda ao abrigo de luz, por 15 minutos aproximadamente, quando a solução passou a apresentar uma coloração azul mais forte. Em seguida, a reação foi bloqueada com a aplicação de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2M.



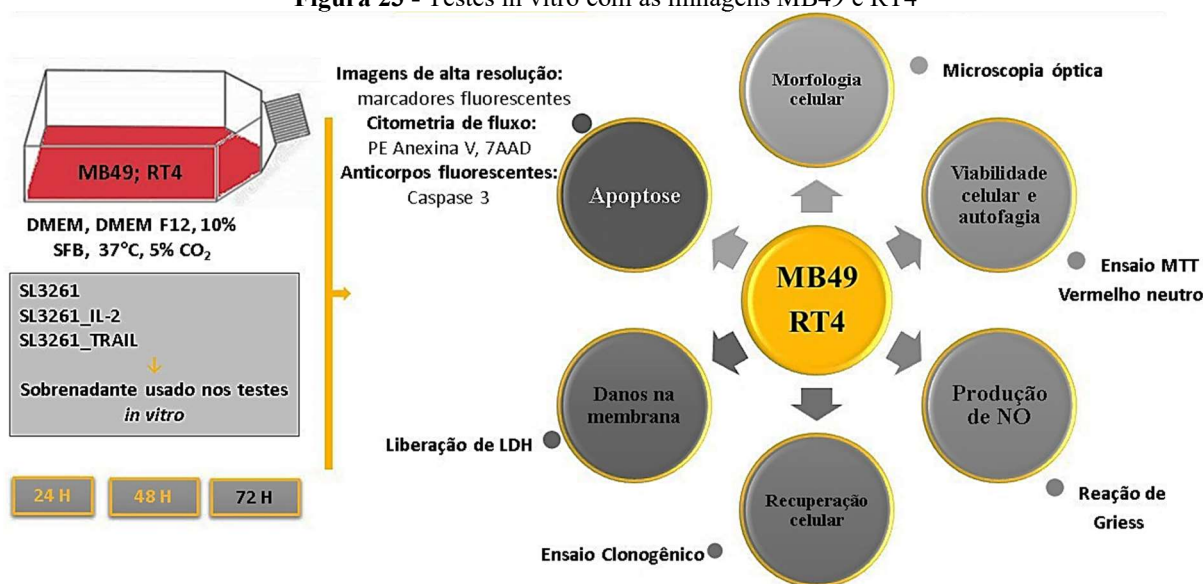
Finalmente, a leitura das placas foi feita no comprimento de onda de 450 nm, pelo espectrofotômetro de placas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer). Foram feitos controles brancos contendo somente os anticorpos de captura e secundário diluídos em PBS.

### 3.2 Cultivo de células tumorais e ensaios *in vitro*

#### 3.2.1 Cultivo de célula tumoral de bexiga murina (MB49) e humana (RT4)

Foi utilizada a linhagem MB49 de tumor de bexiga de camundongo C57BL/6 cedidas pelo Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra do Laboratório de Imunologia Aplicada, do Departamento de Genética e Evolução (DGe), da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). A linhagem celular de câncer de bexiga humano, RT4, foi cedida pela Profa. Dra. Fernanda Perpétua Casciadori do Departamento de Engenharia Química (DEQ), da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Um resumo dos testes *n virto* é mostrado na Figura 23.

Figura 23 - Testes *in vitro* com as linhagens MB49 e RT4



As linhagens celular MB49 e RT4 foram cultivadas em meio DMEM e DMEM F12, respectivamente. O tempo de tratamento foi de 24 e 48 horas. Os parâmetros analisados foram: morfologia celular, viabilidade celular, autofagia, produção de NO, recuperação celular, danos na membrana plasmática e apoptose. Fonte: autora.

As células foram cultivadas em garrafas médias de cultura em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma-ALDRICH, USA) para MB49 e meio DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12, Sigma-ALDRICH, USA) para RT4 na presença de antibióticos penicilina/streptomicina a 100 µL/mL (LGC Biotechnology) com adição de 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor (LGC Biotechnology). As

garrafas foram mantidas incubadas em ambiente úmido a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> até atingirem 80% de confluência, sob repicagens.

### 3.2.2 Ensaios *in vitro*

Os 6 grupos propostos e o tratamento estabelecido são apresentados na tabela 1. O grupo C- tem células tumorais e meio DMEM/DMEM F12 com volume final de 200 µL/poço. O grupo LB tem células tumorais e 100 µL de DMEM/DMEM F12 e 100 µL de meio LB com volume final de 200 µL/poço. O grupo SL3261 tem células tumorais e 100 µL de DMEM/DMEM F12 e 100 µL do sobrenadante do cultivo da linhagem SL3261 com volume final de 200 µL/poço. O grupo IL-2 tem células tumorais e 100 µL de DMEM/DMEM F12 e 100 µL do sobrenadante do cultivo da linhagem SL3261\_IL-2 com volume final de 200 µL/poço. O grupo TRAIL tem células tumorais e 100 µL de DMEM/DMEM F12 e 100 µL do sobrenadante do cultivo da linhagem SL3261\_TRAIL com volume final de 200 µL/poço. O grupo MIX tem células tumorais e 100 µL de DMEM/DMEM F12 e 50 µL do sobrenadante do cultivo da linhagem SL3261\_IL-2 e 50 µL do sobrenadante do cultivo da linhagem SL3261\_TRAIL com volume final de 200 µL/poço.

**Tabela 1** - Grupos e tratamentos

	DMEM	LB	SL3261*	IL-2*	TRAIL*
C-	<b>200 µL</b>	-	-	-	-
LB	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>	-	-	-
SL3261	<b>100 µL</b>	-	<b>100 µL</b>	-	-
IL-2	<b>100 µL</b>	-	-	<b>100 µL</b>	-
TRAIL	<b>100 µL</b>	-	-	-	<b>100 µL</b>
MIX (50% de cada proteína)	<b>100 µL</b>	-	-	<b>50 µL</b>	<b>50 µL</b>

\*Sobrenadante do cultivo bacteriano

Os 6 grupos estabelecidos e o tratamento utilizado. DMEM: meio de cultivo. Meio LB. O grupo C- não recebeu tratamento. O grupo LB não recebeu nenhum tratamento, mas teve meio LB adicionado. Os grupos SL3261, IL-2, TRAIL e MIX receberam tratamento com o sobrenadante da cultura bacteriana. Fonte: autora.

Os testes foram realizados pelo menos em triplicata, em três experimentos independentes e nos tempos de exposição de 24, 48 e 72 horas seguido pelos ensaios descritos abaixo

### 3.2.3 Viabilidade celular pelo método MTT

O método colorimétrico de Tetrazolium 3 - (4,5 - dimetiliazol - 2 - il) 2,5 - difenilbromida (MTT) (SIGMA-ALDRICH, EUA) (MOSMANN, 1983) foi realizado para avaliar a integridade da função mitocondrial, através da mensuração da formação de cristais de formazan por enzimas mitocondriais. Quanto maior a produção desses cristais, maior a viabilidade celular. Em microplaca de 96 poços de fundo chato, com tratamento para cultivo e com tampa, foram inoculadas  $1 \times 10^4$  células por poço. Posteriormente a 24 horas de adesão os tratamentos mostrados na Tabela 1 foram adicionados. Após os tempos de exposição de 24, 48 e 72 horas, os poços foram lavados 2 vezes com PBS 1X e 200  $\mu$ L da solução de MTT a 0,5 mg/mL em PBS 1X mais meio incompleto e sem fenol (1:5) foram adicionados. A reação ocorreu por 3 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. foram feitos controles brancos contendo somente solução de MTT. Em seguida, a solução reagente foi removida e 100  $\mu$ L do diluente DMSO foram adicionados por poço, seguido pela leitura da absorbância a 570 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer). Foi feito o controle de morte celular (C+) com detergente enzimático extran 5%. O percentual de viabilidade foi calculado pela comparação dos dados obtidos com o grupo C- de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ Viabilidade celular} = \frac{\text{Grupo experimental}}{\text{Média do grupo C-}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

### 3.2.4 Viabilidade celular pelo método com vermelho neutro

O ensaio com vermelho neutro se baseia no acúmulo do corante nas membranas dos lipossomos. Quanto mais células viáveis, maior a difusão do corante pela membrana (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008). Em uma microplaca de 96 poços de fundo chato, com tratamento para cultivo e com tampa, foram inoculadas  $1 \times 10^4$  células por poço. Posteriormente a 24 horas de adesão os tratamentos mostrados na Tabela 1 foram adicionados. Após os tempos de exposição de 24 e 48 horas, os poços foram lavados 2 vezes com PBS 1X e 100  $\mu$ L do corante a 30  $\mu$ g/mL em meio suplementado com 1% de SFB e sem fenol foram adicionados. A reação ocorreu por 2 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, a solução reagente foi removida e 200  $\mu$ L do diluente ácido acético 1% e etanol 50% (1:1) foram adicionados por poço, seguido pela leitura da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer). O percentual de citotoxicidade foi calculado pela comparação dos dados obtidos com o grupo C- de acordo com a equação 1.

### 3.2.5 Morte celular por autofagia

O índice de unidades de autofagia arbitrárias (UAA), mensura indiretamente a morte celular autofágica pelo cálculo que correlaciona a proporção de vacúolos autofágicos corados no ensaio de VN, pela taxa de sobrevivência celular, obtida pela média entre os valores obtidos pelos ensaios de MTT:

$$UAA = \frac{\text{Valores individuais do VN}}{\text{Valores da média MTT}} \quad (\text{Equação 2})$$

Há uma maior incorporação e retenção de VN em vacúolos autofágicos tardios e desta maneira, há uma superestimação da viabilidade celular com o ensaio de VN, a qual deve ser normalizada pela média da viabilidade celular obtida por MTT. A correlação positiva com morte celular por autofagia é descrita quando a UAA é maior que 1. Assim, os dados obtidos nos experimentos de MTT e VN nos diferentes grupos de estudo e períodos foram utilizados para o cálculo da UAA (MARTINS et al., 2013).

### 3.2.6 Morfologia celular por microscopia óptica

A morfologia celular foi observada por microscopia óptica. Em microplaca de 96 poços de fundo chato, com tratamento para cultivo e com tampa, foram inoculadas  $1 \times 10^4$  células por poço. Posteriormente a 24 horas de adesão os tratamentos mostrados na Tabela 1 foram adicionados. Após os tempos de exposição de 24 e 48 horas, os poços foram lavados com PBS 1X e observados em microscópio óptico Axiovert 40 CFL (Zeiss), com lente objetiva 10X, cujas imagens serão capturadas com a câmera acoplada modelo LOD-3000 (Bio Focus) e analisadas pelo software Future WinJoe™ versão 2.0 com resolução final de 100X.

### 3.2.7 Produção de Óxido Nítrico (NO) pela Reação de Griess

Foi realizada, por meio da reação de Griess que mede a produção do íon nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) (GREEN et al., 1982; SALTZMAN, 1954) a produção NO na qual o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido. O diazo composto formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil)etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração vermelha. Em microplaca de 96 poços de fundo chato, com tratamento para cultivo e com tampa, foram inoculadas  $1 \times 10^4$  células por poço. Posteriormente a 24 horas de adesão, os tratamentos mostrados na Tabela 1 foram adicionados. Após os tempos de exposição de 24 e 48 horas, 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram coletados para realizar o ensaio e adicionados a uma nova placa seguido da adição de 50

$\mu\text{L}$  da solução de Griess (mistura 1: 1 da solução A [sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%] e solução B [0,1 % de dicloridrato de N-1-naftiletilenodiamina]) durante 15 minutos à temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada a 554 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific <sup>TM</sup> Multiskan <sup>TM</sup> GO Microplate Spectrophotometer). A concentração de nitrito no sobrenadante foi quantificada a partir de uma curva padrão (RAMOS; CAVALHEIRO; CAVALHEIRO, 2006) com concentrações conhecidas de nitrito em mM descritas no kit Griess reagent (modified) número G4410 (Sigma-Aldrich).

### **3.2.8 Recuperação celular via formação de colônias pelo ensaio clonogênico**

A capacidade de recuperação das células após o tratamento proposto foi avaliada pela formação de colônias via ensaio clonogênico (FRANKEN et al., 2006). Quanto maior o número de colônias pós-tratamento, maior é a recuperação celular. Em microplaca de 6 poços de fundo chato, com tratamento para cultivo e com tampa, foram inoculadas  $1 \times 10^3$  células por poço. Posteriormente a 24 horas de adesão, os tratamentos mostrados na Tabela 1 foram adicionados. Após os tempos de exposição de 24 e 48 horas, os poços tiveram o sobrenadante descartado e novo meio de cultura adicionado. Após 7 dias de recuperação, e troca de meio por 2 vezes, as células foram fixadas com álcool metílico P.A. (metanol absoluto) e coradas com cristal violeta 0,1% (diluído em água destilada). Os poços foram fotografados e a contagem das colônias realizada no software ImageJ versão 1.53<sup>a</sup> (SCHINDELIN et al., 2012) e pela diluição das colônias com SDS 1%. A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific <sup>TM</sup> Multiskan <sup>TM</sup> GO Microplate Spectrophotometer).

### **3.2.9 Dosagem das citocinas IL-6, IL-8 e TNF**

Para a dosagem das citocinas inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF (Kit OptEIATM, BDBiosciences) foi realizado o ELISA direto seguindo o protocolo abaixo descrito. Para este procedimento foram utilizadas placas de microtitulação de alta afinidade com 96 poços para ELISA. Entre cada etapa as placas foram lavadas com 300  $\mu\text{L}$ /poço de solução de lavagem descrita no item 3.1.5. Após a sensibilização das placas com 100  $\mu\text{L}$ /poço de anticorpo de captura específico em tampão carbonato na proporção 1:250 houve incubação por 16 horas a 4 °C. Em seguida foi realizada a etapa de bloqueio com 200  $\mu\text{L}$ /poço com leite 10% (0% de gordura), seguido de incubação por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente foram aplicados 50  $\mu\text{L}$  das amostras (sobrenadante dos cultivos celulares, com diluição de 10 X para a placa sensibilizada com anti\_IL-8) e 50  $\mu\text{L}$  dos reagentes da curva de titulação dos padrões

de citocinas fornecidos pelo kit, ambos com incubação de 2 horas também em temperatura ambiente. O anticorpo de captura conjugado com a enzima peroxidase foi em seguida adicionado em 100 µL/poço ao abrigo de luz por 1 hora e 30 minutos e incubação a temperatura ambiente, em albumina 1X na proporção 1:250 de enzima e anticorpo. Então foi aplicado, ao abrigo de luz, 100 µL/poço do substrato da enzima TMB e as placas foram incubadas, ainda ao abrigo de luz, de 15 a 30 minutos aproximadamente em temperatura ambiente. Em seguida, a reação foi interrompida com a aplicação de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2M, e a leitura das placas foi feita no comprimento de onda de 450 nm, pelo espectrofotômetro de placas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer), sendo as concentrações calculadas a partir da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em pg/mL. Foram feitos controles brancos com os anticorpos de detecção e captura diluídos em albumina 1X.

### **3.2.10 Dosagem dos níveis de Caspase 3**

Para a detecção de apoptose via aumento da atividade da enzima Caspase-3 foi utilizado o kit EnzChek® Caspase-3 Assay Kit #1, usado para monitorar continuamente a atividade de caspase-3 e demais proteases intimamente relacionadas em extratos celulares via substrato derivado do 7-amino-4-metilcumarina Z-DEVD-AMC que gera um produto fluorescente azul brilhante após clivagem proteolítica. Em placa de 24 poços de fundo chato, com tratamento para cultivo e com tampa, foram inoculadas  $1 \times 10^5$  células por poço. Posteriormente a 24 horas de adesão os tratamentos mostrados na Tabela 1 foram adicionados. Após os tempos de exposição de 24 e 48 horas as placas foram centrifugadas e os poços raspados com *scraper* e PBS 1X para a remoção das células. O extrato celular foi lisado com tampão de lise por 30 minutos à -20°C e centrifugado a 5000 g por 5 minutos. Em seguida, 50 µL do sobrenadante foi adicionado em uma nova microplaca de 96 poços e adicionado 50 µL da solução reagente (Z-DEVD-AMC em tampão de reação). A reação ocorreu por 30 minutos em temperatura ambiente sob abrigo de luz. A emissão de fluorescência foi lida a 342-441 nm no equipamento Spectra MAX i3® (Molecular Devices).

### **3.2.11 Apoptose por citometria de fluxo com os marcadores PE Anexina V e 7AAD**

A morte celular por apoptose também foi avaliada por meio do marcador Anexina V (kit de detecção da BD Biosciences). Nas células apoptóticas, a membrana fosfolipídica fosfatidilserina (PS) é translocada do folheto interno para o externo da membrana plasmática,

expondo assim o PS ao ambiente celular externo. A anexina V é uma proteína de ligação com alta afinidade por PS e se liga a células com PS expostas (BIOSCIENCES, 2015). Em microplaca de 24 poços de fundo chato, com tratamento para cultivo e com tampa, foram inoculadas  $1 \times 10^5$  células por poço. Posteriormente a 24 horas de adesão, os tratamentos mostrados na Tabela 1 foram adicionados. Após os tempos de exposição de 24 e 48 horas, as placas foram centrifugadas e lavadas com PBS 1X e os anticorpos PE Anexina V e 7AAD [1:1] (1  $\mu$ L/poço em tampão de ligação 1:10 em água destilada) foram adicionados. A reação ocorreu por 15 minutos à temperatura ambiente protegida da luz. Em seguida, as células foram removidas com o auxílio de *scraper* e ressuspensas em microtubos com 300  $\mu$ L de tampão de ligação (1:10). A leitura foi realizada em citômetro de fluxo Accuri™ C6 BD Biosciences, selecionando gate com 10.000 eventos. A análise foi realizada usando o software FlowJo™ versão XV (BD Biosciences). Foram feitos os controles de células vivas e duplamente marcadas, e dois controles de morte (10 minutos em banho seco a 80 °C), um somente com PE Anexina V e outro marcado somente com 7AAD, para calibração do equipamento.

### **3.3 Ensaios *in vivo***

O delineamento experimental deste estudo se pautou nas recomendações dos Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sob parecer nº 8915061118 (Anexo 1).

#### **3.3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, pesando entre 18 e 20 gramas, provenientes da empresa ANILAB Animais De Laboratório Criação E Comercio Ltda. Esses animais apresentam o certificado *Specified Pathogen Free* - SPF, o que garante que eles são livres de patógenos. Todos os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos (DMP - UFSCar), com livre acesso à água e ração para roedores em gaiola individuais com controle de ar (ALESCO).

#### **3.3.2 Grupos experimentais, indução do câncer e tratamento**

Foram definidos 6 grupos experimentais com 12 animais por grupo (n=12), analisados individualmente. Os grupos amostrais são mostrados a seguir (CAbxg: câncer de bexiga):

- C-: Controle negativo (CTRL-)
- C+: CAbxg (CTRL+)
- SL3261: CAbxg +Tratado com SL3261 (CAbxg+SL3261)
- SL3261\_IL-2: CAbxg +Tratado com SL3261\_IL-2 (CAbxg+IL-2)
- SL3261\_TRAIL: CAbxg +Tratado com SL3261\_TRAIL (CAbxg+TRAIL)
- SL3161\_MIX: CAbxg +Tratado com SL3261\_MIX (CAbxg+MIX)

Para a indução do tumor, sob efeito dos anestésicos, os animais foram submetidos a cateterização transuretral com auxílio de cateter de polietileno A 24-gauge sem agulha e a bexiga foi totalmente esvaziada por compressão manual, para a retirada de resíduos de urina. Em seguida, foi feita a lesão do epitélio vesical COM 70  $\mu$ L com etanol 22%, seguido de lavagens com solução de soro fisiológico a 0,9%. A indução do tumor se deu através de uma lesão no tecido interno da bexiga seguida da inoculação local das células tumorais MB49. Então, foi realizada a instilação intravesical de 70  $\mu$ L de suspensão de células MB49 a  $1 \times 10^4$  células/camundongo (CHADE et al., 2008). Depois dos procedimentos de instilação, os cateteres foram removidos e os animais foram acompanhados diariamente, analisando a implantação do tumor através da observação de hematúria e aumento abdominal.

O tratamento foi intravesical com  $5 \times 10^7$  UFC/mL da bactéria após 3 dias da indução tumoral. O tempo de eutanásia foi determinado pelo estado debilitado dos animais, ocorrendo 11 dias após implantação do tumor (Figura 24). O período de 11 dias foi baseado em ensaios piloto realizados anteriormente nos quais mostraram que com 11 dias já há o desenvolvimento tumoral e os animais já estão muito debilitados e começam a morrer.

**Figura 24** – Design experimental em camundongos C57BL/6



Design experimental em camundongos C57BL/6. A indução do tumor ocorreu no dia 1, seguido por tratamento no 4º dia, ambos por via intravesical. No 11º foi feita a eutanásia dos animais por punção da veia braquial esquerda. Fonte: autora.



### **3.3.3 Eutanásia, obtenção e contagem das células do sangue e do líquido da cavidade peritoneal (LCP)**

Os animais foram anestesiados com xelasina e quetamina a 20 mg/kg e intraperitoneal (i.p.). O sangue dos animais foi obtido por meio de punção da veia braquial esquerda, utilizando-se EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid - Ácido etilenodiamino tetra-acético) como anticoagulante na concentração final de 0,3M. O LCP foi retirado pela inoculação peritoneal de 3 ml de PBS citratato, tendo o abdômen homogeneizado e o líquido colido com seringa. A contagem global de células do sangue e do LCP foi realizada individualmente na câmara de Neubauer e as amostras foram adicionadas em solução Turk (ácido acético a 3% e azul de metileno a 1%) na diluição de 1:20. Para a contagem diferencial e em % das células (Eosinófilos, Neutrófilos e Leucócitos Mononucleados) foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo e de LCP em centrífuga Citospin coradas com corante Panótico Rápido. Em cada lâmina foram contadas 100 células, com auxílio da microscopia de luz com magnitude final de 1000 X. O plasma dos animais foi obtido após a centrifugação do sangue total, em uma velocidade de 1500 g, por um período de 15 minutos. Posteriormente, o plasma foi armazenado em uma temperatura de -20 °C para a realização da dosagem de citocinas

### **3.3.4 Plaqueamento de culturas do baço, fígado e tumor para contagem de UFC – Biodistribuição**

Os baços, fígados e bexigas com tumores dos animais foram macerados separadamente em homogeneizadores de vidro com 1,0 mL de solução salina NaCl 0,9 %. Em seguida, foi feita diluição seriada das amostras com solução salina (1:100 e 1:200) e alíquotas de 100 µL das mesmas foram plaqueadas em LB ágar. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). O objetivo desse ensaio é verificar a preferência de *Salmonella* em colonizar preferencialmente o tumor, já que o fígado e o baço são os órgãos naturalmente colonizados por esse gênero.

### **3.3.5 Análise do peso das bexigas**

As bexigas foram retiradas e pesadas em balança analítica de precisão e fotografadas.

### **3.3.6 Quantificação de citocinas IL-12, TNF- $\alpha$ e IFN- $\gamma$**

Para a dosagem das citocinas IL-12, TNF e IFN- $\gamma$  foram usados o plasma dos animais individualmente pelo ensaio ELISA direto (Kit OptEIATM, BDBiosciences) seguindo o

protocolo descrito no item 3.2.9, sendo usado tampão carbonato para IFN- $\gamma$  e fosfato para TNF e IL-12, todos com diluições de anticorpos de detecção, captura e enzima na proporção 1:250.

### **3.4 Análise estatística**

Os dados obtidos neste estudo foram analisados por meio do *software* GraphPad Prism 7.0 (San Diego, Califórnia, EUA). Todo o estudo foi realizado no mínimo, em sextuplicata, com o valor de n amostral variando de 6 a 14 (N= 6-14) e em experimentos independentes (três *in vitro* e dois *in vivo*). Os dados discrepantes foram identificados por meio da análise de Grubbs, seguida do teste de Shapiro-Wilk para verificar a natureza paramétrica ou não paramétrica dos dados. Para tanto, aplicou-se o teste ANOVA (análise de variância) aos dados paramétricos e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey (os resultados foram apresentados em média e desvio padrão). Para dados não paramétricos, foram usados o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de comparação múltipla de Dunn (os resultados foram apresentados como a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3]). A significância estatística foi estabelecida em  $p < 0,05$ .

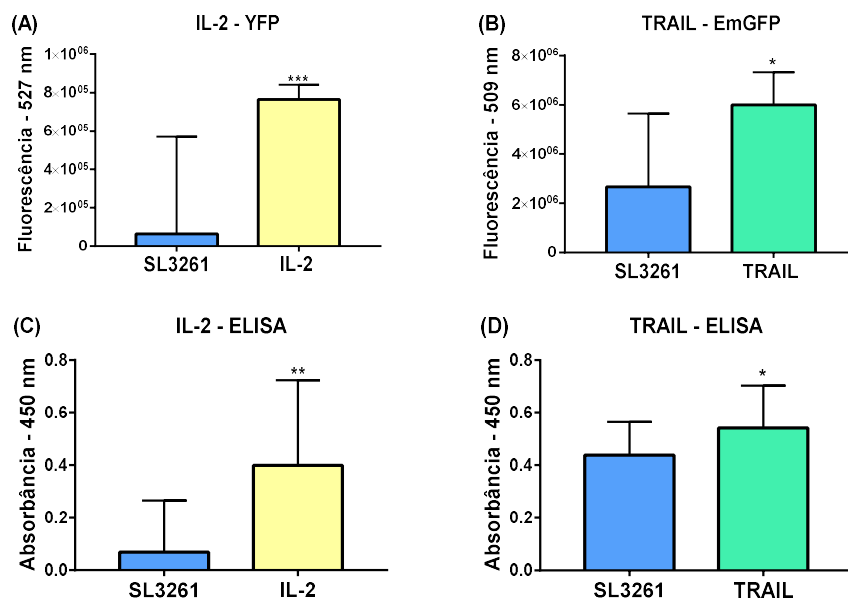
## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Cultivos bacterianos**

As figuras 25.A e 25.B mostram as emissões de fluorescência das proteínas YFP e EmGFP dos cultivos das linhagens SL3261, SL3261\_IL-2 e SL3261\_TRAIL. Houve uma diferença significativa nos valores de fluorescência encontrados nas amostras dos cultivos de SL3261\_IL-2 e SL3261\_TRAIL quando comparado a amostra SL3261. Os valores encontrados evidenciam que a indução da expressão e secreção das proteínas YFP e EmGFP fusionadas com IL-2 e TRAIL, respectivamente, pela anaerobiose foi eficiente e que havia proteínas sintetizadas e liberadas no meio de cultura.

As figuras 25.C e 25.D mostram os níveis de IL-2 e TRAIL medidos pelo método ELISA no sobrenadante do cultivo das linhagens SL3261, SL3261\_IL-2 e SL3261\_TRAIL. Foi observada diferença significativa nos valores de absorvância de IL-2 quando comparado ao grupo SL3261 na placa sensibilizada com anticorpos anti-IL-2. Houve também uma diferença significativa no aumento dos níveis de TRAIL em comparação com os grupos SL3261 e IL-2 na placa sensibilizada com anticorpos anti-TRAIL.

**Figura 25** - Emissão de fluorescência e dosagem dos níveis por ELISA das proteínas IL-2 e TRAIL em cultivo bacteriana

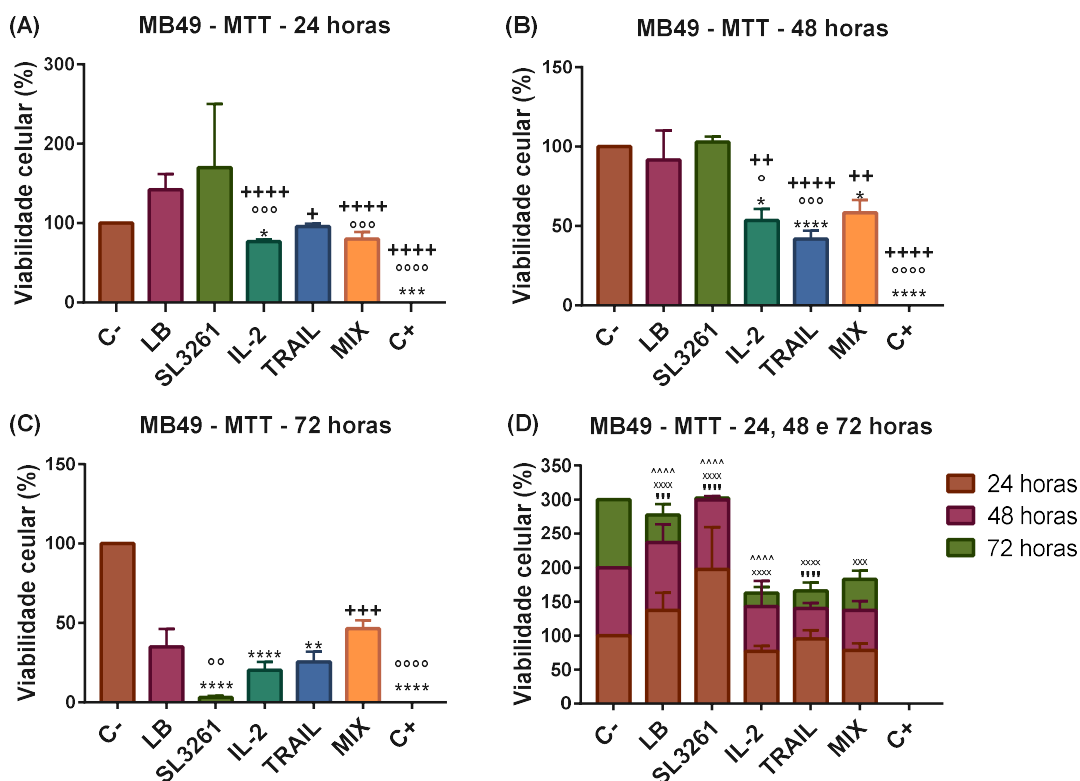


Análise quantitativa de dados. N=14. (A, B) Detecção de proteínas IL-2 e TRAIL pela emissão de fluorescência no sobrenadante de cultura SL3261, SL3261\_IL-2 e SL3261\_TRAIL após sensibilização da placa com 100  $\mu$ L/poço. N=16. (C, D) Níveis de dosagem de IL-2 e TRAIL por ELISA. (\*) vs SL3261; \* p <0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001. Os resultados foram apresentados como a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3]. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

#### 4.2 Ensaios *in vitro* com a linhagem celular MB49

Os resultados obtidos nessa sessão foram publicados em periódico científico (Anexo 2). Os valores obtidos pelo ensaio MTT mostrando a porcentagem de viabilidade celular após 24, 48 e 72 horas após a exposição aos tratamentos são demonstrados nas figuras 26.A, 26.B e 26.C. A diminuição da viabilidade celular causada pelas proteínas IL-2, TRAIL e o MIX após 24 horas, apresenta diferença significativa nos valores quando comparado aos grupos C-, LB e SL3261. Em 48 horas, a mesma diminuição na viabilidade celular permaneceu. Após 72 horas, apenas os tratamentos com IL-2 e TRAIL mostraram diminuição nos valores e o grupo SL3261 também apresentou valores menores com diferença significativa. Os três tratamentos diminuíram a viabilidade para a célula MB49, com a proteína TRAIL apresentando maior dano celular. A Figura 26.D mostra a comparação nos 3 intervalos de tempo, mostrando que com o passar das horas a viabilidade celular diminui. Com base nesses resultados, as análises seguintes foram realizadas somente com os horários de 24 e 48 horas de exposição, uma vez que nesses intervalos de tempo já ocorreu resposta e em 72 horas o grupo SL3261 apresentou baixa viabilidade.

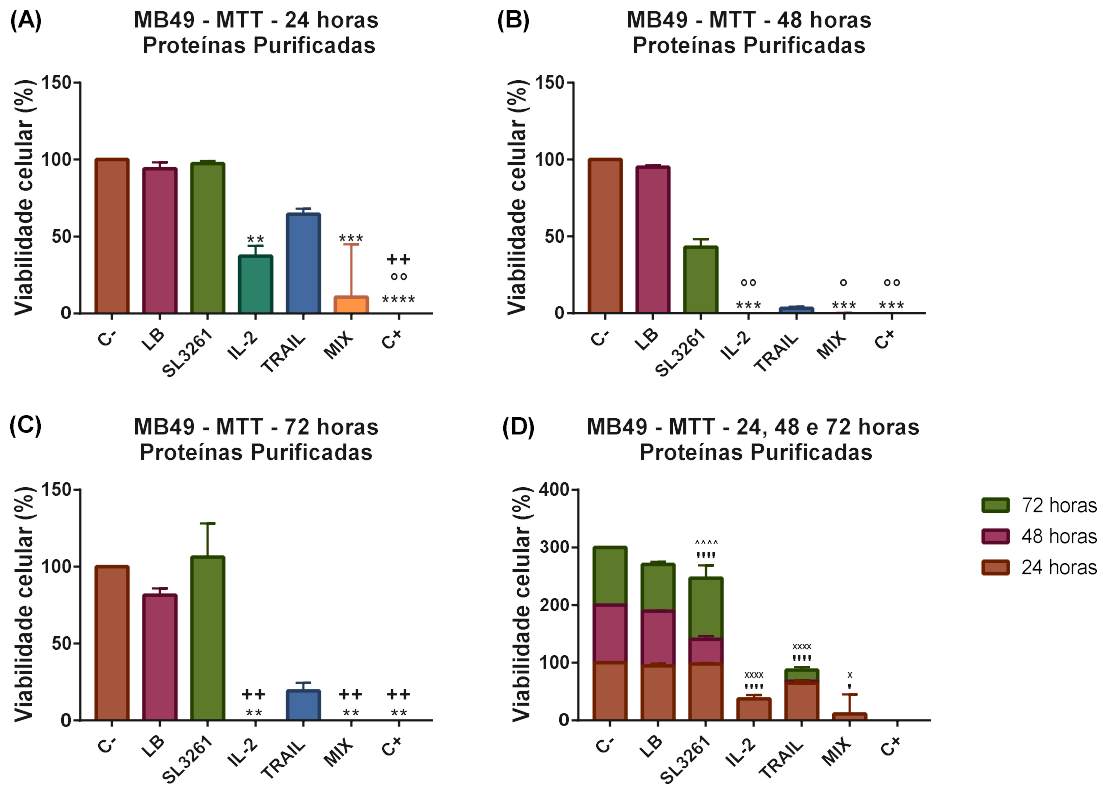
**Figura 26 - Viabilidade celular em % em células MB49 pelo ensaio com MTT**



Análise quantitativa de dados. N=14. (A). Viabilidade celular em% das proteínas IL-2, TRAIL e MIX após 24 horas de exposição. (B). Viabilidade celular em% das proteínas IL-2, TRAIL e MIX após 48 horas de exposição aos tratamentos. (C). Viabilidade celular em% das proteínas IL-2, TRAIL e MIX após 72 horas de exposição aos tratamentos. (D) Viabilidade celular em % das proteínas IL-2, TRAIL e MIX após 24, 48 e 72 horas de exposição aos tratamentos. (\*) vs C-: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. (°) vs LB: ° p<0,05; °° p<0,01; °°° p<0,001; °°°° p<0,0001. (+) vs SL3261: ++ p<0,01; +++ p<0,001; ++++ p<0,0001. (‘) 48 horas vs 24 horas: ‘ ‘ ‘ p<0,001; ‘ ‘ ‘ ‘ p<0,0001. (x) 72 horas vs 24 horas: xxx p<0,001; xxxx p<0,0001. (^) 48 horas vs 72 horas: ^^^ p<0,0001. Os resultados foram apresentados como a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3]. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

Também foi realizado ensaio com MTT utilizando as proteínas IL-2 e TRAIL purificadas, mostrados na Figura 27. Observa-se que as proteínas expressas e purificadas sem EmGFP e YFP apresentam alto poder citotóxico pois a viabilidade celular diminui acentuadamente. Em ambos os intervalos de tempo.

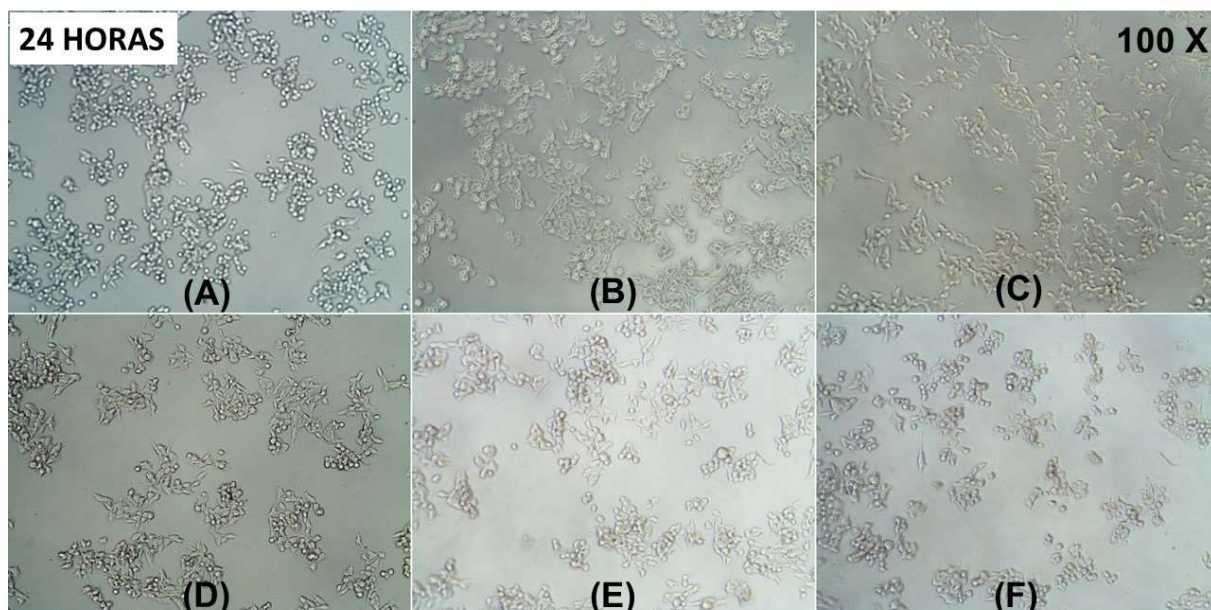
**Figura 27** – Viabilidade celular em % em células MB49 com as proteínas purificadas pelo ensaio MTT



Análise quantitativa de dados. N=6. (A). Viabilidade celular em% das proteínas IL-2, TRAIL e MIX após 24 horas de exposição. (B). Viabilidade celular em% das proteínas IL-2, TRAIL e MIX após 48 horas de exposição aos tratamentos. (C). Viabilidade celular em% das proteínas IL-2, TRAIL e MIX após 72 horas de exposição aos tratamentos. (D) Viabilidade celular em % das proteínas IL-2, TRAIL e MIX após 24, 48 e 72 horas de exposição aos tratamentos O ensaio foi realizado pelo menos em triplicata, em três experimentos independentes. (\*) vs C-: \*\* p< 0,01; \*\*\* p< 0,001; \*\*\*\* p <0,0001. (°) vs LB: ° p<0,05; °° p<0,0. (+) vs SL3261: ++ p<0,001. (ˆ) 48 horas vs 24 horas: ˆ p< 0,05; ˆˆˆˆ p<0,0001. (x) 72 horas vs 24 horas: x<0,05; xxxxx: p<0,0001. (ˆˆˆˆ) 48 horas vs 72 horas: ˆˆˆˆ p<0,0001. Os resultados foram apresentados como a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3].

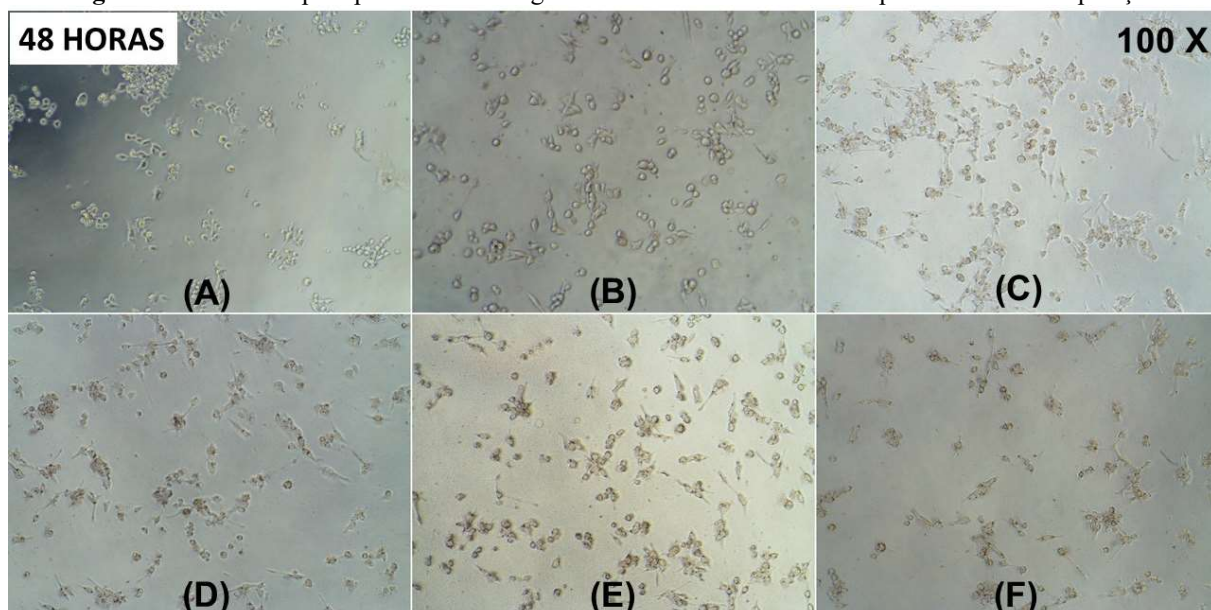
O efeito citotóxico das proteínas IL-2, TRAIL e MIX também foi observado em fotos de microscopia óptica de células MB49 após 24 horas (Fig. 28) e 48 horas (Fig. 29) de exposição. Após 24 horas, os grupos C-, LB e SL3261 apresentaram maior número de células com morfologia preservada quando comparados aos grupos tratados com IL-2, TRAIL e MIX, que além de menor número de células, a morfologia foi alterada tendo os corpos celulares alongados e membrana com menor definição. Isso foi observado em 48 horas de exposição, as células expostas a IL-2, TRAIL e MIX estavam em menor número e sua morfologia foi ainda mais modificada.

**Figura 28** - Microscopia óptica da morfologia das células tumorais MB49 após 24 horas de exposição



Dados representativos, análise qualitativa. Grupos: (A) C-. (B) LB. (C) SL3261. (D) IL-2. (E) TRAIL. (F) MIX. Aumento: 100 X. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

**Figura 29** - Microscopia óptica da morfologia das células tumorais MB49 após 48 horas de exposição

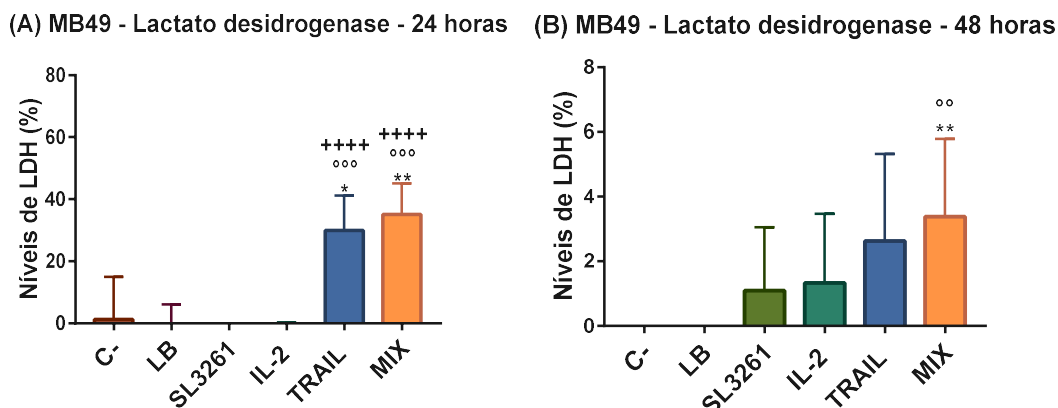


Dados representativos, análise qualitativa. Grupos: (A) C-. (B) LB. (C) SL3261. (D) IL-2. (E) TRAIL. (F) MIX. Aumento: 100 X. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

Nas Figuras 30.A e 30.B estão a detecção dos níveis de LDH nos grupos C-, LB, SL3261, IL-2, TRAIL e MIX, após 24 e 48 horas. Os grupos tratados com TRAIL e MIX apresentaram diferença significativa nos valores obtidos quando comparados aos grupos C- e LB no período de 24 horas. Em 48 horas, a diferença significativa ocorre no grupo MIX quando comparado aos grupos C- e LB. Os dados mostram que nos grupos tratados com TRAIL e MIX,

nos dois períodos analisados, há liberação maior de LDH, evidenciando danos à membrana celular, sendo esse dano maior no período de 24 horas. O grupo TRAIL apresentou níveis mais elevados de citotoxicidade em 48 horas, mas sem diferença significativa observada.

**Figura 30** - Detecção dos níveis de LDH em células MB49

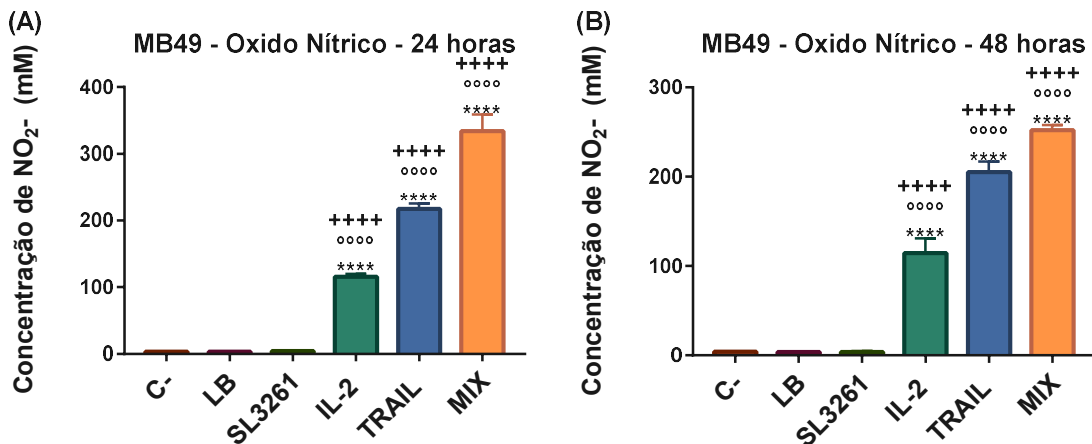


Análise quantitativa de dados. N=12. Porcentagem de viabilidade celular pela quantificação do LDH liberado 24 e 48 horas após a exposição aos tratamentos. (A) 24 horas de exposição. (B) 48 horas de exposição. (\*) vs C-: \* p<0,05; \*\* p<0,01. (°) vs LB: °° p<0,01; °°° p<0,001. (+) vs SL3261: +++++ p<0,0001. Os resultados foram apresentados como a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3]. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

A produção de  $\text{NO}_2^-$  pelas células MB49 após tratamento com IL-2, TRAIL e MIX nos períodos de 24 e 48 horas é mostrada nas figuras 31.A e 31.B. As células expostas a TRAIL e MIX tiveram um aumento significativo na produção de  $\text{NO}_2^-$  quando comparadas aos grupos C- e LB em 24 horas. Em 48 horas, o aumento dos valores foi significativo nos grupos TRAIL e MIX quando comparados aos grupos C-, LB e SL3261. Em ambos os períodos houve aumento significativo da produção de  $\text{NO}_2^-$  no grupo tratado com IL-2, mas com diferença significativa observada.



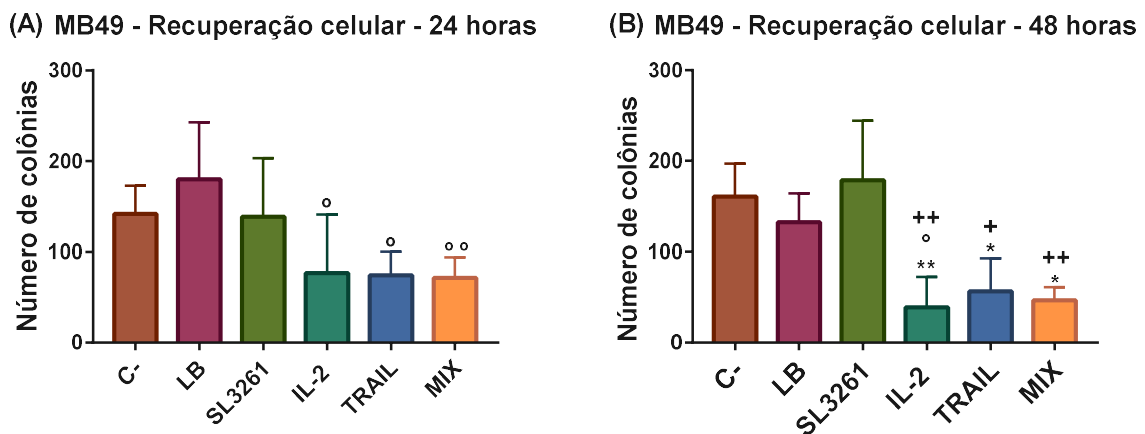
**Figura 31** - Produção de óxido nítrico (NO) em células MB49



Análise quantitativa de dados. N=6. (A, B) Concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 24 e 48 horas após a exposição aos tratamentos. Grupos: (A) C-. (B) LB. (C) SL3261. (D) IL-2. (E) TRAIL. (\*) vs C-: \*\*\*\* p<0,00001. (°) vs LB: p<0,0001. (+) vs SL3261; \*\*\*\* p<0,00001. Os resultados foram apresentados como a média e desvio padrão (A) a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3] (B). Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

As figuras 32.A e 32.B mostram o número de colônias formadas por células MB49 após 7 dias de recuperação. Em ambos os intervalos de tempo, há uma diferença significativa no número de colônias formadas nos grupos tratados com IL-2, TRAIL e MIX quando comparado aos grupos C-, LB e SL3261, com diferença estatística maior em 48 horas.

**Figura 32** - Recuperação de células MB49 por meio da formação de colônias

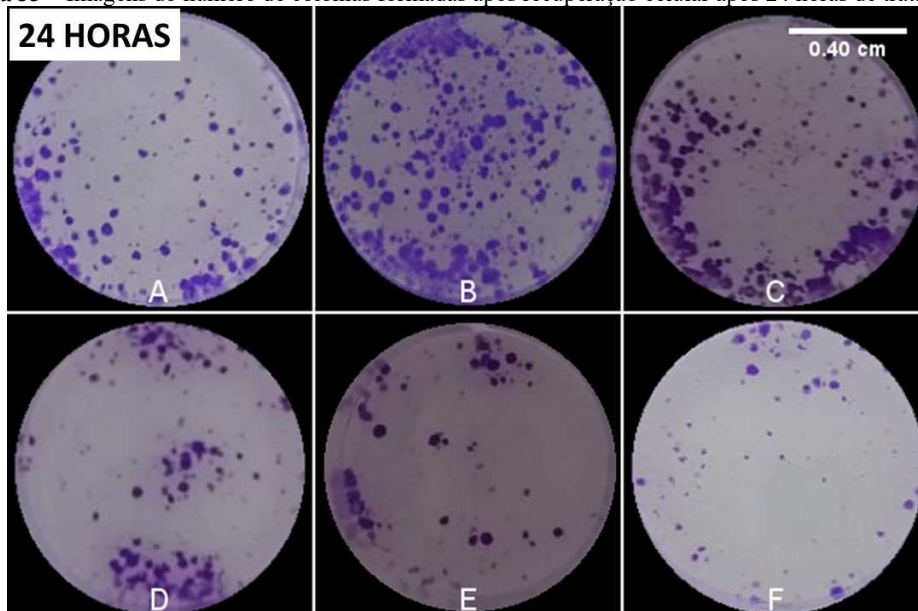


Análise quantitativa de dados. N= 8. (A) Após 24 horas de exposição. (B). Após 48 horas de exposição. (\*) vs C-: \* p<0,05; \*\* p<0,01. (°) vs LB: ° p<0,05; °° p<0,01. (+) vs SL3261: + p<0,05; ++ <0,01. Os resultados foram apresentados como a média e desvio padrão. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.



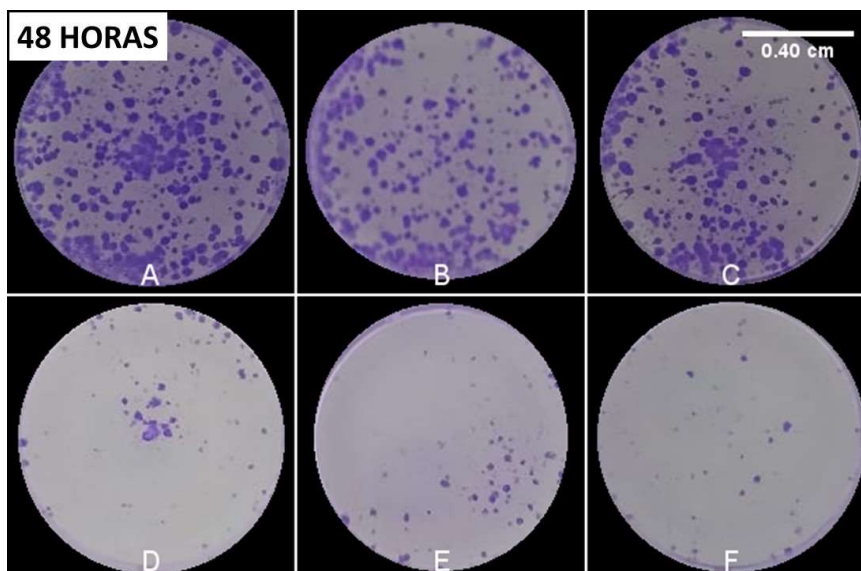
As figuras 33 e 34 são fotografias dos poços de todos os grupos do ensaio clonogênico, mostrando a recuperação das células MB49 após 7 dias da retirada da proteínas IL-2, TRAIL e MIX por 24 e 48 horas, evidenciada pela formação de colônias.

**Figura 33** – Imagens do número de colônias formadas após recuperação celular após 24 horas de tratamento



Dados representativos, análise qualitativa. Fotografias de poços de todos os grupos mostrando colônias formadas por células tumorais MB49 após 7 dias de recuperação e. (A) C-. (B) LB. (C) SL3261. (D) IL-2. (E) TRAIL. (F) MIX. Dados representativos. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

**Figura 34** – Imagens do número de colônias formadas após recuperação celular após 48 horas de tratamento

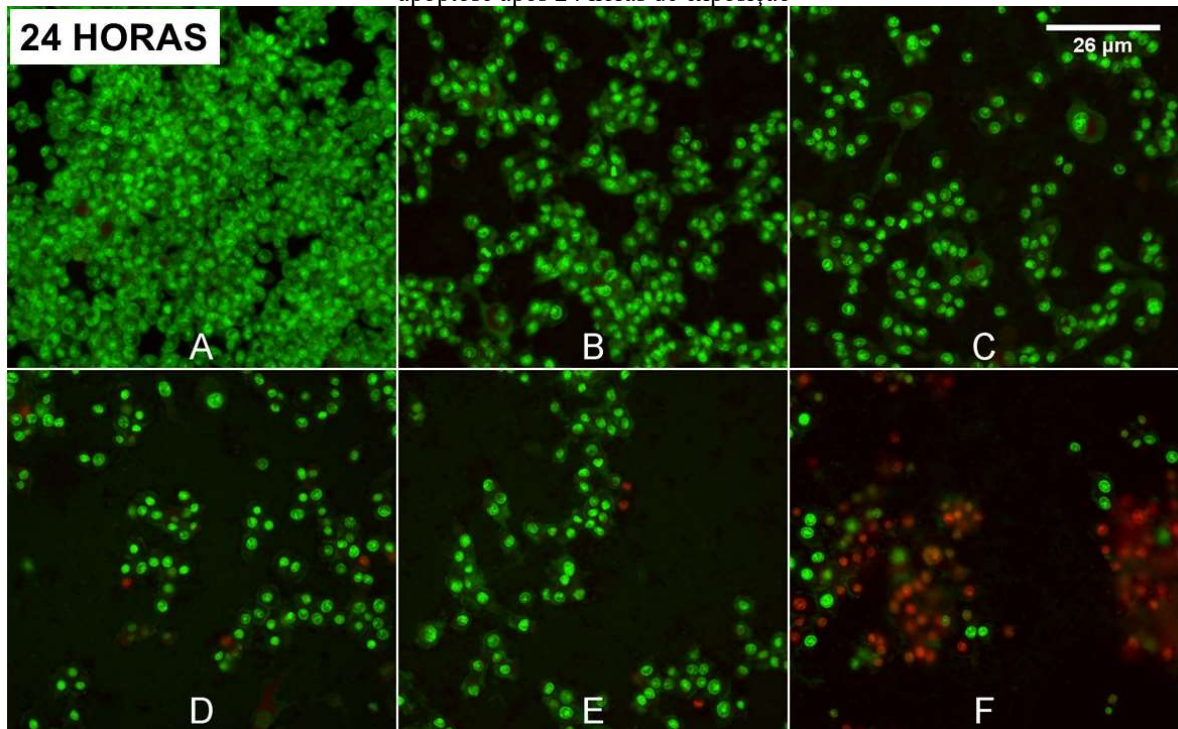


Dados representativos, análise qualitativa. Fotografias de poços de todos os grupos mostrando colônias formadas por células tumorais MB49 após 7 dias de recuperação e. (A) C-. (B) LB. (C) SL3261. (D) IL-2. (E) TRAIL. (F) MIX. Dados representativos. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

Imagens de microscopia epifluorescente de alta resolução de células MB49 são mostradas nas figuras 35 e 36 após 24 e 48 horas, respectivamente, de exposição às proteínas

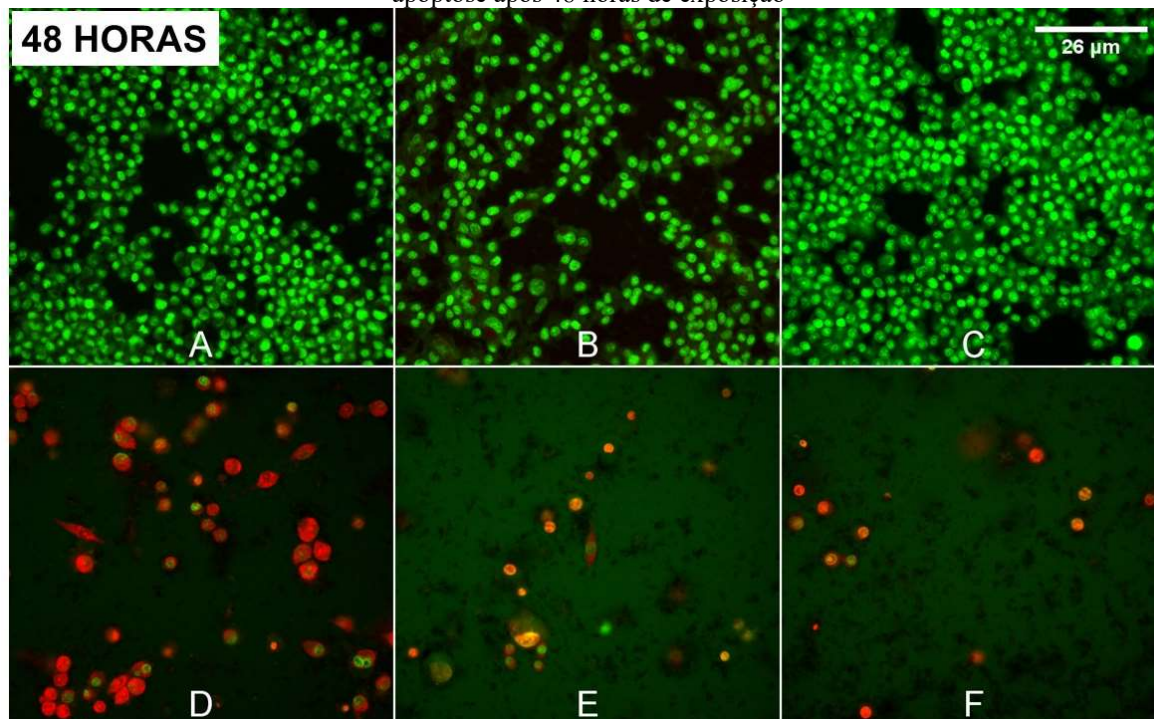
IL-2, TRAIL e MIX. As células foram coradas com laranja de acridina que marca células vivas e mortas e emite verde, e com iodeto de propídio que marca células mortas em que o citoplasma avermelhado indica apoptose inicial e o núcleo avermelhado indica apoptose tardia. A sobreposição de imagens mostra que os grupos C-, LB e SL3261 em 24 e 48 horas não apresentaram dano celular, com morfologia preservada, coloração verde e elevado número de células. Os grupos IL-2, TRAIL e MIX apresentam morfologia alterada, diminuição do número de células verdes, sendo as laranjas com maior aparição e núcleos apresentando apoptose tardia, tanto em 24 quanto em 48 horas.

**Figura 35** - Imagens de epi fluorescência de alta resolução de células MB49 para análise de morte celular por apoptose após 24 horas de exposição



Dados representativos, análise qualitativa. Grupos: (A) C-. (B) LB. (C) SL3261. (D) IL-2. (E) TRAIL. (F) MIX. Imagens obtidas usando um sistema automatizado de microscopia epifluorescente de alta resolução de células MB49 coradas com fluoróforos LA e IP. Aumento: 400 X. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

**Figura 36** - Imagens de epi fluorescência de alta resolução de células MB49 para análise de morte celular por apoptose após 48 horas de exposição

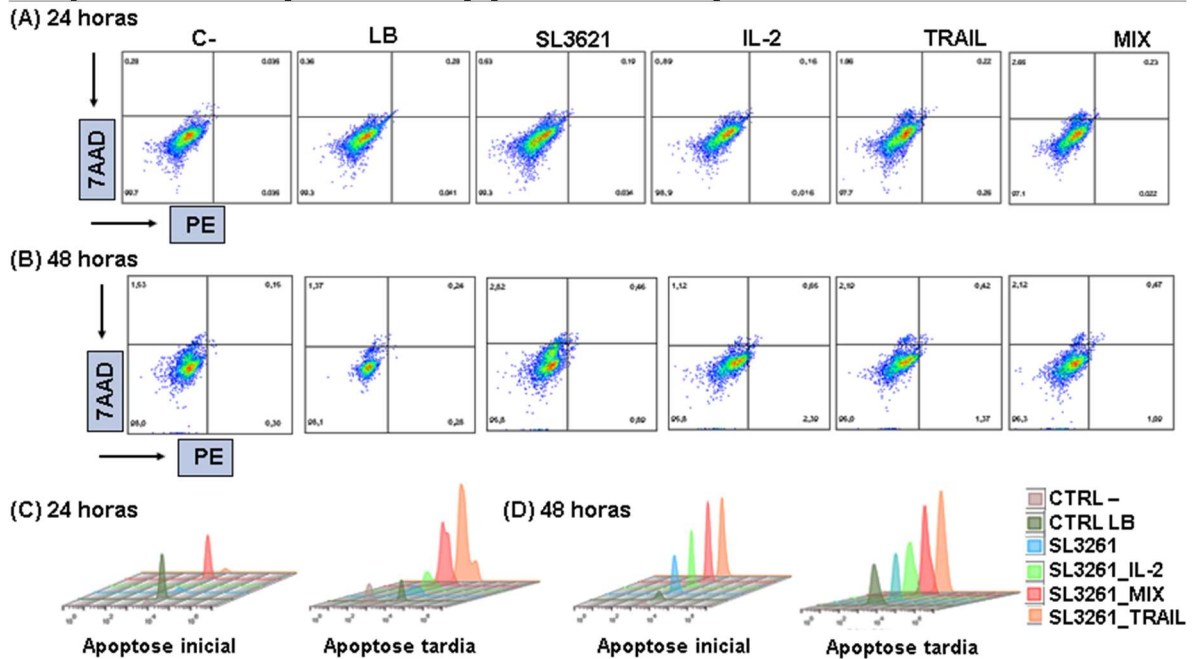


Dados representativos, análise qualitativa. Grupos: (A) C-. (B) LB. (C) SL3261. (D) IL-2. (E) TRAIL. (F) MIX. Imagens obtidas usando um sistema automatizado de microscopia epifluorescente de alta resolução de células MB49 coradas com fluoróforos LA e IP. Aumento: 400 X. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

Os gráficos *dot plot* e histograma obtidos por citometria de fluxo dos grupos C-, LB, SL3261, IL-2, TRAIL e MIX em cultura de células MB49 em 24 e 48 horas são apresentados nas figuras 37.A e 37.B. Os dados apresentados são representativos, apresentando uma única leitura de cada grupo, uma vez que o número da amostra é 8. Os gráficos mostram a fluorescência em % de cada marcador, com 7-AAD no eixo y e PE no eixo x. As células consideradas viáveis são PE e 7-AAD negativas. As células que estão no início da apoptose são positivas para PE e negativas para 7-AAD, enquanto as células que estão em apoptose tardia ou necrose são ambas positivas, ou seja positiva para PE e para 7-AAD. As figuras 37.C e 37.D são representativas de histogramas que mostram os picos de emissão de fluorescência dos marcadores PE e 7AAD, de acordo com cada grupo analisado nas 24 horas e nas 48 horas de exposição. Em ambos os intervalos de tempo, os picos de emissão dos grupos IL-2, TRAIL e MIX são maiores do que os picos dos grupos C-, LB e SL3261.



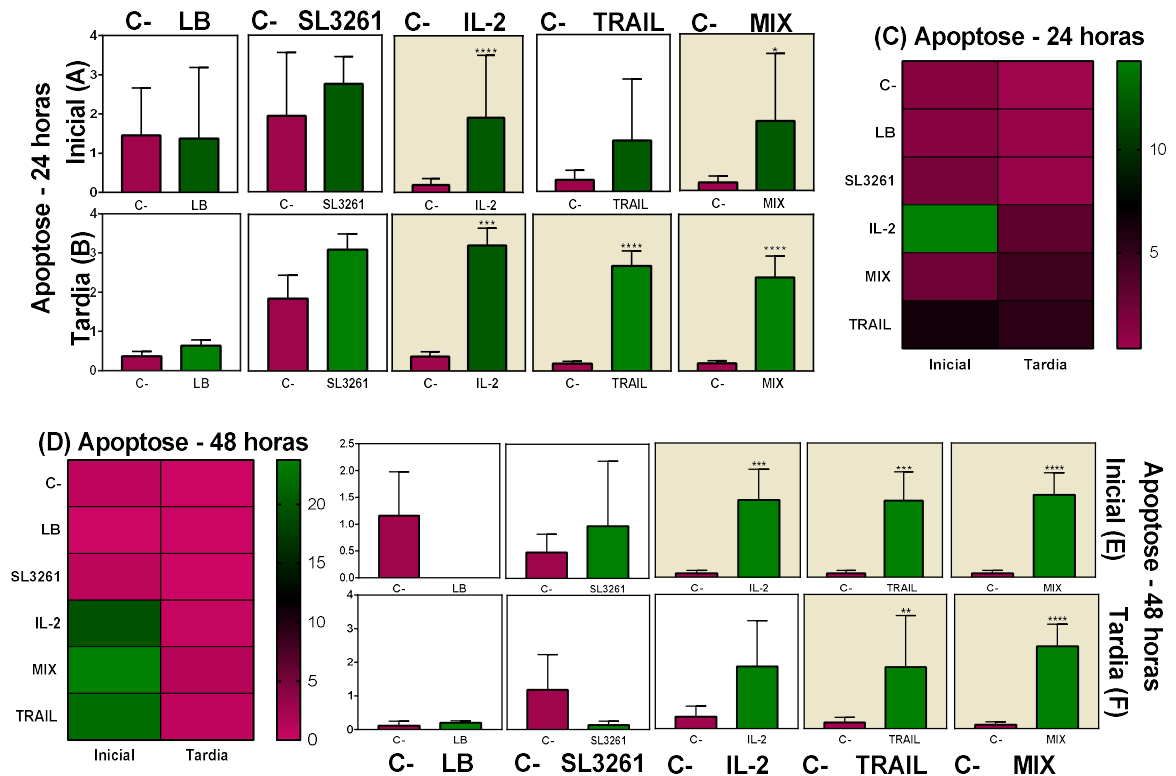
**Figura 37** - Análise representativa da apoptose inicial e tardia por citometria de fluxo em células MB49



Dados representativos, análise qualitativa. (A, B) Os gráficos *dot plot* obtidos por meio de citometria de fluxo. (A) 24 horas de exposição. (B) 48 horas de exposição. (C, D). O gráfico do histograma representa cada pico de emissão de fluorescência. (C) 24 horas de exposição. (D) 48 horas de exposição. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

A análise celular quantificada em % por meio de citometria de fluxo de células MB49 24 e 48 horas após o tratamento com IL-2, TRAIL e MIX de proteínas estão representados na Figura 38. Os dados apresentados foram compensados usando controles com células MB49 mortas por calor marcadas com PE e 7AAD, separadamente e com o controle de células MB49 vivas, duplamente marcadas concomitantemente. As Figuras 38.A, 38.B, 38.E e 38.F indicam que houve um aumento significativo na % de células apoptóticas iniciais e tardias. Em 24 horas, nos grupos IL-2, TRAIL e MIX, houve aumento das células apoptóticas tardias quando comparadas ao grupo C-. Nos grupos IL-2 e MIX houve um aumento significativo de células apoptóticas iniciais quando comparado ao grupo C-. Os grupos LB e SL3261 não apresentam aumento na % de células apoptóticas tardias e iniciais. Em 48 horas, ao comparar o grupo C- com os outros grupos, os grupos TRAIL e MIX apresentaram um aumento significativo na % de células apoptóticas tardias, sendo os grupos IL-2, TRAIL e MIX obtidos um aumento significativo de % de células apoptóticas iniciais. Em 38.C e 38.D, a comparação entre células apoptóticas iniciais e tardias, em 24 e 48 horas usando o número médio de células, é representada pelo gráfico de *heat map*. Este gráfico permite entender qual grupo apresentou mais células apoptóticas iniciais ou tardias, de acordo com a cor (magenta representa o mínimo e verde representa o máximo valores atingidos).

**Figura 38 - Apoptose inicial e tardia em células MB49 por citometria de fluxo**

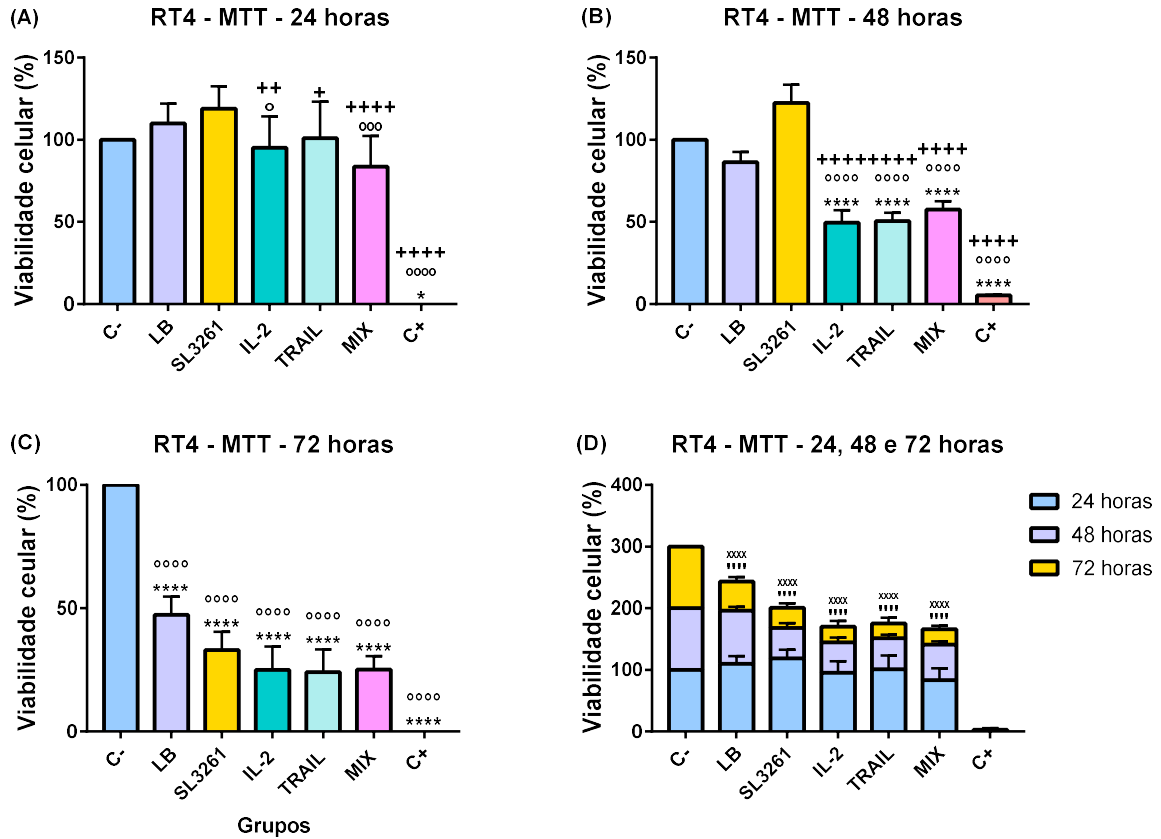


Análise quantitativa de dados. N=8. Análise celular quantificada em % de células apoptóticas iniciais e tardias em comparação com os valores quantificados no grupo C-: (A, B) 24 horas e (E, F): 48 horas. O fundo cinza representa uma diferença significativa. (C, D) Comparação entre o número médio de células e correlação entre apoptose inicial e tardia, em 24 e 48 horas respectivamente. Magenta representa baixa % da expressão de apoptose e verde representa alta % da expressão de apoptose. (\*) vs C-; \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Os resultados foram apresentados como a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3]. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

### 4.3 Ensaios *in vitro* com a linhagem celular RT4

Os dados obtidos nessa sessão geraram artigo científico (Anexo 3). A figura 39 mostra a viabilidade celular pelo método MTT em células RT4 24, 48 e 72 horas após tratamentos com IL-2, TRAIL e MIX. Em 24 e 48 horas (figuras 39.A e 39.B) há uma diminuição significativa na viabilidade celular nas células tratadas com IL-2, TRAIL e MIX. Em 72 horas (Figura 39.C) a viabilidade também diminui significativamente nos grupos LB e SL3261. A Figura 39.D mostra a viabilidade celular comparativas entre os 3 intervalos de tempo e nota-se que a viabilidade diminui com o passar do tempo.

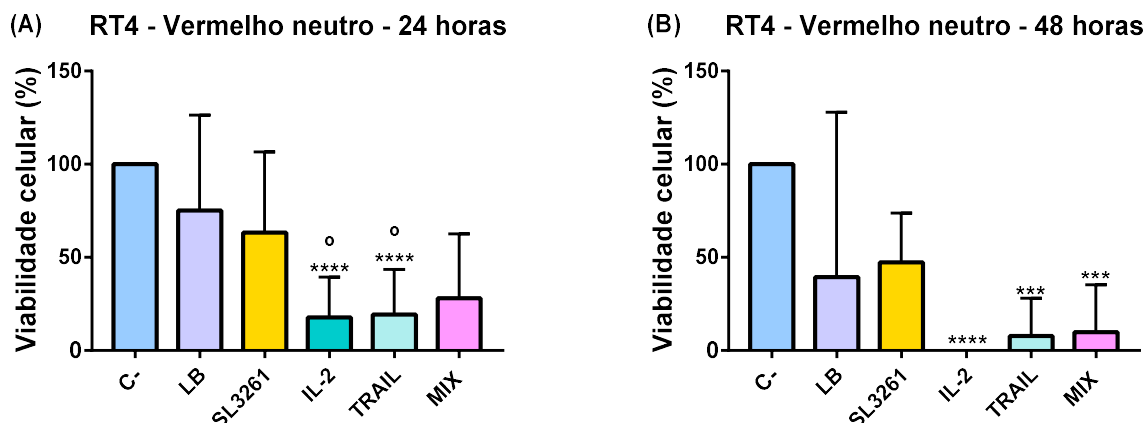
**Figura 39** – Viabilidade celular em % em células RT4 pelo ensaio com MTT



Análise quantitativa de dados. N=14. (A). Viabilidade celular em% das proteínas IL-2, TRAIL e MIX após 24 horas de exposição. (B). Viabilidade celular em% das proteínas IL-2, TRAIL e MIX após 48 horas de exposição aos tratamentos. (C). Viabilidade celular em% das proteínas IL-2, TRAIL e MIX após 72 horas de exposição aos tratamentos. (D) Viabilidade celular em % das proteínas IL-2, TRAIL e MIX após 24, 48 e 72 horas de exposição aos tratamentos. (\*) vs C<sup>-</sup>: \* p<0,05; \*\*\*\* p<0,0001. (°) vs LB: ° p<0,05; °°° p<0,001; °°°° p<0,0001. (+) vs SL3261: + p<0,05; ++ p<0,01; ++++ p<0,0001. (‘ ‘ ‘ ‘) 48 horas vs 24 horas: (‘ ‘ ‘ ‘) p<0,0001. (x) 72 horas vs 24 horas: (xxxx): p<0,0001. (^) 48 horas vs 72 horas: (^) p<0,0001. Os resultados foram apresentados com a média e o desvio padrão. Fonte: autora.

A Figura 40 mostra a viabilidade celular de células RT4 em porcentagem pelo ensaio com o corante vermelho neutro após tratamento com IL-2, TRAIL e MIX. Tanto em 24 horas (Figura 40.A) quanto em 48 horas (Figura 40.B) há diminuição significativa nos grupos tratados com IL-2, TRAIL e MIX.

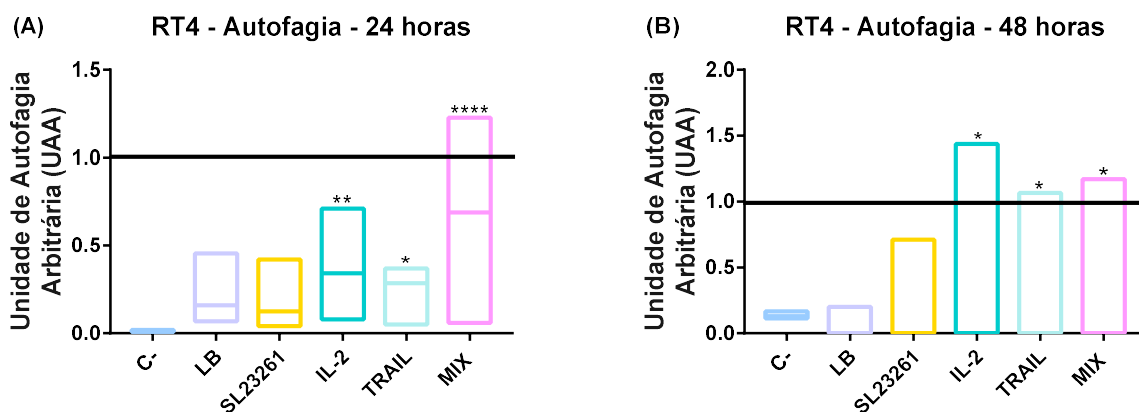
**Figura 40** – Viabilidade celular em % em células RT4 com o corante vermelho neutro



Análise quantitativa de dados. N=14. (A). Viabilidade celular em% das proteínas IL-2, TRAIL e MIX após 24 horas de exposição. (B). Viabilidade celular em% das proteínas IL-2, TRAIL e MIX após 48 horas de exposição aos tratamentos. (C). Viabilidade celular em % das proteínas IL-2, TRAIL e MIX após 24 e 48 horas de exposição aos tratamentos. (\*) vs C-: \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. (°) vs LB: ° p<0,05. Os resultados foram apresentados como a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3]. Fonte: autora.

A Figura 41 apresenta o processo de autofagia em células RT4 após 24 e 48 horas. A autofagia é positiva em valores superiores a 1. Em 24 horas (Figura 41.A), a autofagia ocorreu somente no grupo tratado com IL-2 e em 48 horas (Figura 41.B), ocorreu nos três grupos tratados.

**Figura 41** – Autofagia em células RT4

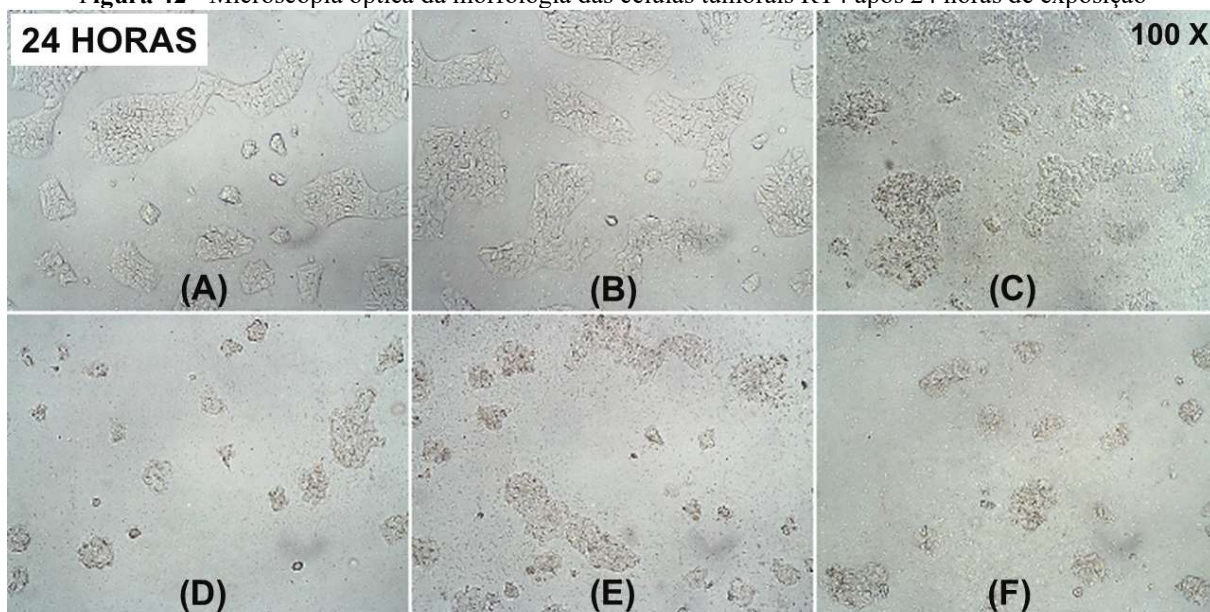


Análise quantitativa de dados. N=14. (A). Autofagia após tratamento com IL-2, TRAIL e MIX após 24 horas de exposição. (B). Autofagia após tratamento com IL-2, TRAIL e MIX após 48 horas de exposição aos tratamentos. (C). Autofagia após tratamento com IL-2, TRAIL e MIX após 24 e 48 horas de exposição. (\*) vs C-: \* p<0,05; \*\*\* p<0,01; \*\*\*\* p<0,001; \*\*\*\*\* p<0,0001. Os resultados foram apresentados como a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3]. Fonte: autora.

O efeito citotóxico das proteínas IL-2, TRAIL e MIX também foi observado em fotos de microscopia óptica de células RT4 após 24 horas (figura 42) e 48 horas (figura 43) de

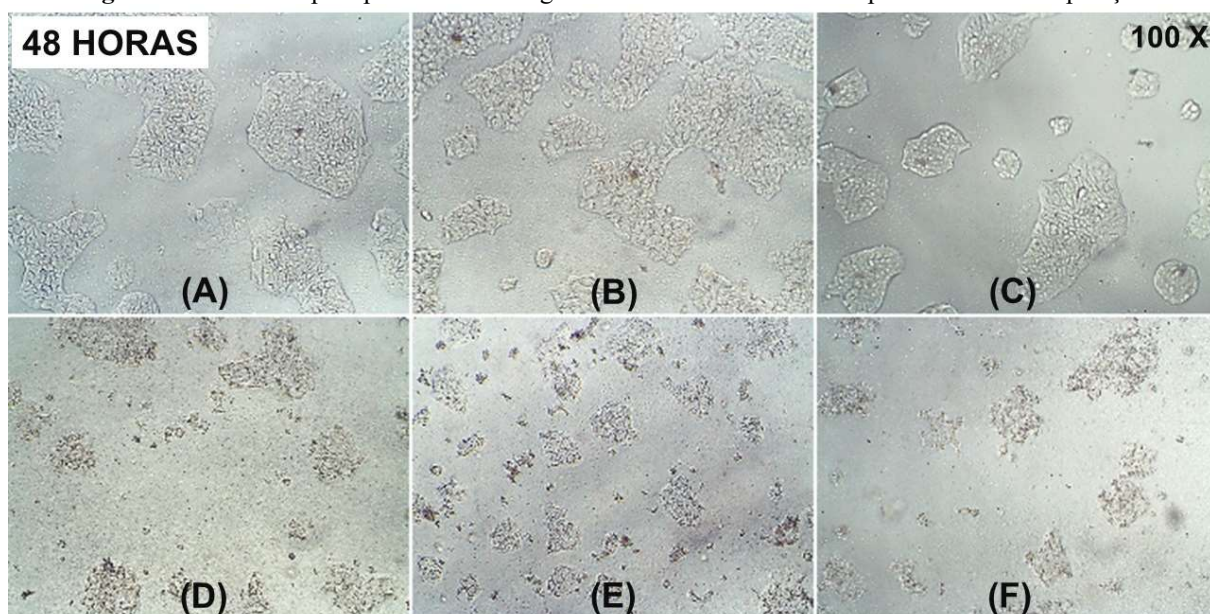
exposição. Após 24 horas, os grupos C-, LB e SL3261 apresentaram maior número de células com morfologia preservada quando comparados aos grupos tratados com IL-2, TRAIL e MIX, que além de menor número de células, apresentaram alteração na morfologia, evidenciada por corpos celulares alongados e membrana alterada. Isso foi observado em 48 horas de exposição, pois as células expostas a IL-2, TRAIL e MIX estavam em menor número e sua morfologia foi ainda mais modificada.

**Figura 42** - Microscopia óptica da morfologia das células tumorais RT4 após 24 horas de exposição



Dados representativos, análise qualitativa. Grupos: (A) C-. (B) LB. (C) SL3261. (D) IL-2. (E) TRAIL. (F) MIX. Aumento: 100 X. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

**Figura 43** - Microscopia óptica da morfologia das células tumorais RT4 após 48 horas de exposição

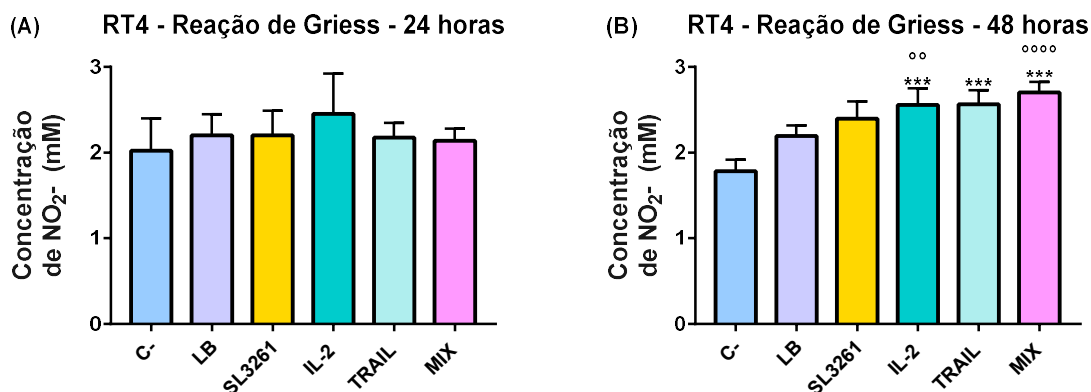


Dados representativos, análise qualitativa. Grupos: (A) C-. (B) LB. (C) SL3261. (D) IL-2. (E) TRAIL. (F) MIX. Aumento: 100 X. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.



A produção de NO foi medida pela concentração do íon  $\text{NO}_2^-$  no sobrenadante das células RT4 após exposição à IL-2, TRAIL e MIX, mostrada na figura 44. A produção de ON foi ligeiramente maior em 24 horas no grupo IL-2 (Figura 44.A). Em 48 horas houve aumento da produção de NO nos grupos IL-2, TRAIL e MIX (Figura 44.B).

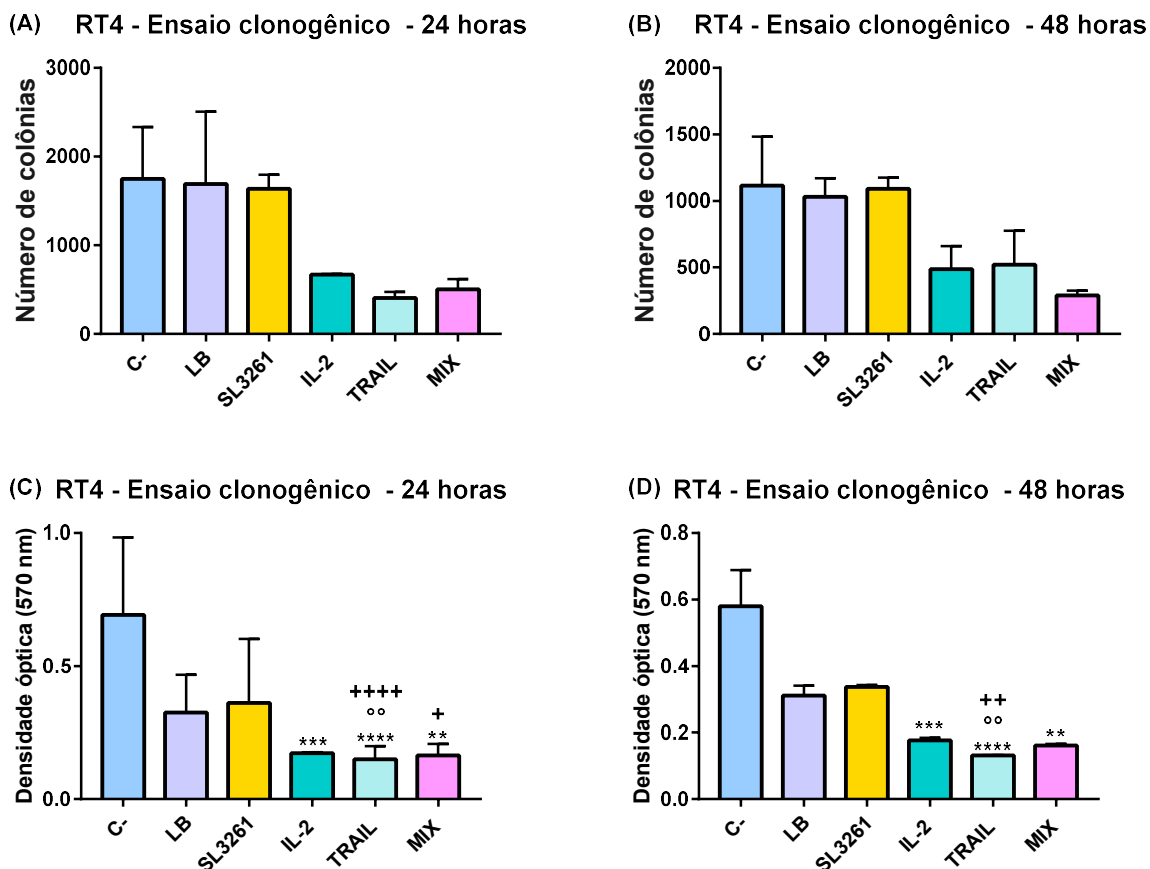
**Figura 44** – Produção de NO em células RT4 pela Reação de Griess



Análise quantitativa de dados. N=14. (A). Concentração de  $\text{NO}_2^-$  após tratamento com IL-2, TRAIL e MIX após 24 horas de exposição. (B). Concentração de  $\text{NO}_2^-$  após tratamento com IL-2, TRAIL e MIX após 48 horas de exposição aos tratamentos. (C). Concentração de  $\text{NO}_2^-$  após tratamento com IL-2, TRAIL e MIX após 24 e 48 horas de exposição. (\*) vs C<sup>-</sup>: \*\*\* p<0,00. (°) vs LB: °° p<0,01; °°°° p<0,0001. (‘) 48 horas vs 24 horas: ‘ p<0,05. Os resultados foram apresentados com a média e desvio padrão (A) e com a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3] (B). Fonte: autora.

A Figura 45 mostra a recuperação celular de RT4 ao formar colônias após um período de 7 dias de recuperação, posterior à 24 e 48 horas de exposição. Em 45.A e 45.B estão o número de colônias formadas e nota-se que nos grupos tratados com IL-2, TRAIL e MIX houve diminuição significativa no número de colônias, tanto em 24 quanto em 48 horas. Essa diminuição também ocorreu na leitura da densidade óptica na diluição das colônias em ambos os horários (Figuras 45C e 45.D).

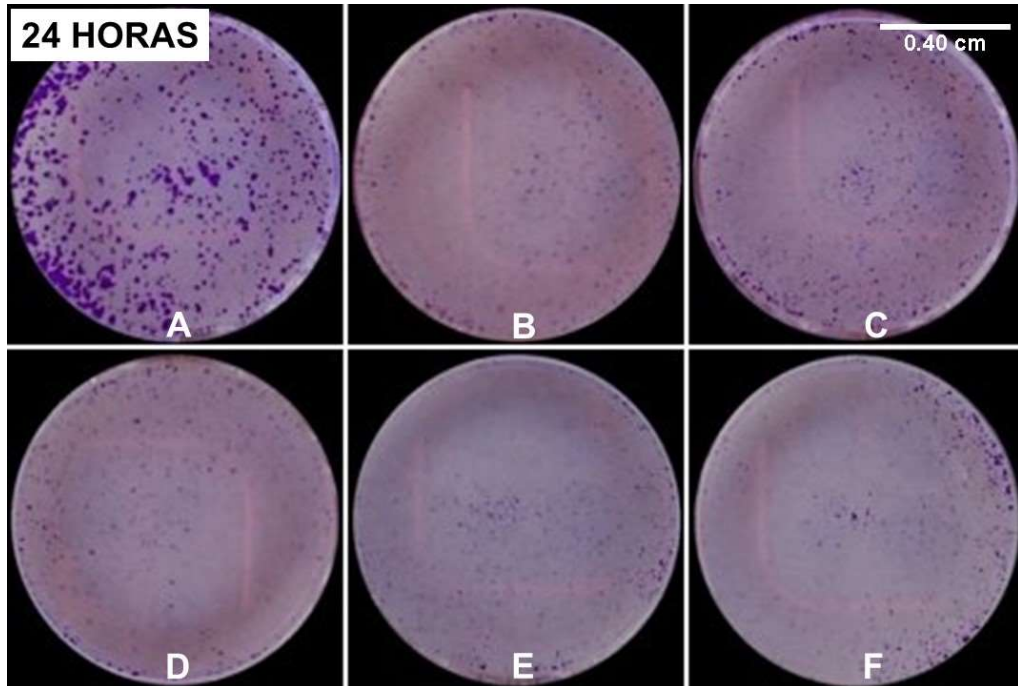
**Figura 45 - Recuperação de células RT4 por meio da formação de colônias**



Dados representativos, análise qualitativa dos dados. N=2. (C,D). Análise quantitativa de dados. N=8. (A) Após 24 horas de exposição. (B). Após 48 horas de exposição. (C) Após 24 horas de exposição. (D). Após 48 horas de exposição (\*) vs C-: \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. (°) vs LB: °° p<0,01. (+) vs SL3261: ++ p<0,01; +++++ p<0,0001. Os resultados foram apresentados como a média e desvio padrão. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

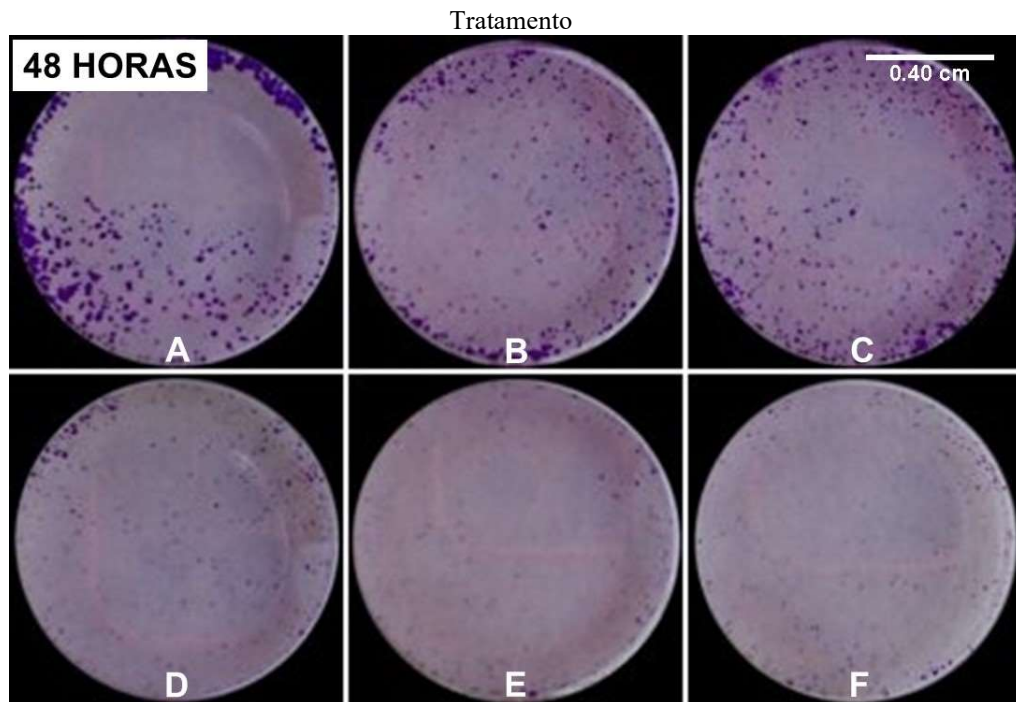
As figuras 46 e 47 são fotografias dos poços de todos os grupos do ensaio clonogênico, mostrando a recuperação das células RT4 após 7 dias da exposição às proteínas IL-2, TRAIL e MIX por 24 e 48 horas, evidenciada pela formação de colônias.

**Figura 46** – Imagens do número de colônias formadas de células RT4 após recuperação celular após 24 horas de tratamento



Dados representativos, análise qualitativa de dados. Fotografias de poços de todos os grupos mostrando colônias formadas por células tumorais MB49 após 7 dias de recuperação e. (A) C-. (B) LB. (C) SL3261. (D) IL-2. (E) TRAIL. (F) MIX. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

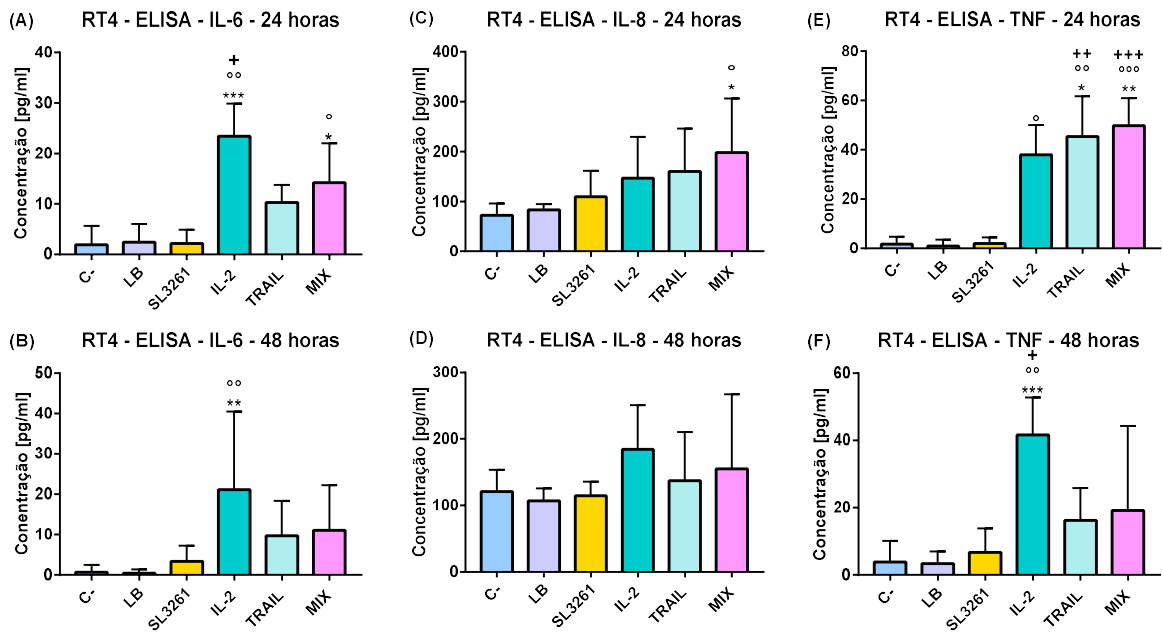
**Figura 47** – Imagens do número de colônias formadas de célula RT4 após recuperação celular após 48 horas de



Dados representativos, análise qualitativa. Fotografias de poços de todos os grupos mostrando colônias formadas por células tumorais MB49 após 7 dias de recuperação e. (A) C-. (B) LB. (C) SL3261. (D) IL-2. (E) TRAIL. (F) MIX. Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

A figura 48 mostra os níveis das citocinas IL-6, IL-8 e TNF secretadas no sobrenadante do cultivo de células RT4 em períodos de 24 e 48 horas de exposição a IL-2, TRAIL e MIX. A IL-6 apresentou maiores níveis nos 3 grupos tratados em ambos os horários (figuras 48.A e 48.B) sendo que no grupo IL-2 esse aumento foi maior e com diferença significativa. A IL-8 também teve níveis mais elevados nos 3 grupos tratados, sendo maior no MIX em 24 horas (figura 48.C) e MIX e IL-2 em 48 horas (figura 45.D). Já o TNF (figuras 48.E e 48.F) apresentou valores maiores também nos 3 grupos, mas com maior diferença significativa em 24 horas.

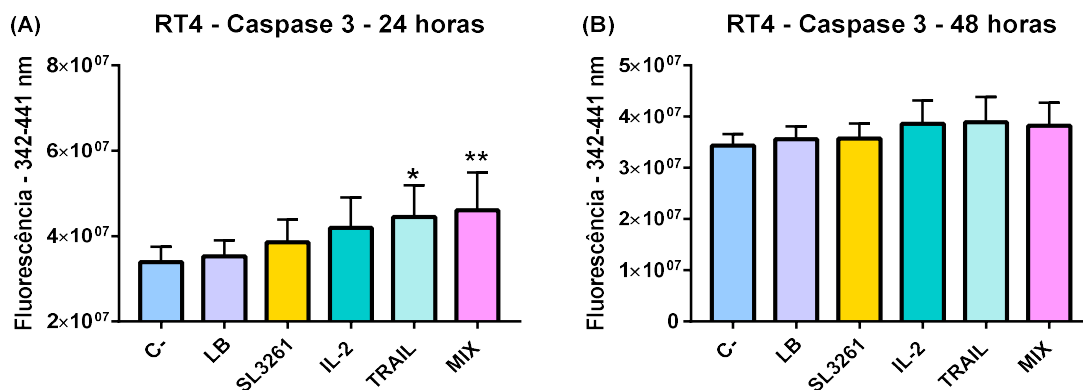
**Figura 48** – Níveis de IL-6, IL-8 e TNF secretados por célula RT4



Dados quantitativos. N= 10. (A,B) Níveis de IL-6 em pg/mL no sobrenadante do cultivo celular após 24 e 48 horas de tratamento com IL-2, TRAIL e MIX. (C,D) Níveis de IL-8 em pg/mL no sobrenadante do cultivo celular após 24 e 48 horas de tratamento com IL-2, TRAIL e MIX. (E,F) Níveis de TNF em pg/mL no sobrenadante do cultivo celular após 24 e 48 horas de tratamento com IL-2, TRAIL e MIX. (\*) vs C-: \* p<0,05; \*\* P<0,01; \*\*\* p<0,001. (°) ° p<0,05; °° p<0,01; °°° p<0,001. (+) vs SL3261: + p<0,05; ++ p<0,01; +++ p<0,001. Os dados foram apresentados com média e desvio padrão (A) e coma a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3] (B, C, D, E, F). Fonte: autora.

A figura 49 representa a análise de emissão de fluorescência para medição de Caspase 3 em células RT4 após tratamento com IL-2, TRAIL e MIX. Em 24 horas (Figura 49.A) houve aumento na emissão de fluorescência nos grupos tratados com IL-2, TRAIL e MIX, sendo significativo somente em TRAIL e MIX. Em 48 horas (Figura 49.B) houve ligeiro aumento da fluorescência nos grupos IL-2, TRAIL e MIX.

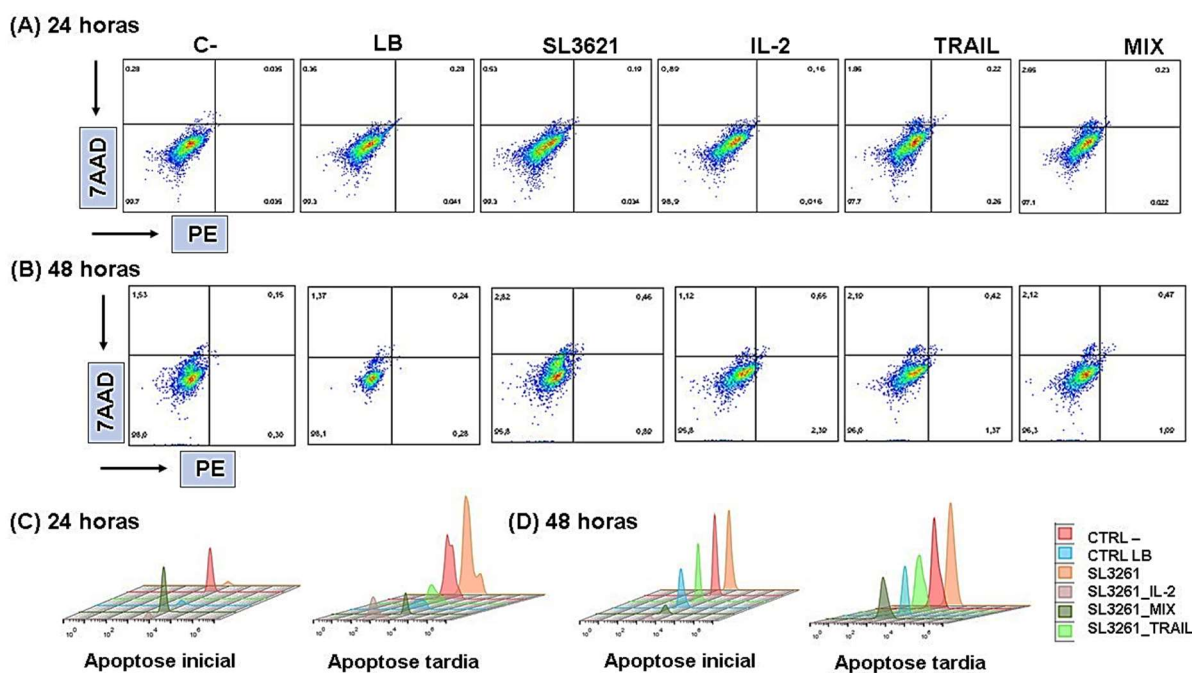
**Figura 49** – Emissão de fluorescência e dosagem de níveis de Caspase 3 em células RT4



Dados quantitativos. N=8. (A) Níveis de Caspase 3 após 24 horas de tratamento com IL-2, TRAIL e MIX. (B). Níveis de Caspase 3 após 48 horas de tratamento com IL-2, TRAIL e MIX. (\*) vs C-: \* p<0,05; \*\* p<0,01. Os resultados foram apresentados como a média e desvio padrão.

Os gráficos *dot plot* e histograma obtidos por citometria de fluxo dos grupos C-, LB, SL3261, IL-2, TRAIL e MIX em cultura de células RT4, em 24 e 48 horas, são apresentados nas figuras 50.A e 50.B. Os dados apresentados são representativos, apresentando uma única leitura de cada grupo, uma vez que o número da amostra é 8. As figuras 50.C e 50.D são representativas de histogramas que mostram os picos de emissão de fluorescência dos marcadores PE e 7AAD, de acordo com cada grupo analisado nas 24 horas e nas 48 horas de exposição. Em ambos os intervalos de tempo, os picos de emissão dos grupos IL-2, TRAIL e MIX são maiores do que os picos dos grupos C-, LB e SL3261.

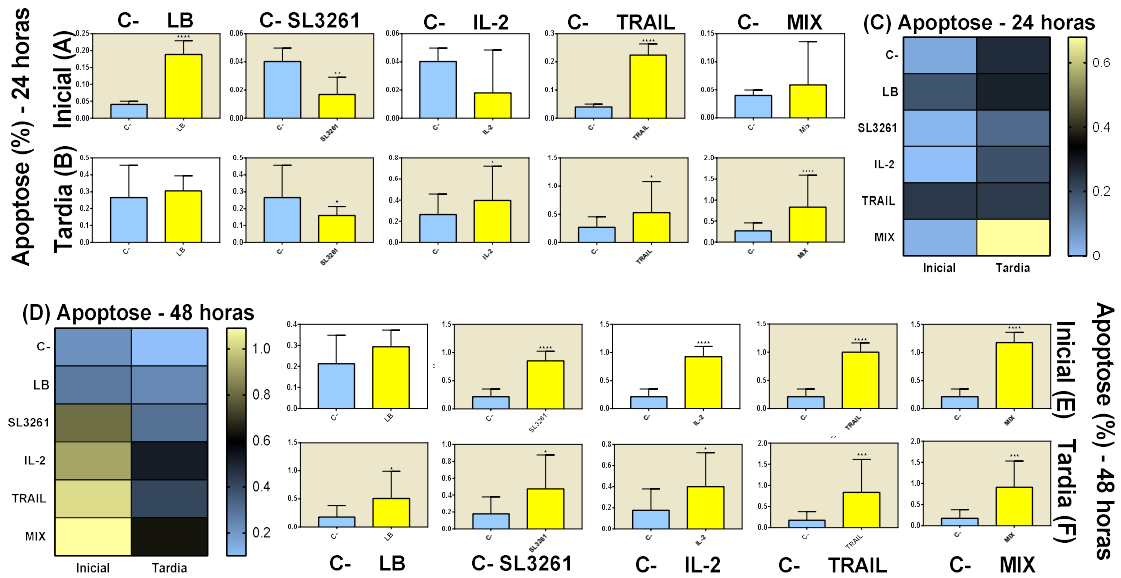
**Figura 50** - Análise representativa da apoptose inicial e tardia por citometria de fluxo em células RT4



Dados representativos, análise qualitativa. (A, B) Os gráficos *dot plot* obtidos por meio de citometria de fluxo. (A) 24 horas de exposição. (B) 48 horas de exposição. (C, D). O gráfico do histograma representa cada pico de emissão de fluorescência. (C) 24 horas de exposição. (D) 48 horas de exposição. Fonte: autora.

A análise celular quantificada em % por meio de citometria de fluxo de células RT4 nos intervalos de 24 e 48 horas após o tratamento com IL-2, TRAIL e MIX de proteínas estão representados na figura 51. Os dados apresentados foram compensados usando controles com células MB49 mortas por calor marcadas com PE e 7AAD separadamente, e com o controle de células MB49 vivas, duplamente marcadas concomitantemente. As figuras 51.A, 51.B, 51.E e 51.F indicam que houve um aumento significativo na % de células apoptóticas iniciais e tardias. Em 24 horas, nos grupos SL3261, IL-2, TRAIL e MIX, houve aumento das células apoptóticas tardias quando comparadas ao grupo C-. Nos grupos LB, SL3262 e TRAIL houve um aumento significativo de células apoptóticas iniciais quando comparado ao grupo C-. Em 48 horas, ao comparar o grupo C- com os outros grupos, todos apresentaram um aumento significativo na % de células apoptóticas tardias, sendo os grupos TRAIL e MIX obtidos um aumento significativo de % de células apoptóticas iniciais. Em 51.C e 51.D, a comparação entre células apoptóticas iniciais e tardias em 24 e 48 horas, usando o número médio de células, é representada pelo gráfico de *heat map*. Este gráfico permite entender qual grupo apresentou mais células apoptóticas iniciais ou tardias de acordo com a cor (azul representa o mínimo e amarelo representa o máximo valores atingidos).

**Figura 51 - Apoptose inicial e tardia em células RT4 por citometria de fluxo**

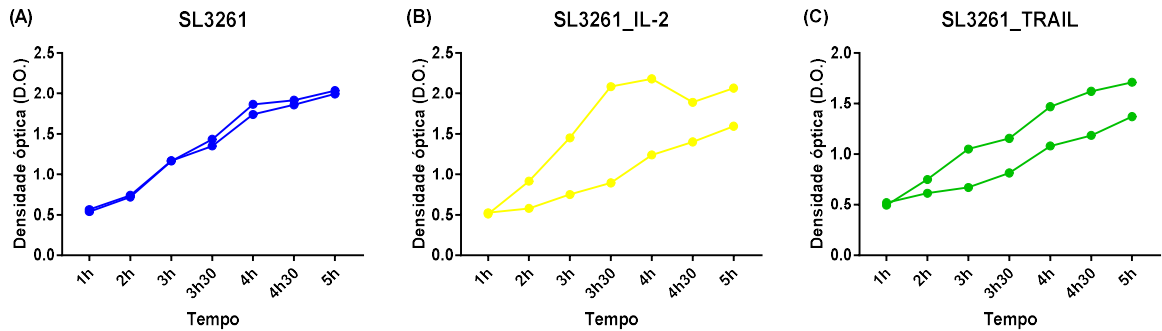


Análise quantitativa de dados. N=11. Análise celular quantificada em % de células apoptóticas iniciais e tardias em comparação com os valores quantificados no grupo C-: (A,B) 24 horas e (E,F): 48 horas. O fundo cinza representa uma diferença significativa. (C,D) Comparação entre o número médio de células e correlação entre apoptose inicial e tardia, em 24 e 48 horas respectivamente. Azul representa baixa % da expressão de apoptose e amarelo representa alta % da expressão de apoptose. (\*) vs C-; \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001; \*\*\*\* p <0,0001. Os resultados foram apresentados com média e desvio padrão (A,E) e como a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3] B,F). Fonte: Adaptado de (DE LIMA FRAGELLI et al., 2021). Dados já publicados.

#### 4.4 Ensaio *in vivo* com camundongos da linhagem C57BL/6

Os dados obtidos nessa sessão geraram artigo científico (Anexo 4). As curvas de calibração entre D.O. e tempo dos cultivos celulares para estabelecer o crescimento das 3 linhagens são mostrados na figura 52. Para os experimentos *in vivo* foram realizados cultivos de 4 horas, quando a quantidade de unidades formadoras de colônia é de cerca de  $2 \times 10^9$  por mililitro de cultivo (UFC/mL). Nas condições estudadas, as células apresentaram uma fase *lag* de média duração e cresceram exponencialmente até atingirem  $DO_{600nm}$  de aproximadamente 1.

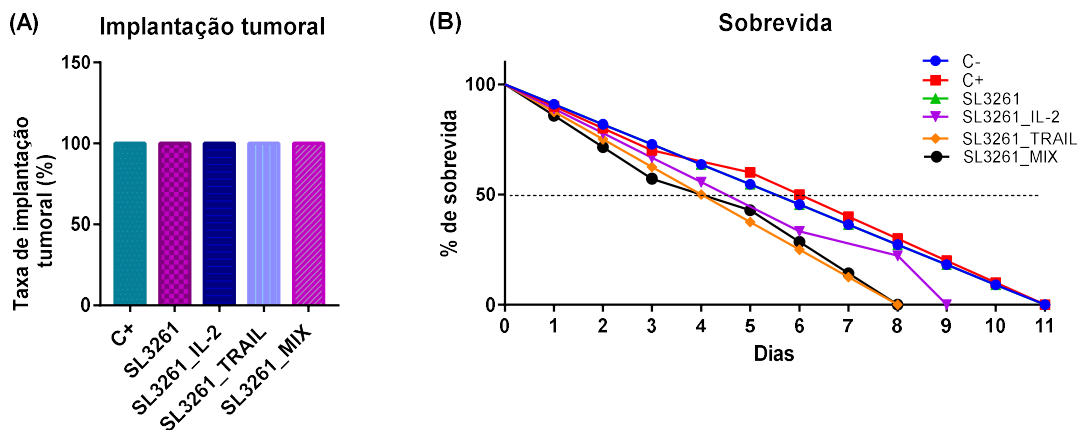
**Figura 52** – Curvas de crescimento das linhagens SL3261, SL3261\_IL-2 e SL3161\_TRAIL



Análise qualitativa de dados. N=2. Densidade óptica de cada linhagem a cada intervalo de tempo. (A) Curva de crescimento da linhagem SL3261. (B) Curva de crescimento da linhagem SL3261\_IL-2. (C) Curva de crescimento da linhagem SL3261\_TRAIL. Fonte: autora.

A figura 53.A mostra a taxa de implantação tumoral que foi de 100% em todos os grupos. A figura 53.B mostra a taxa de sobrevivência (%) dos animais. Nota-se que animais morreram primeiramente nos grupos tratados com SL3261\_TRAIL e SL3261\_MIX, seguido por morte em SL3261\_IL-2, C+ e nenhuma morte no C- e SL3261, evidenciado pela sobreposição das curvas.

**Figura 53** – Implantação tumoral e sobrevivência dos animais C57BL/6



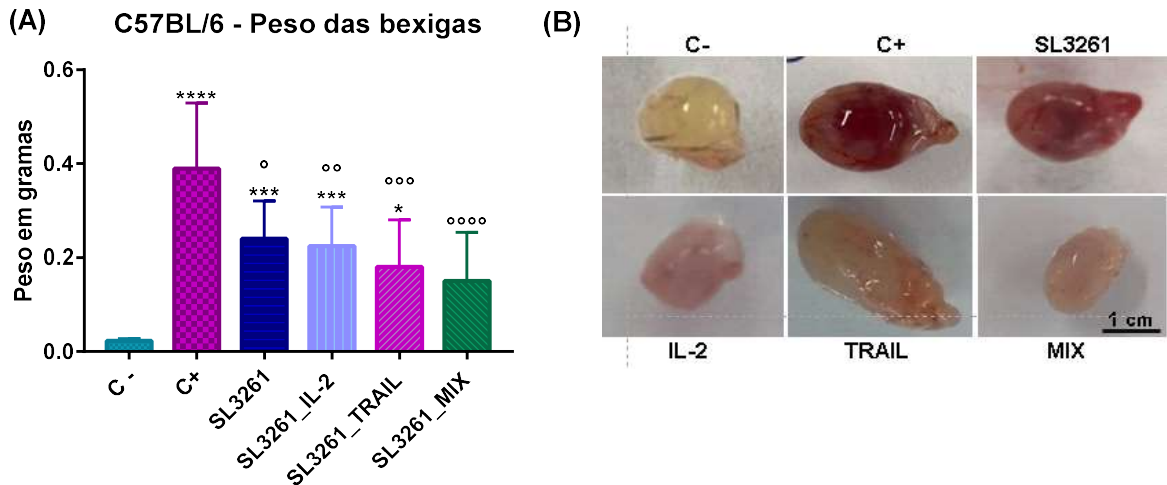
A implantação tumoral foi de 100%. Ocorreu morte de animais somente nos grupos tratados com SL3261\_IL-2, SL3261\_TRAIL e SL3261\_MIX. Análise quantitativa dos dados. (A) Taxa de implantação tumoral. (B) Taxa de sobrevivência. Fonte: autora.

A figura 54 mostra o peso das bexigas dos animais C57BL/6. Em 54.A estão os dados de todos os animais mostrando que houve implantação do tumor ao comparar com o grupo C- e que os tratamentos com as 3 linhagens bacterianas são eficazes na redução do tumor. A figura 54.B é uma imagem como fotografias de bexigas de todos os grupos. As bexigas dos animais



tratados com SL3261\_IL-2, SL3261\_TRAIL e SL3261\_MIX apresentaram, além de menor peso, um aspecto melhor com tamanho reduzido e coloração semelhante ao C-. O grupo MIX apresentou a maior regressão tumoral, em que as bexigas apresentaram tamanho igual ou inferior ao grupo C-.

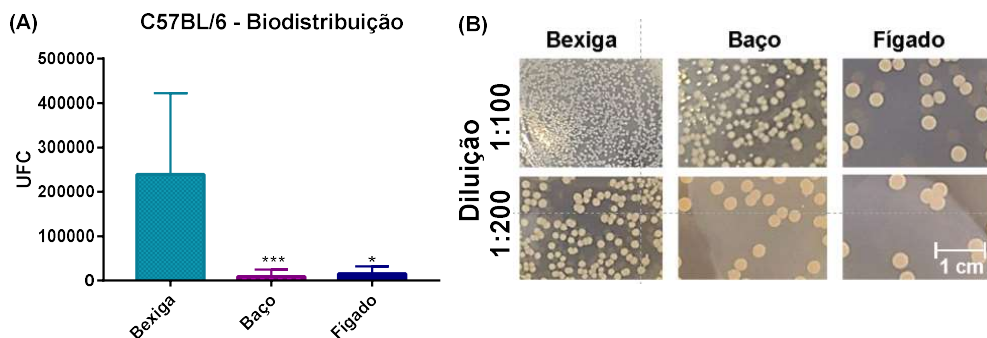
**Figura 54** – Peso das bexigas de camundongos C57BL/6



Análise quantitativa dos dados. N=9-11. (A) Peso em grammas das bexigas dos animais dos grupos C-, C+ e tratamento com SL3261, SL3261\_IL-2, SL3261\_TRAIL e SL3261\_MIX. (B) Fotografia da bexiga de um animal por grupo. (\*) vs C-: \* p<0,05; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. (°) vs C+: ° p<0,05; °° p<0,01; °°° p<0,001; °°°° p<0,0001. Os resultados foram apresentados como a média e desvio padrão. Fonte: autora.

A figura 55 representa a acumulação das 3 linhagens no microambiente tumoral analisada por meio da contagem de unidades formadoras de colônias no tumor, baço e fígado dos animais (figura 55.A). Fotografia das placas de cultivo oriundas da maceração dos órgãos em 2 diluições, 100 e 200 vezes. Observa-se que a acumulação de *S. Typhimurium* é preferencial no tumor (bexiga) do que nos órgãos naturalmente colonizados (fígado e baço).

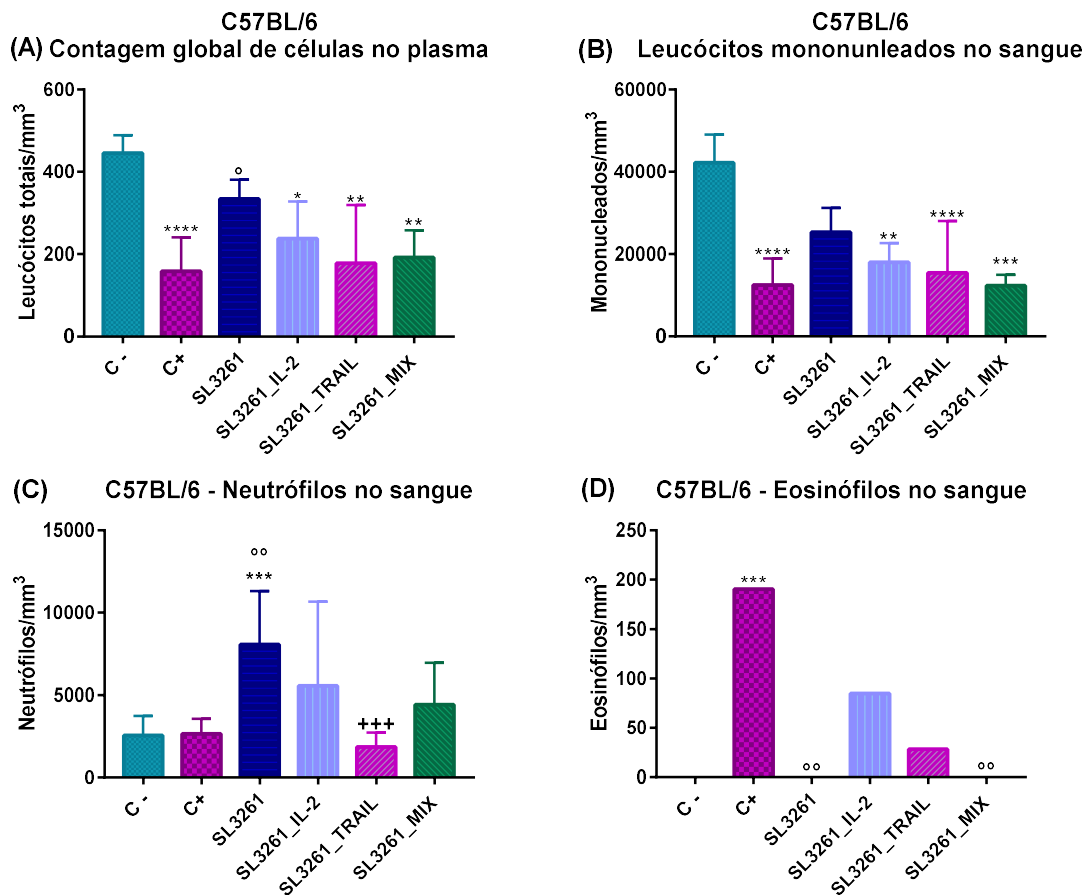
**Figura 55** – Biodistribuição das linhagens bacterianas na bexiga, fígado e baço de camundongos C57BL/6



Análise quantitativa dos dados. N=12. (A) Biodistribuição das 3 linhagens bacterianas no ambiente tumoral. (B) Fotografia das placas de cultivo mostrando a quantidade de colônias. (\*) vs Bexiga: \* p<0,05; \*\*\* p<0,001. Os resultados foram apresentados como a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3]. Fonte: autora.

A figura 56 mostra o perfil celular no plasma e sangue dos animais. Em 56.A há a contagem global de células no plasma. Nota-se que os animais saudáveis, grupo C-, apresentam maior número de células. Já os animais com câncer e sem tratamento, grupo C+, o número de células é acentuadamente menor quando comparado ao grupo C-. Os demais grupos tratados também apresentam número de células menor que o C-, mas maior que o C+. Na figura 56.B estão a quantidade de leucócitos mononucleados (linfócitos, mastócitos, monócitos e basófilos) no sangue. O número de células é maior em C-, menor em C+ e intermediário nos grupos tratados. Em 56.C há o número de neutrófilos no sangue. Nos grupos tratados com SL3261, SL3261\_IL-2 e SL3261\_MIX há aumento no número de neutrófilos, o que não é observado com grupo tratado com SL3261\_TRAIL. Já em 56.D há o número de eosinófilos no sangue é expressivamente maior no C+ e ligeiramente presente em SL3261\_IL-2 e SL3261\_TRAIL.

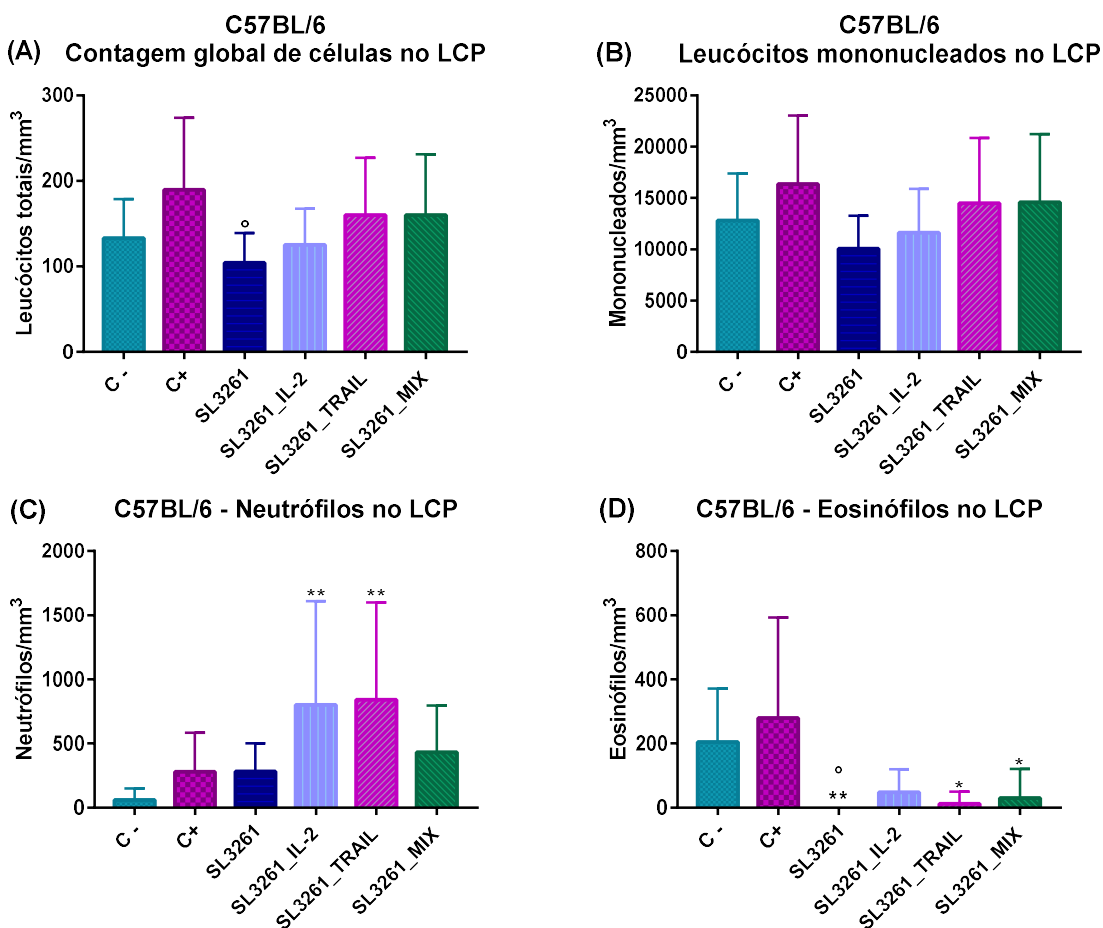
**Figura 56** – Perfil celular no plasma e sangue dos animais C57BL/6



Análise quantitativa dos dados. N= 9-12. (A) Leucócitos totais no plasma. (B) Leucócitos mononucleados no sangue. (C) Neutrófilos no sangue. (D) Eosinófilos no sangue. (\*) vs C-; \*\*\* p<0,001. (°) vs LB; °° p<0,01. (+) vs SL3261+++ p<0,001. Os resultados foram apresentados como a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3]. Fonte: autora.

A figura 57 mostra o perfil celular no LCP dos animais. Em 57.A há a contagem global de células no LCP. Nota-se que os animais saudáveis, grupo C-, apresentam menor número de células quando comparado aos animais com câncer e sem tratamento, grupo C+, o número de células é acentuadamente menor quando comparado ao grupo C-, assim como os demais grupos tratados. Na figura 57.B estão a quantidade de leucócitos mononucleados no LCP. O número de células é menor em C-, maior em C+, intermediário nos grupos tratados com SL3261\_TRAIL e SL3261\_MIX e menor nos tratados com SL3261 e SL3261\_IL-2. Em 57.C há o número de neutrófilos no LCP. Nos grupos tratados com SL3261, IL-2 e SL3261\_TRAIL há aumento no número de neutrófilos. Já em 57.D há o número de eosinófilos no sangue é expressivamente maior nos controles.

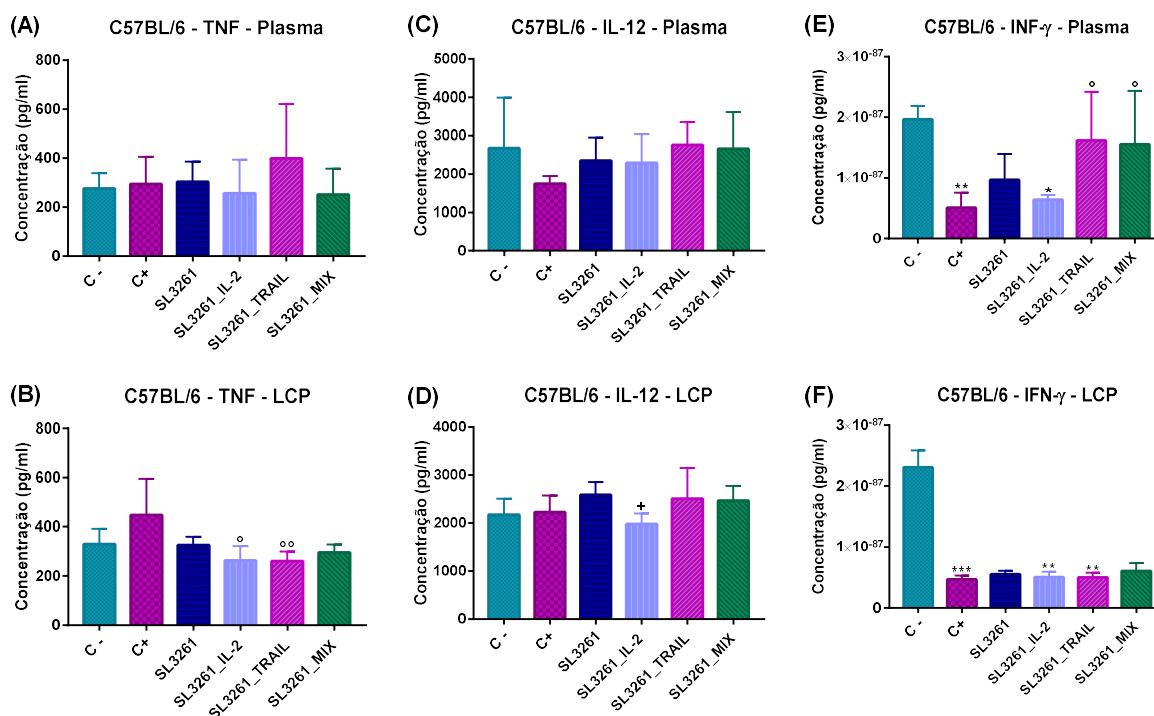
**Figura 57** – Perfil celular no LCP dos animais C57BL/6



Análise quantitativa dos dados. N= 9-12. (A) Leucócitos totais no LCP. (B) Leucócitos mononucleados no LCP. (C) Neutrófilos no LCP. (D) Eosinófilos no LCP. (\*) vs C-: \* p<0,05; \*\* p<0,01. (°) vs LB: ° p<0,05. Os resultados foram apresentados com a média e desvio padrão (A, B) e como a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3] (C, D). Fonte: autora.

A figura 58 mostra a dosagem de citocinas TNF, IL-12 e IFN- $\gamma$  no plasma e no LCP dos animais C57BL/6. Em 58.A e 58.B estão os níveis de TNF no plasma e no LCP. Observa-se que há um aumento ligeiro no grupo tratado com SL3261\_TRAIL no plasma e no C+ no LCP e diminuição significativa nos grupos tratados no LCP. Nas figuras 58.C e 58.D estão os níveis de IL-12 no plasma e no LCP. No plasma há uma ligeira diminuição na concentração no grupo C+. No LCP essa diminuição ocorreu em SL3261\_IL-2. Em E e F há a dosagem de IFN- $\gamma$  no plasma e no LCP. No plasma há aumento significativo nos grupos tratados com SL3261\_TRAIL e MIX. Já no LCP houve aumento somente no grupo C-.

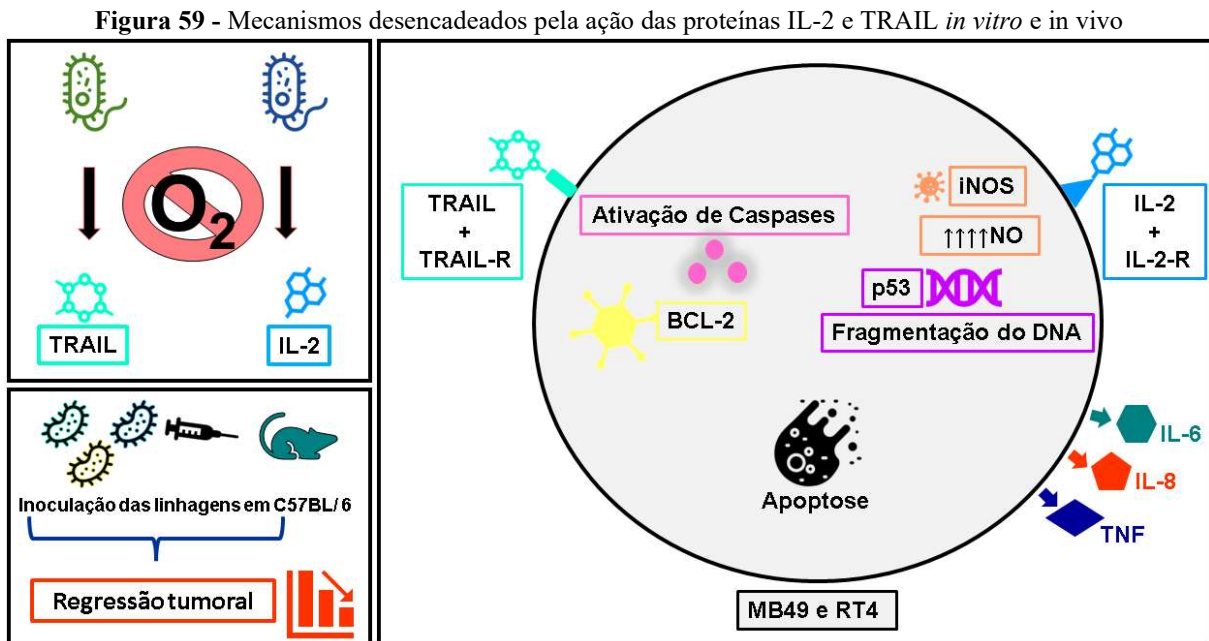
**Figura 58** – Dosagem dos níveis das citocinas TNF, IL-12 e IFN- $\gamma$  no plasma e no LCP dos animais C57BL/6



Análise quantitativa dos dados e individual. N= 8. (A, B) Níveis de TNF no plasma e no LCP. (C, D) Níveis de IL-12 no plasma e no LCP. (E, F) Níveis de IFN- $\gamma$  no plasma e no LCP. (\*) vs C-: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001. (°) vs C+: ° p<0,05; °° p<0,01. (+) vs SL3261: + p<0,05. Os resultados foram apresentados com a média e desvio padrão (D) e como a mediana com os quartis superior e inferior: Me [Q1; Q3] (A, B, C, E, F). Fonte: autora.

Um esquema reduzido e representativo da ação das proteínas IL-2 e TRAIL nas células MB49 e RT4 é mostrado na figura 59. A proteína TRAIL encontra seu receptor TRAIL-R na superfície da célula MB49 e da RT4, que gera um sinal para a célula sintetizar mais moléculas de TRAIL. Como consequência dessa amplificação do sinal, as proteínas das Caspases são ativadas. A IL-2 também encontra seu receptor, o IL-2R, na superfície das células. Uma vez que isso acontece, ocorre a ativação da enzima iNOS, o que leva à produção de NO.

Conseqüentemente, ocorre diminuição da respiração celular, fragmentação do DNA, aumento da transcrição do gene p53. Os dois processos levam as células ao processo de apoptose, causando também danos à membrana celular, nas mitocôndrias e nos lisossomos e síntese de proteínas inflamatórias. Nos animais ocorre redução do tamanho do tumor e estimulação do sistema imunológico para tentar combater a progressão da doença.



(A) Através da anaerobiose ocorre síntese e liberação das proteínas IL-2 e TRAIL pelas linhagens SL3161\_IL-2 e SL3262\_TRAIL, respectivamente. (B). IL-2 e TRAIL ligam-se aos seus receptores nas células. A IL-2 ativa o iNOS, que aumenta a produção de NO, gerando danos às células, e o TRAIL ativa as caspases, o que leva à apoptose. (C) Nos camundongos ocorre modulação do sistema imune e regressão tumoral. Fonte: autora.

#### 4. DISCUSSÃO

Este estudo foi elaborado para identificar os efeitos antitumorais de IL-2, TRAIL e o MIX das proteínas expressas e secretadas pela linhagem SL3261 de *S. Typhimurium* atenuada. O impacto nas vias de apoptose e estresse oxidativo contra células tumorais de bexiga murina MB49 e humana RT4 nos intervalos de exposição de 24 e 48 horas foi analisado, além do efeito antitumoral em camundongos fêmea C57BL/6. o objetivo de explorar e desvendar as melhores intervenções no câncer de bexiga, a linhagem celular MB49 tem sido amplamente utilizada, uma vez que foi desenvolvida a partir de um tumor induzido com o composto 7,12-dimetilbenz (a) antraceno (DMBA) no epitélio da bexiga de camundongos C57BL/6 machos. O modelo de indução utilizando a linhagem celular MB49 para estudos de carcinoma de bexiga é considerado o mais semelhante ao câncer humano, devido aos marcadores de superfície celular, perfil imunológico e sensibilidade à apoptose (LOSKOG et al., 2005). A célula RT4, câncer de bexiga humano, é indicada para pesquisa imuno-oncológica. É de origem epitelial e foi isolada, ná

década de 1980, do tecido da bexiga urinária de um paciente do sexo masculino de 63 anos, branco, com papiloma de células de transição (ATCC, 2022). O microambiente tumoral consiste em células malignas e não malignas em que as células cancerosas agregam células saudáveis para ajudá-las a proliferar. É cada vez mais claro que a interação de compartimentos celulares afeta a progressão do câncer e a resposta à terapia. Portanto, os modelos pré-clínicos atuais, como os testes em linhagens celulares humanas, incorporam esses compartimentos e permitem a investigação de contribuições dependentes do tipo de célula específica para a progressão do câncer (TRAN et al., 2021).

A cepa *S. Typhimurium*, SL3261, utilizada neste estudo apresenta atenuação do gene *aroA* que leva ao bloqueio de via de síntese de moléculas aromáticas e prejudica a reprodução. Interferir em qualquer etapa dessa via torna a bactéria auxotrófica a dois componentes não disponíveis no tecido de vertebrados, impactando em sua patogenicidade (FELGNER et al., 2016; OXER et al., 1991; RUBY et al., 2012), o que faz com que essa atenuação seja segura. A linhagem SL3261 já é aplicada em diversos modelos tumorais (ARGORIO et al., 2007; JIANXIN et al., 2013; LIN et al., 2012; SALTZMAN et al., 2018; ZHU et al., 2010), assim como IL-2 e TRAIL (AL-RAMADI et al., 2008; GANAI et al., 2009). Mas a ação conjunta das duas proteínas não é conhecida. O trabalho de Camillo (2019) mostra através dos ensaios ELISA, *Western blot* e eletroforese a construção das linhagens e a expressão de IL-2 e TRAIL. O promotor utilizado, o *nirB*, é considerado eficaz quando aplicado em vetores vivos, pois é induzido em condições de anaerobiose e sua aplicação é demonstrada em bactérias anaeróbias facultativas, além de ser estável e está sendo estudado no tratamento antitumoral por *Salmonella* e gera indução da secreção de inúmeros imunógenos no sorovar *Typhimurium* em anaerobiose ou em células eucarióticas (CHEN et al., 2012, HUANG; HAJISHENGALLIS; MICHALEK, 2000).

Os dados obtidos neste estudo mostram que houve maiores valores de emissão de fluorescência e detecção de anticorpos ao analisar o sobrenadante do cultivo bacteriano pelas 2 linhagens, SL3261\_IL-2 e SL3261\_TRAIL, confirmando a expressão heteróloga das proteínas IL-2 e TRAIL, além de confirmar sua secreção no meio. Em pesquisas com modelo tumoral, tanto com IL-2 (BARNETT et al., 2005) quanto com TRAIL essa abordagem é corriqueira (BARNETT et al., 2005) KIM et al., 2012). A proteína EmGFP e seus derivados (YFP) não causam danos biológicos aparentes e não exigem cofatores e/ou substratos (ZHAO et al., 2004). A construção que utiliza marcadores fluorescentes é vantajosa porque facilita o processo de aquisição de imagens de modo não invasivo, pois não há a necessidade de eutanasiar o animal

e o uso de microscopia e citometria é aplicado (CRONIN et al., 2012). Outro fator importante é que IL-2 e TRAIL usados no presente estudo são murinos e apresentam homologia com as proteínas humanas, com reatividade cruzada e geram, de maneira eficiente, a proliferação celular (MOSMANN; COFFMAN, 1987), mostrando que a abordagem escolhida é segura e apresenta citotoxicidade importante.

A ação da IL-2 *in vitro* inicia-se quando a proteína encontra seu receptor na membrana (IL-2R) das células (MURAKAMI, 2004), o qual está presente em células tumorais (POLLOCK et al., 1995). Essa ligação, IL-2 e receptor, gera um sinal de ativação da enzima óxido nítrico sintase (iNOS - isorforma induzível) que catalisa a síntese de NO a partir do aminoácido L-arginina (LALSAMTHARA et al., 2018). O NO é uma molécula altamente reativa, pois é um radical livre com um elétron não emparelhado (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Como consequência da ação do NO, há suprimento da respiração celular e da síntese de DNA, fragmentação de DNA, modulação pró-apoptótica, via de ativação de proteases da família das caspases, elevação de expressão do gene p53, relacionada ao ciclo celular e supressão tumoral (MAY; MAY, 2000) e alteração nos processos associados à apoptose (SHEETAL KORDE CHOUDHARI et al., 2013).

Já o TRAIL induz morte celular por apoptose e ocorre quando este encontra seu receptor (TRAIL-R1 ou TRAIL-R2) na membrana da célula que, mediadas por receptores de TNF, ativam cascatas de transdução de sinal apoptótico pela ativação de caspases. Essa é a ativação extrínseca da apoptose (JOHNSTONE; FREW; SMYTH, 2008; MACFARLANE, 2003). A via intrínseca da apoptose é ativada pela sinalização intracelular das mitocôndrias. As mitocôndrias são reguladas por proteínas da família BCL-2 pré-apoptóticas e antiapoptóticas e desempenham papéis importantes na quimioterapia e na morte celular induzida por radiação (JOHNSTONE; FREW; SMYTH, 2008).

Ao analisar a viabilidade celular gerada por um efeito citotóxico via ensaio de MTT de IL-2, TRAIL e o MIX de proteínas em contato com a célula MB49 notou-se que esse efeito ocorreu nos períodos de 24 e 48 horas e com diferença entre os grupos tratados e os grupos controle. As células RT4 também sofreram perda da viabilidade celular demonstradas pelos ensaios com MTT e com o VN. O tempo de exposição de 72 horas foi descartado para as demais análises pois, por se tratar de células tumorais, estas apresentam crescimento acelerado e nesse intervalo de tempo as células encontram-se debilitadas, já que o tamanho do poço não permite que se desenvolvam mais e o meio de cultivo é insuficiente. Essa perda da viabilidade celular também foi corroborada pelas imagens de morfologia celular em ambos os tipos celulares.

Existem diversos estudos com células tumorais que demonstraram a ação citotóxica da terapia proposta com TRAIL utilizando a técnica MTT, incluindo um estudo com 3 cepas de câncer de bexiga humana (CAO et al., 2010; QIU et al., 2013; RASHEDUZZAMAN; JEONG; PARK, 2018; XU et al., 2018). Estudos demonstraram que a IL-2 tem a capacidade de diminuir a viabilidade celular em células SKOV3 (câncer de ovário humano) e HepG2 (câncer de fígado humano) (DING; SUN; CHEN, 2018; LIU et al., 2016) pelo método MTT. Já o TRAIL também apresentou perda da viabilidade celular em diferentes células de câncer hepáticas (ep3b, PLC, HepG2, HCT116-Bax/ e HCT116-Bax/) também pela técnica com MTT (KOSCHNY et al., 2007). Estudos também sugerem que vários recombinantes de IL-2 humana podem aumentar a atividade antitumoral (JU et al., 1987; LIU et al., 2010; ROSENBERG, 2007; SHANAFELT et al., 2000). A mesma perda de viabilidade celular também foi observada com o método utilizando o corante VN em células RT4. Também pelo ensaio com VN, um estudo demonstrou que TRAIL diminuiu a viabilidade celular em linhagens celulares tumorais de pulmão (L-132) (MEHDI et al., 2019).

A autofagia é um processo natural em que ocorre renovação do conteúdo citoplasmático das células (YANG; KLIONSKY, 2010) e pode ser ativada por estresse causado pelo ambiente, como a fome, infecções ou pela própria célula, como toxinas, quimioterapia e estímulo do sistema imunológico (YANG; KLIONSKY, 2010). Dependendo desse estímulo, a autofagia pode matar a célula ou levar à sobrevivência da mesma, tanto em células saudáveis quanto tumorais (SHARMA; ALMASAN, 2018). Além disso, há uma forte correlação entre autofagia e apoptose, uma vez que seus mecanismos de ativação estão associados (SHARMA; ALMASAN, 2018). As proteínas IL-2, TRAIL e MIX testados nesse estudo em células RT4 geraram autofagia, como resposta à ação citotóxica das proteínas. O TRAIL é um ativador de autofagia, como relatado em diversos estudos e tem efeito cruzado entre autofagia e apoptose (SHARMA; ALMASAN, 2018), o que corrobora os dados obtidos no presente estudo. Estudos demonstraram que a IL-2 promove autofagia em células tumorais de camundongos, linhagem MC38 de carcinoma colorretal, e Panc-2 de adenocarcinoma associadas a cloroquina, promovendo morte celular dos tumores e sobrevivência dos animais (LIANG et al., 2012).

Ao dosar os níveis de NO é possível mensurar parcialmente os efeitos da IL-2 *in vitro*, já que essa molécula tem características antitumorais e antiangiogênicas (HOLZER, 1997). Do aminoácido L-arginina é sintetizado o NO via enzima iNOS. A produção excessiva e descontrolada de NO resulta em danos permanentes à célula, pois trata-se de uma molécula com alto poder reativo (LALSAMTHARA et al., 2018). No caso da terapia com TRAIL nas



células analisadas, foi observada a síntese de NO, o que pode ter causado a morte celular por apoptose. A alta produção de NO nos grupos tratados com IL-2 e MIX tanto em MB49 quanto em RT4 observadas no presente estudo, pode ocorrer devido à presença de IL-2R (receptor de IL-2) em células tumorais (MURAKAMI, 2004) e a ligação com IL-2 recombinante levou a ativação de iNOS, tipicamente presente neste tipo de célula (POLLOCK et al., 1995). A ativação pode ser decorrente também da resposta a estímulos como trauma, radiação, infecção, ozônio e processo inflamatório (FÖRSTERMANN et al., 1995).

Como todos esses processos citados até agora dependem de sinalização, foi investigado a síntese de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-8 e TNF na linhagem celular RT4. A IL-6 é uma citocina inflamatória potente sintetizada por linfócitos T e macrófagos e atua no combate à infecções bacterianas e a traumas, como queimaduras (VAN DER POLL et al., 1997). Tem efeito na diferenciação de linfócitos, proliferação e sobrevivência celular, além de potencializar sinais apoptóticos (KAMIMURA; ISHIHARA; HIRANO, 2003; SMITH; KELLER, 2001). No câncer essa proteína está presente em altos níveis, como nos casos de câncer de mama (KOZŁOWSKI et al., 2003) e de próstata (VAN DER POLL et al., 1997). Os dados obtidos nesse estudo mostram que as células tratadas com IL-2, TRAIL e MIX apresentaram maior secreção de IL-6 quando comparado aos demais grupos, o que sugere que os tratamentos podem estar relacionados a ativação do processo de apoptose. Já a IL-8 é produzida por linfócitos T, células dendríticas e macrófagos em resposta a infecções intracelulares e quimiotaxia para ativação de neutrófilos (BICKEL, 1993; ZHANG; CHEN, 2010). A IL-8 é um promissor biomarcador para o câncer e vem sendo estudada para o diagnóstico da doença (SHAHZAD et al., 2010). No câncer, a IL-8 é secretada pelas células tumorais e por outras células presentes no microambiente tumoral como macrófagos, neutrófilos e linfócitos e é responsável pela angiogênese tumoral e metástase (HARADA et al., 1994; KOCH et al., 1992; WAUGH; WILSON, 2008). Nos dados obtidos nesse estudo houve aumento de níveis IL-8 somente em 24 horas no tratamento com MIX, o que sugere que a angiogênese foi controlada por IL-2 e TRAIL. O TNF é uma citocina também inflamatória responsável por combater tumores via necrose, sintetizada principalmente por macrófagos (WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2003). Dependendo do estado da célula, pode induzir vários efeitos como apoptose, necrose, angiogênese, ativação de células imunes, diferenciação e migração celular. Esses processos são muito importantes no monitoramento imunológico do tumor e também desempenham um papel importante no desenvolvimento e progressão do tumor. Portanto, não é surpreendente que o TNF tenha um efeito pró-canceroso e anticancerígeno dependente do

contexto (WAJANT, 2009). Nos dados obtidos no presente estudo houve aumento de TNF nos grupos tratados com IL-2, TRAIL e MIX, mostrando que no modelo de estudo o TNF pode contribuir nos processos envolvidos com morte celular.

De acordo com PENG et al., 2016, foi demonstrada a capacidade de três tipos de câncer de bexiga murino (MB49) e humano (T24 e UMUC3) de se recuperar e formar colônias pelo ensaio clonogênico. Os dados do presente estudo mostraram que ambas as células, MB49 e RT4, apresentaram menor número de formação de colônias, ou seja, menor recuperação em 24 e 48 horas quando tratadas com as proteínas IL-2, TRAIL e MIX. Como os tratamentos levam à formação de células apoptóticas, estas perdem a capacidade de respiração celular e apresentam perda e fragmentação do DNA (SHEETAL KORDE CHOUDHARI et al., 2013), comprometendo sua recuperação.

Os níveis de secreção de LDH detectados nos grupos tratados com TRAIL e MIX indicaram que TRAIL induziu apoptose de forma significativa na linhagem MB49. Esses resultados também foram observados em células de câncer de pulmão (linhagens A549, HCC-15), nas quais houve maior liberação de LDH nos grupos tratados com TRAIL, mostrando que houve indução de apoptose por esta proteína (ZINNAH; PARK, 2019). O mesmo padrão foi demonstrado em outro estudo com 2 isoformas de TRAIL no tratamento contra 3 cepas de câncer de bexiga humana (SZLISZKA et al., 2009).

As imagens obtidas por fluorescência e os dados de citometria de fluxo mostram que IL-2, TRAIL e MIX das proteínas levaram as células MB49 e RT4 a processos de morte celular por apoptose, tanto em 24 quanto em 48 horas. Dentre os marcadores nucleares e corantes fluorescentes comumente utilizados nos ensaios de verificação e quantificação da apoptose por citometria de fluxo, destacam-se: iodeto de propídio, brometo de etídio, homodímero de etídio, 7 - aminoactinomicina D (7-AAD) e acridina (GATTI et al., 1998; LECOEUR; GOUGEON, 1996). Um estudo com células cancerosas gástricas (cepas MGC803 e SGC7901) demonstrou por citometria de fluxo, utilizando o marcador PE Annexina V, que TRAIL induziu morte celular por apoptose em 48 horas de experimento (SZLISZKA et al., 2009). O mesmo foi demonstrado em células de câncer de próstata (SZLISZKA; KROL, 2011).

Os dados obtidos nesse estudo mostram que as células RT4 quando expostas a IL-2, ao TRAIL e ao MIX sofrem morte celular por apoptose através da ativação de Caspase. As Caspases são enzimas de cisteína-aspartato cuja ativação sequencial leva a morte celular programada (DANIAL; KORSMEYER, 2004). Os mesmos resultados foram encontrados em um estudo com TRAIL e células de câncer de próstata (SZLISZKA; KROL, 2011).

Em células cancerosas, TRAIL gera apoptose, mas quando a indução da apoptose falha ou é ativamente inibida, as células são representadas pela capacidade dos receptores TRAIL humanos e de camundongos em induzir necrose, independentemente de sua capacidade apoptótica, podendo substituir esse processo. Então, a necrose gerada por TRAIL configura uma nova abordagem, ainda não explorada, (VOIGT et al., 2014). Efeitos citotóxicos em células tumorais necróticas por IL-2, TRAIL e MIX de proteína podem levar a uma terapia mais eficiente do câncer. É digno de nota que a resposta antitumoral induzida por *Salmonella* junto com a ação de IL-2 se correlacionou com aumento de necrose e diminuição de angiogênese. Então, infere-se que a IL-2, assim como o TRAIL, ativa processo necrótico em células tumorais, o que foi demonstrado em nosso estudo, já que a terapia proposta com ambas as proteínas resultou em apoptose tardia e houve coloração de núcleo celular em vermelho por imagens de epifluorescência de alta resolução. Assim, esses achados podem ser correlacionados com as vias analisadas, como função mitocondrial, síntese de NO e dano à membrana celular, mostrando que IL-2, TRAIL e MIX de proteínas, sintetizadas por SL3261, levam à apoptose de células tumorais de bexiga.

Um trabalho realizado previamente no nosso grupo de pesquisa verificou a segurança do uso da SL3261 em animais da linhagem Balb/c. No estudo foi aplicado  $5 \times 10^5$  UFC/mL de SL3261\_IL-2 e SL3261\_TRAIL. Foi dosado os níveis de IL-12 e de TNF no plasma dos animais e o número de leucócitos totais similares aos nossos encontrados. Após um dia da inoculação os níveis da citocina inflamatória IL-2 aumentaram devido a resposta imunológica natural do hospedeiro aos LPS presente na SL3261. Contudo, no 7º dia, esses valores diminuíram. Além do mais os níveis de TNF não aumentaram em nenhum momento. Com base nesses achados comprovou-se que os animais não sofreram sepse (CAMILLO, 2019). Isso é explicado pelo fato de que SL3261 não se acumula nos tecidos saudáveis (YOON et al., 2017) mostrando que o uso terapêutico de SL3261 é seguro. Os dados no presente estudo corroboram esse achados já que os níveis dosados de TNF e IL-12 no plasma de animais C57BL/6 tratados com SL3261, SL3261\_IL-2, SL3261\_TRAIL e SL3261\_MIX não foram altos.

Foi observado no presente estudo que houve diminuição significativa no tamanho das bexigas dos animais tratados com SL3261, SL3261\_IL-2, SL3261\_TRAIL e SL3261\_MIX. No trabalho de Camillo *et al.*, 2019, foi utilizada as mesmas linhagens bacterianas em camundongos Balb/c Nude com câncer colorretal humano, linhagem HCT8, que mostrou a mesma diminuição acentuada no tumor localizado no flancos do animais tratados com SL3261\_TRAIL e SL3261\_MIX (CAMILLO, 2019). Resultados semelhantes foram

encontrados em testes utilizando a linhagem de *S. Typhimurium* A1-R na terapia de câncer de mama também em Balb/c Nude (ZHAO et al., 2005). Um estudo com camundongos imunodeficientes com diversos tipos de câncer, como carcinoma de mama, carcinoma de cólon, adenocarcinoma pancreático, glioma e mieloma mostrou que a ação do TRAIL foi eficaz (JOHNSTONE; FREW; SMYTH, 2008). A molécula recombinante de TRAIL foi desenvolvida para atingir diversos tipos de câncer, basta elas apresentarem o seu receptor, o TRAIL-R (MÉRINO et al., 2007). Ele apresenta uma vantagem importante em relação ao TNF, que é capacidade de eliminar células tumorais sem gerar os temidos efeitos colaterais devastadores (VON KARSTEDT; MONTINARO; WALCZAK, 2017). Como já discutido anteriormente, o TRAIL induz apoptose e consequente ativação de Caspases, mas também tem papel na apoptose via proteínas p53, que é um gene supressor de tumor (WU, 2009). Alterações no material genético decorrentes de componentes da via TRAIL ativada foram identificadas em tumores humanos, e a inativação da via TRAIL e/ou fuga mediada por TRAIL da vigilância imunológica foram implicadas na iniciação e progressão do tumor. (JOHNSTONE; FREW; SMYTH, 2008). Então, o TRAIL se mostra como um agente terapêutico para a terapia do câncer muito promissor.

Neste mesmo trabalho de Camillo *et al.*, 2019, alguns dos animais Balb/c Nude morreram quando tratados com SL3261\_TRAIL e SL3261\_MIX (CAMILLO, 2019), o mesmo foi observado no presente estudo, além da morte com SL3261\_IL-2. Isso pode ser explicado devido ao fato de que as proteínas IL-2 e TRAIL geraram alto poder inflamatório na dose de  $5 \times 10^7$  UFC/mL. Contudo, não houve mortes com o tratamento com SL3261. Portanto, a IL-2 e a TRAIL geraram uma forte reação inflamatória tecidual que evoluiu para uma resposta sistêmica e que essa dose não é segura, mesmo havendo diminuição acentuada do tumor. Como analisado em estudo em Balb/c com uma dose 5 vezes maior que essa, a acumulação preferencial de SL3261 no tecido tumoral e não em tecidos saudáveis (YOON et al., 2017) não é capaz de ativar essa inflamação sistêmica exacerbada, uma vez que não houve morte dos animais e nem aumento significativo de citocinas inflamatórias como discutido no parágrafo anterior (CAMILLO, 2019). Essa reação inflamatória tecidual pode ser explicada devido a síntese de NO pela ativação de iNOS pela IL-2 (SAKKOULA; PIPILI-SYNETOS; MARAGOUDAKIS, 1997) o que contribuiu para as respostas inflamatórias e antitumorais como já mencionado anteriormente.

O presente estudo mostrou a colonização preferencial de *Salmonella* no tumor através da biodistribuição. A *S. Typhimurium* se replica de maneira preferencial em tumores, contudo

uma quantidade menor de bactérias é capaz de colonizar tecidos saudáveis podendo ser tóxica o que causa efeitos nocivos nesses tecidos (CHEN et al., 2012). A abordagem proposta com o uso da SL3261 atenuada e com o promotor nirB, cuja expressão de IL-2 e TRAIL ocorre especificamente na região de hipóxia do tumor, é segura e evita possíveis efeitos tóxicos nos tecidos saudáveis dos animais. Foi realizado estudo para identificar qual via de inoculação de bactérias como vetores vivos, intravenosa e intratumoral, é a mais eficiente. Os parâmetros analisados foram segurança, crescimento e disseminação das bactérias e efeito propagativos dos agentes terapêuticos em tumores primários e secundários, concluindo que a via intratumoral é mais eficiente e segura (KOCIJANCIC et al., 2017). Por isso, a via intravesical foi utilizada neste trabalho e houve a biodistribuição esperada com o uso de SL3261.

A IL-2 é produzida pelos linfócitos TCD4+ que estimulam o próprio TCD4+, que associado a IL-15, produzida por células do organismo, estimulam o linfócito TCD8+. Os linfócitos identificam antígenos cancerígenos específicos e desencadeiam uma resposta imune específica por diversos mecanismos (DE SOUZA SILVA et al., 2021). O linfócito TCD8+, por exemplo, elimina a célula tumoral via secreção de perforinas (forma direta) e pela síntese de IFN- $\gamma$  (forma indireta) e, geralmente, ambos processos ocorrem concomitantemente (CASWELL; SWANTON, 2017; LAW et al., 2010). Dados encontrados no presente estudo mostram aumento nos níveis de IFN- $\gamma$  no plasma dos animais tratados com TRAIL e MIX. A IL-2, além de estimular as células T, estimulam os linfócitos NK e aumentam as concentrações séricas de outras citocinas pró-inflamatórias como o TNF, o IFN- $\gamma$  e a IL-1 (BRUCE G. REDMAN; ALFRED E. CHANG, 2011). O órgão que regulamenta a vigilância sanitária dos Estados Unidos, o FDA (*food and drug administration*) aprovou a aplicação de altas doses de IL-2 no tratamento de melanoma metastático e de carcinoma renal baseado num estudo com 270 pacientes, em 8 estados dos EUA (ATKINS et al., 1999; ONCOLOGY, 2005). Portanto, a IL-2 tem papel importante na regressão tumoral ativando diversos mecanismos antitumorais. O tratamento com IL-2 contra carcinoma hepatocelular foi capaz de inibir metástases num estudo com camundongos Nude pois as células NK estavam vivas e ativas no fígado (HONG et al., 2016). O mesmo estudo também demonstrou *in vitro* que as NKs foram capazes de impedir que as células tumorais proliferassem e invadissem células tumorais de fígado com alta probabilidade de metástase pulmonar, evitando assim esse processo. A diminuição do tamanho do tumor grupo tratado com SL3261\_MIX ocorreu pela ação concomitante de IL-2 e TRAIL com efeito antiangiogênica e citotóxico de IL-2 e apoptose via TRAIL diretamente nas células tumorais.

A administração de terapias baseadas em uma combinação de TRAIL e IL-2 podem ser altamente eficazes.

Além da ação de IL-2 e de TRAIL, a própria bactéria *Salmonella* pode ter papel na regressão tumoral. Um trabalho com *S. Typhimurium* recombinante que secreta flagelina mostrou que esta foi capaz de gerar regressão tumoral mesmo tendo um grupo controle tratado somente com flagelina, no qual não houve regressão tumoral (ZHENG et al., 2017). Esses achados constata a eficiência de *Salmonella* no tratamento do câncer. A explicação para isso é que o microambiente tumoral incorpora a bactéria e ocorre competição entre bactérias e células tumorais por nutrientes, liberação de componentes oriundos das bactérias que são antitumorais liberados pela lise bacteriana, diminuição de angiogênese, autofagia e aumento de moléculas apoptóticas. *Salmonella* também é capaz de sintetizar IFN- $\gamma$  e NO, como já discutido, e reduzir a ação de células supressoras oriundas de células mieloides do microambiente tumoral, tendo como consequência o recrutamento de NK, macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e B (HERNÁNDEZ-LUNA; LURIA-PÉREZ, 2018).

Altos de IFN- $\gamma$  dosados no plasma dos grupos tratados são explicados pela IL-2 que ativa células NK. Ao serem ativadas por IL-2, as NKs recrutam outras células imunológicas com consequente secreção de outras citocinas inflamatórias para a região tumoral, principalmente de IFN- $\gamma$  (GAFFEN; LIU, 2004). Um estudo comprovou que o IFN- $\gamma$  induziu de maneira direta a apoptose mediada por TRAIL em células tumorais de cólon HT29 e em células Jurkat de leucemia. Esse fenômeno inicia-se o pela ligação do IFN- $\gamma$  a uma proteína de que é estimulada por IFN- $\gamma$ , levando à indução de TRAIL e consequente apoptose (WU, 2009), por isso os níveis dessa citocina estão aumentados nos grupos tratados com SL3261\_TRAIL e SL3261\_MIX. O IFN- $\gamma$  também é responsável pela regressão tumoral pois ativa macrófagos e aumentar a imunidade celular (TORRES, 2018).

A contagem global de células, de leucócitos mononucleados e de neutrófilos no sangue e no LCP, pode ser explicada pelo fato de que *Salmonella* é responsável pelo recrutamento de neutrófilos e macrófagos, tendo como consequência a eliminação de células tumorais (HERNÁNDEZ-LUNA; LURIA-PÉREZ, 2018). Depois de infiltrar no tumor, as bactérias geram infecção com alta infiltração de células imunes (principalmente neutrófilos e células dendríticas), que se situam entre as áreas viáveis e necróticas do tumor (SILVA-VALENZUELA et al., 2016). No sangue, houve maior número de leucócitos mononucleados, principalmente de linfócitos nos grupos tratados com SL3261, SL3261\_IL-2 e SL3261\_TRAIL quando comparado ao grupo C+. Um trabalho recente utilizando a técnica CRISPR-Cas9

identificou um subgrupo de linfócitos T capazes de reconhecer células tumorais e combatê-las. O mecanismo ocorre pela identificação específica de metabólitos exclusivos, relacionados a molécula MHC de classe 1, de células tumorais, e o TCR específico. O tratamento com esses linfócitos foi eficiente contra câncer de pulmão, rim, útero, melanoma e leucemias (CROWTHER et al., 2020).

Os neutrófilos infiltram o microambiente tumoral e a neutrofilia é um dos piores prognósticos da doença (MAGOD et al., 2021). Um trabalho que buscou elucidar o desenvolvimento de glioblastoma, um dos tipos de câncer no cérebro, utilizando modelos animais mostrou que os neutrófilos estão localizados muito próximos ao tumor e que ao longo do desenvolvimento da doença, são constantemente recrutados da medula óssea. Nos estágios iniciais da doença, os neutrófilos recrutados fizeram com que o crescimento do tumor diminuísse. Contudo, com o avanço tumoral da medula óssea, neutrófilos com um fenótipo pró-tumorigênico foram recrutados. Acredita-se que há uma via de sinalização entre a medula óssea e o tumor que pode influenciar na síntese de neutrófilos com um fenótipo que promove o crescimento do tumor (MAGOD et al., 2021). No presente estudo o câncer estabelecido foi agudo com somente 11 dias de desenvolvimento da doença, portanto estava no estágio inicial. No sangue os neutrófilos estavam com maior quantidade nos animais tratados com SL3261 e no LCP nos grupos tratados com SL3261\_IL-2 e SL3261\_TRAIL, mostrando que os neutrófilos tiveram função importante na regressão tumoral. Os eosinófilos podem ter papel no início da resposta antitumoral (REALI et al., 2001) o que sugere que eosinofilia no início da doença pode ser benéfica. Um trabalho avaliou a eosinofilia no câncer e identificou menor incidência de câncer colorretal com elevação da contagem de eosinófilos (PRIZMENT et al., 2011). Nos dados do presente estudo o número de eosinófilos foi bem maior no sangue no grupo C+ e nos grupos tratados com SL3261\_IL-2 e SL3261\_TRAIL, o que mostra que os eosinófilos não apresentaram papel na modulação tumoral no estágio estudado.

## 5. CONCLUSÕES

Quando expostas a células tumorais de bexiga MB49 e RT4, as proteínas IL-2 e TRAIL e o MIX sintetizadas e secretadas por *S. Typhimurium* atenuada apresentaram expressiva citotoxicidade, que induziu apoptose e fragmentação de material genético. Nos ensaios com camundongos, as duas proteínas geraram regressão tumoral expressiva e síntese de citocinas importantes no processo de controle tumoral. IL-2 e TRAIL têm se mostraram promissoras para o tratamento do câncer de bexiga, quando administradas juntas ou separadas. O TRAIL e o

MIX de proteínas pareceram contribuir um pouco mais, uma vez que o efeito do TRAIL nas vias de apoptose mostrou ação maior do que a IL-2. Conclui-se que há sinergismo das proteínas e que o MIX apresenta maior potencial terapêutico. A abordagem utilizada neste estudo tem potencial terapêutico, pois o uso de linhagens bacterianas atenuadas que expressam e secretam proteínas-alvo já estão bem elucidadas, com estudos na fase clínica e comercial. A inovação proposta neste estudo consiste na utilização das proteínas IL-2 e TRAIL, individualmente ou em combinação (MIX), expressas pela cepa SL3261 desenvolvida, que podem servir como vetor bacteriano vivo para uma nova terapia contra o câncer de bexiga.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (OMS) ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all.** [s.l: s.n.].
- (OMS) ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Cancer.** 2022.
- AKAJIMA, E. Investigação de proteínas candidatas vacinais contra leptospirose. Apresentação de antígenos na forma de proteínas recombinantes purificadas ou como vacinas vivas em salmonelas atenuadas. p. 177, 2010.
- AL-RAMADI, B. K. et al. Attenuated bacteria as effectors in cancer immunotherapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1138, p. 351–357, 2008.
- AL-RAMADI, B. K. et al. Potent anti-tumor activity of systemically-administered IL2-expressing Salmonella correlates with decreased angiogenesis and enhanced tumor apoptosis. **Clinical Immunology**, v. 130, n. 1, p. 89–97, 2009.
- ANTONI, S. et al. Bladder Cancer Incidence and Mortality: A Global Overview and Recent Trends. **European Urology**, v. 71, n. 1, p. 96–108, 2017.
- ARAÚJO, P. et al. Cistectomia radical / experiência de um centro oncológico. **Acta Urológica Portuguesa**, v. 31, n. 3, p. 63–68, 2014.
- ARGORIO, C. et al. Live attenuated Salmonella as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma. **Journal of Gene Medicine, The**, v. 9, n. April, p. 416–423, 2007.
- ATCC. **RT4 cell line.** Disponível em: <<https://www.atcc.org/products/htb-2>>. Acessado em outubro de 2022.
- ATKINS, M. B. et al. Downloaded from ascopubs.org by UNIVERSITY of OTAGO on. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 2105–2116, 1999.
- BALKWILL, F. R.; CAPASSO, M.; HAGEMANN, T. The tumor microenvironment at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 23, p. 5591–5596, 2012.
- BARNETT, S. J. et al. Attenuated Salmonella typhimurium invades and decreases tumor burden in neuroblastoma. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 40, n. 6, p. 993–998, 2005.
- BEN MENACHEM-ZIDON, O. et al. Astrocytes support hippocampal-dependent memory and long-term potentiation via interleukin-1 signaling. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 5, p. 1008–1016, 2011.
- BENTLEY, R. The Shikimate Pathway - A Metabolic Tree with Many Branches. **Methods**, v. 25, p. 307–383, 1990.
- BICKEL, M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. **J Periodontol**, v. 64, p. 456–460, 1993.
- BIOSCIENCES, B. Components : Kit components Description PE Annexin V 10X Annexin V Binding Buffer. 2015.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and



mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BRUCE G. REDMAN; ALFRED E. CHANG. Tumor immunology. **ACP Medicine**, p. 1–10, 2011.

BURGER, M. et al. Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. **European Urology**, v. 63, n. 2, p. 234–241, 2013.

CAMILLO, L. Potencial antitumoral das proteínas TRAIL e IL-2 expressas e veiculadas por *Salmonella typhimurium* atenuada em modelo de câncer colorretal. 2019.

CAO, H. D. et al. Attenuated *Salmonella typhimurium* carrying TRAIL and VP3 genes inhibits the growth of gastric cancer cells in vitro and in vivo. **Tumori**, v. 96, n. 2, p. 296–303, 2010.

CARSWELL, E. A. et al. An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 9, p. 3666–3670, 1975.

CASWELL, D. R.; SWANTON, C. The role of tumour heterogeneity and clonal cooperativity in metastasis, immune evasion and clinical outcome. **BMC Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2017.

CHADE, D. C. et al. Histopathological characterization of a syngeneic orthotopic murine bladder cancer model. **International Braz J Urol**, v. 34, n. 2, p. 220–226, 2008.

CHEN, J. et al. *Salmonella*-mediated tumor-targeting TRAIL gene therapy significantly suppresses melanoma growth in mouse model. **Cancer Science**, v. 103, n. 2, p. 325–333, 2012.

CHOROBK, P.; MARCINKIEWICZ, J. Therapeutic vaccines based on genetically modified *Salmonella*: a novel strategy in cancer immunotherapy. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v. 121, n. 12, p. 461–466, 2011.

COLEY, W. B. **The Treatment of Malignant Tumors by Repeated Inoculations of Erysipelas** *Annals of Surgery*, 1893.

COMPARATIVE BIOSCIENCES, I. **Bladder Cancer**. Disponível em: <<https://www.compbio.com/blog/bladder-cancer/>>. Acessado em setembro de 2022.

CRONIN, M. et al. High resolution in vivo bioluminescent imaging for the study of bacterial tumour targeting. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.

CROWTHER, M. D. et al. Genome-wide CRISPR–Cas9 screening reveals ubiquitous T cell cancer targeting via the monomorphic MHC class I-related protein MR1. **Nature Immunology**, v. 21, n. 2, p. 178–185, 2020.

DA SILVA, ADILSON JOSÉ, ET AL. Cloning, auto-induction expression, and purification of rSpaA swine erysipelas antigen. **Current microbiology**, v. 65, n. 4, p. 369–374, 2012.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell Death: Critical Control Points. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 205–219, 2004.

DE LIMA FRAGELLI, B. D. et al. Antitumor effect of IL-2 and TRAIL proteins expressed by recombinant *Salmonella* in murine bladder cancer cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 55, n. 4, p. 460–476, 2021.

DE MIGUEL, D. et al. Onto better TRAILs for cancer treatment. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, n. 5, p. 733–747, 2016.

DE SOUZA SILVA, E. V. et al. Elucidating tumor immunosurveillance and immunoediting: A comprehensive review. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 22, 2021.

DING, X.; SUN, W.; CHEN, J. IL-2 augments the sorafenib-induced apoptosis in liver cancer by promoting mitochondrial fission and activating the JNK/TAZ pathway 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis. **Cancer Cell International**, v. 18, n. 1, p. 1–16, 2018.

DOMINGOS-PEREIRA, S. et al. Local *Salmonella* immunostimulation recruits vaccine-specific CD8 T cells and increases regression of bladder tumor. **OncoImmunology**, v. 4, n. 7, p. 1–10, 2015.

ENGELKING, C. **Germ of an Idea: William Coley’s Cancer-Killing Toxins**. Disponível em:

<<https://www.discovermagazine.com/health/germ-of-an-idea-william-coleys-cancer-killing-toxins>>. Acessado em agosto de 2022.

FARKONA, S.; DIAMANDIS, E. P.; BLASUTIG, I. M. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? **BMC Medicine**, p. 1–18, 2016.

FELGNER, S. et al. Aroa-deficient Salmonella enterica serovar Typhimurium is more than a metabolically attenuated mutant. **mBio**, v. 7, n. 5, p. 1–12, 2016.

FELGNER, S. et al. Tumour-targeting bacteria-based cancer therapies for increased specificity and improved outcome. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 1074–1078, 2017.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality - Major patterns in GLOBOCAN 2012, worldwide and Georgia. **Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences**, v. 9, n. 1, p. 168–173, 2015.

FITZMAURICE, C. et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study Global Burden. **JAMA Oncology**, v. 3, n. 4, p. 524–548, 2017.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265–271, 2000.

FORBES, N. S. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 11, p. 785–794, 2010.

FÖRSTERMANN, U. et al. Commentary Isoforms of Nitric Oxide Synthase Distribution and Expressional. **Biochem. Pharmacol.**, v. 50, n. 9, p. 1321–1332, 1995.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006.

GAFFEN, S. L.; LIU, K. D. Overview of interleukin-2 function, production and clinical applications. **Cytokine**, v. 28, n. 3, p. 109–123, 2004.

GANAI, S.; ARENAS, R. B.; FORBES, N. S. Tumour-targeted delivery of TRAIL using Salmonella typhimurium enhances breast cancer survival in mice. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 10, p. 1683–1691, 2009.

GATTI, R. et al. Comparison of annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 46, n. 8, p. 895–900, 1998.

GOMES, C. M.; HISANO, M. Anatomia e Fisiologia da Micção. **Archives of general psychiatry**, v. 32, n. 11, p. 1416–8, 1975.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GUPTA, S.; AGARWAL, N. Cancer Immunotherapy with Interleukin-2—Current Status and Future Developments. **Oncology & Hematology Review (US)**, v. 12, n. 02, p. 82, 2016.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. **Hallmarks of Cancer: Supplement Cell Press**, 2011.

HARADA, A. et al. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 56, n. 5, p. 559–564, 1994.

HERNÁNDEZ-LUNA, M. A.; LURIA-PÉREZ, R. Cancer Immunotherapy: Priming the Host Immune Response with Live Attenuated Salmonella enterica. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. 1–15, 2018.

HOISETH, S. K.; STOCKER, B. A. D. Aromatic dependent Salmonella typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. **Nature**, v. 291, p. 238–239, 1981.

HOLZER, P. Involvement of nitric oxide in the substance P-induced inhibition of intestinal peristalsis. **NeuroReport**, v. 8, n. 13, p. 2857–2860, 1997.

HONG, Z. F. et al. Natural killer cells inhibit pulmonary metastasis of hepatocellular carcinoma in nude mice. **Oncology Letters**, v. 11, n. 3, p. 2019–2026, 2016.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O quê é câncer?** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acessado em outubro de 2022.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Neoplasia maligna da bexiga (taxas ajustadas)**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/estimativa/taxas-ajustadas/neoplasia-maligna-da-bexiga>>. Acessado em outubro de 2022.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **O que causa o câncer?** Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-c>>. Acessado em outubro de 2022.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estatísticas de câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acessado em outubro de 2022.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Câncer de bexiga**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de->>. Acessado em outubro de 2022.

INCA (RIO PRETO) - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **CÂNCER DE BEXIGA**. Disponível em: <<https://incariopreto.com.br/cancer-de-bexiga/>>. Acessado em outubro de 2022.

INSTITUTO AMERICAS. **Câncer de Bexiga**. Disponível em: <<https://institutocoi.org/sobre-o-cancer/tipos-de-cancer/cancer-de-bexiga/>>. Acessado em outubro de 2022.

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM. **Classification of genus: Salmonella**. Disponível em: <[https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=302#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=302#null)>. Acessado em outubro de 2022.

JAIN, S. et al. Medicinal plants for treatment of cancer: A brief review. **Pharmacognosy Journal**, v. 8, n. 2, p. 87–102, 2016.

JIAXIN, Y. et al. Recombinant Salmonella-based CEACAM6 and 4-1BBL vaccine enhances T-cell immunity and inhibits the development of colorectal cancer in rats: In vivo effects of vaccine containing 4-1BBL and CEACAM6. **Journal of Biomedical Science**, v. 20, n. 8, p. 1–9, 2013.

JOHNSTONE, R. W.; FREW, A. J.; SMYTH, M. J. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 10, p. 782–798, 2008.

JU, G. et al. Structure-function analysis of human interleukin-2. Identification of amino acid residues required for biological activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 12, p. 5723–5731, 1987.

KAIMALA, S. et al. Attenuated Bacteria as Immunotherapeutic Tools for Cancer Treatment. **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. May, 2018.

KAMIMURA, D.; ISHIHARA, K.; HIRANO, T. **IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model**. [s.l.: s.n.]. v. 149

KASINSKAS, R. W.; FORBES, N. S. Salmonella typhimurium Specifically Chemotax and Proliferate in Heterogeneous Tumor Tissue In Vitro. **Biotechnology and bioengineering**, v. 94, n. 4, p. 710–721, 2006a.

KASINSKAS, R. W.; FORBES, N. S. Salmonella typhimurium Specifically Chemotax and Proliferate in Heterogeneous Tumor Tissue In Vitro. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 94, n. 4, 2006b.

KASINSKAS, R. W.; FORBES, N. S. Salmonella typhimurium lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis. **Cancer Research**, v. 67, n. 7, p. 3201–3209, 2007.

KELLEY, S. K. et al. Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: Characterization of in vivo efficacy, pharmacokinetics, and safety. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 299, n. 1, p. 31–38, 2001.

KERKAR, S. P.; RESTIFO, N. P. Cellular constituents of immune escape within the tumor microenvironment. **Cancer Research**, v. 72, n. 13, p. 3125–3130, 2012.

KIM, T. H. et al. PEG-transferrin conjugated TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) for therapeutic tumor targeting. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 2, p. 422–428, 2012.

KOCH, A. E. et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science**, v. 258, n. 5089, p. 1798–1801, 1992.

KOCIJANCIC, D. et al. Local application of bacteria improves safety of *Salmonella* -mediated tumor therapy and retains advantages of systemic infection. **Oncotarget**, v. 8, n. 30, p. 49988–50001, 2017.

KOSCHNY, R. et al. TRAIL/bortezomib cotreatment is potentially hepatotoxic but induces cancer-specific apoptosis within a therapeutic window. **Hepatology**, v. 45, n. 3, p. 649–658, 2007.

KOZŁOWSKI, L. I. et al. Concentration of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8) and interleukin-10 (IL-10) in blood serum of breast cancer patients. **Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku**, v. 4, p. 82–84, 2003.

KRAMER, M. G. et al. Bacterial therapy of cancer: Promises, limitations, and insights for future directions. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JAN, p. 1–9, 2018.

LALSIAMTHARA, J. et al. Safety implication of Salmonella based Brucella vaccine candidate in mice and in vitro human cell culture. **Vaccine**, v. 36, n. 14, p. 1837–1845, 2018.

LAMM, D. L.; MORALES, A. A BCG success story: From prevention of tuberculosis to optimal bladder cancer treatment. **Vaccine**, v. 39, n. 50, p. 7308–7318, 2021.

LAW, R. H. P. et al. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. **Nature**, v. 468, n. 7322, p. 447–451, 2010.

LECOEUR, H.; GOUGEON, M. L. Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons. Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes. **Journal of Immunological Methods**, v. 198, n. 1, p. 87–99, 1996.

LIANG, K. et al. Genetically engineered Salmonella Typhimurium: Recent advances in cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 448, n. 2, p. 168–181, 2019a.

LIANG, K. et al. Genetically engineered Salmonella Typhimurium: Recent advances in cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 448, p. 168–181, 2019b.

LIANG, X. et al. Inhibiting systemic autophagy during interleukin 2 immunotherapy promotes long-term tumor regression. **Cancer Research**, v. 72, n. 11, p. 2791–2801, 2012.

LIAO, W.; LIN, J. X.; LEONARD, W. J. IL-2 family cytokines: New insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 5, p. 598–604, 2011.

LIN, C. S. et al. Enhancement of anti-murine colon cancer immunity by fusion of a SARS fragment to a low-immunogenic carcinoembryonic antigen. **Biol Proced Online**, v. 14, p. 2, 2012.

LIST OF BACTERIAL NAMES WITH STADING IN NOMENCLATURE. **Salmonella nomenclature**. Disponível em: <<https://web.archive.org/web/20040926084532/http://www.bacterio.cict.fr/salmonellanom.html>>. Acessado em setembro de 2022.

LIU, M. et al. Expression, Purification, and Characterization of a Functional Mutant Recombinant Human Interleukin-2. **Protein & Peptide Letters**, v. 17, n. 10, p. 1280–1284, 2010.

LIU, M. et al. Melittin-MIL-2 fusion protein as a candidate for cancer immunotherapy. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 4–15, 2016.

LOSKOG, A. et al. Optimization of the MB49 mouse bladder cancer model for adenoviral gene therapy. **Laboratory Animals**, v. 39, n. 4, p. 384–393, 2005.

MACFARLANE, M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. **Toxicology Letters**, v. 139, n. 2–3, p. 89–97, 2003.

MAGOD, P. et al. Exploring the longitudinal glioma microenvironment landscape uncovers reprogrammed pro-tumorigenic neutrophils in the bone marrow. **Cell Reports**, v. 36, n. 5, p. 109480, 2021.

MARTINOVIĆ, K. M. M. et al. Beneficial in-vitro effects of interleukin-2, interleukin-12, and their combination on functional and receptor characteristics of natural killer cells in metastatic melanoma patients with normal serum lactate dehydrogenase levels. **Melanoma Research**, v. 26, n. 6, p. 551–564, 2016.

MARTINS, W. K. et al. Rapid screening of potential autophagic inductor agents using mammalian cell lines. **Biotechnology Journal**, v. 8, n. 6, p. 730–737, 2013.

MASTROENI, P. et al. Salmonella: Immune responses and vaccines. **Veterinary Journal**, v. 161, n. 2, p. 132–164, 2001.

MAY, P.; MAY, E. Corrigendum: Twenty years of p53 research: Structural and functional aspects of the p53 protein (Oncogene (1999) 18 (7621-7636)). **Oncogene**, v. 19, n. 13, p. 1734, 2000.

MEDICINANET. **Gerenciamento de Câncer de Bexiga**. Disponível em: <[https://www.medicinanet.com.br/m/conteudos/acp-medicine/7122/gerenciamento\\_de\\_cancer\\_de\\_bexiga.htm](https://www.medicinanet.com.br/m/conteudos/acp-medicine/7122/gerenciamento_de_cancer_de_bexiga.htm)>. Acessado em setembro de 2022.

MEHDI, S. H. et al. Chrysin Sensitizes Human Lung Cancer Cells to Tumour Necrosis Factor Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) Mediated Apoptosis. **Asian Pacific Journal of Cancer Biology**, v. 4, n. 2, p. 27–33, 2019.

MÉRINO, D. et al. TRAIL in cancer therapy: present and future challenges. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 11, n. 10, p. 1299–1314, 2007.

MONGKOLSAPAYA, J. et al. Structure of the TRAIL – DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic. v. 6, n. 11, 1999.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOSMANN, T. R. et al. Species-specificity of T cell stimulating activities of IL 2 and BSF-1 ( IL 4 ): comparison of normal and recombinant , mouse and human IL 2 and BSF-1 ( IL 4 ). Why The JI ? Submit online . • Rapid Reviews ! 30 days \* from submission to initial decision • **The Journal of Immunology**, v. 138, n. 6, p. 1813–1816, 1987.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Two types of mouse helper T-cell clone. Implications for immune regulation. **Trends in Immunology**, v. 8, n. 7–8, p. 223–227, 1987.

MURAKAMI, S. Department of Surgery, Saitama Medical School, Morohongo 38, Moyoramamachi, Iruma-gun, Saitama, 350-0495, Japan. v. 15, n. 8, p. 3085–3090, 2004.

NADAL, R.; BELLMUNT, J. Management of metastatic bladder cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 76, n. December 2018, p. 10–21, 2019.

NCBI. Salmonella. 2020. Acessado em outubro de 2022.

NG, C. W.; LI, J.; PU, K. Recent Progresses in Phototherapy-Synergized Cancer Immunotherapy. **Advanced Functional Materials**, v. 28, n. 46, p. 1–20, 2018.

NÚCLEO DE ESTUDO EM ONCO-UROLOGIA. **Câncer de Bexiga**. Disponível em: <<http://neouro.com.br/tratamentos/cancer-de-bexiga/>>. Acessado em outubro de 2022.

O'BRIEN, I. G.; COX, G. B.; GIBSON, F. Biologically active compounds containing 2,3-duhydroxybenzoic acid and serine formed by Escherichia coli. **BBA - General Subjects**, v. 201, n. 3, p. 453–460, 1970.

OLIVEIRA, R. B. DE; ALVES, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: Uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 976–984, 2002.

ONCOGUIA. **Tratamento do Câncer de Bexiga por Estágio**. Disponível em: <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamento-do-cancer-de-bexiga-por-estagio/7570/203/>>. Acessado em setembro de 2022.

ONCOLOGY, T. M. S. Gordon, MD Randomized Phase III Trial of High-Dose Interleukin-2 Versus Subcutaneous Interleukin-2 and Interferon in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *v. 2*, p. 158–159, 2005.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral Cancer and the tumor microenvironment. **Revista Médica**, *v. 89*, n. 1, p. 21–31, 2010.

OXER, M. D. et al. High level heterologous expression in E.coli using the anaerobically-activated nirB promoter. **Nucleic Acids Research**, *v. 19*, n. 11, p. 2889–2892, 1991.

PATYAR, S. et al. Bacteria in cancer therapy: A novel experimental strategy. **Journal of Biomedical Science**, *v. 17*, n. 1, p. 1–9, 2010.

PAWELEK, J. M.; LOW, K. B.; BERMUDES, D. Bacteria as tumour-targeting vectors. **Lancet Oncology**, *v. 4*, n. 9, p. 548–556, 2003.

PAWELWK, J. M.; LOW, K. B.; BERMUDES, D. Bacteria as tumour-targeting vectors. **THE LANCET Oncology**, *v. 4*, p. 548–556, 2003.

PENG, M. et al. Metformin and gefitinib cooperate to inhibit bladder cancer growth via both AMPK and EGFR pathways joining at Akt and Erk. **Scientific Reports**, *v. 6*, n. January, p. 1–10, 2016.

POLLOCK, J. S. et al. Nitric oxide synthase isozymes antibodies. **The Histochemical Journal**, *v. 27*, n. 10, p. 738–744, 1995.

PRIZMENT, A. E. et al. Inverse association of eosinophil count with colorectal cancer incidence: Atherosclerosis Risk in Communities study. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, *v. 20*, n. 9, p. 1861–1864, 2011.

QIAO, J.; LIU, Z.; FU, Y. X. Adapting conventional cancer treatment for immunotherapy. **Journal of Molecular Medicine**, *v. 94*, n. 5, p. 489–495, 2016.

QIU, F. et al. Annexin v-trail fusion protein is a more sensitive and potent apoptotic inducer for cancer therapy. **Scientific Reports**, *v. 3*, p. 15–17, 2013.

RAMOS, C. R. R. et al. A high-copy T7 Escherichia coli expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal his-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, *v. 37*, n. 8, p. 1103–1109, 2004.

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, É. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, *v. 29*, n. 5, p. 1114–1120, 2006.

RASHEDUZZAMAN, M.; JEONG, J. K.; PARK, S. Y. **Resveratrol sensitizes lung cancer cell to TRAIL by p53 independent and suppression of Akt/NF-κB signaling**. [s.l.] Elsevier Inc, 2018. *v. 208*

REALI, E. et al. IgEs targeted on tumor cells: Therapeutic activity and potential in the design of tumor vaccines. **Cancer Research**, *v. 61*, n. 14, p. 5517–5522, 2001.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. **Nature Protocols**, *v. 3*, n. 7, p. 1125–1131, 2008.

RICHTERS, A.; ABEN, K. K. H.; KIEMENEY, L. A. L. M. The global burden of urinary bladder cancer: an update. **World Journal of Urology**, *v. 38*, n. 8, p. 1895–1904, 2020.

RIGLAR, D. T.; SILVER, P. A. Engineering bacteria for diagnostic and therapeutic applications. **Nature Reviews Microbiology**, *v. 16*, n. 4, p. 214–225, 2018.

ROSENBERG, S. A. Interleukin 2 for patients with renal cancer. **Nature Clinical Practice Oncology**, *v. 4*, n. 9, p. 497, 2007.

ROSENBERG, S. A. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. **The Journal of Immunology**, *v. 192*, n. 12, p. 5451–5458, 2014.

RUBY, T. et al. Salmonella's long-term relationship with its host. **FEMS Microbiology Reviews**, *v. 36*, n. 3, p. 600–615, 2012.

SAKKOULA, E.; PIPILI-SYNETOS, E.; MARAGOUDAKIS, M. E. Involvement of nitric oxide in the inhibition of angiogenesis by interleukin-2. **British Journal of Pharmacology**, *v. 122*, n. 5, p. 793–795, 1997.

SALTZMAN, B. E. Colorimetric Microdetermination of Nitrogen Dioxide in the Atmosphere. **Analytical Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 1949–1955, 1954.

SALTZMAN, D. et al. Low dose chemotherapy combined with attenuated Salmonella decreases tumor burden and is less toxic than high dose chemotherapy in an autochthonous murine model of breast cancer. **Surgery (United States)**, v. 163, n. 3, p. 509–514, 2018.

SALTZMAN, D. A. et al. Antitumor mechanisms of attenuated Salmonella typhimurium containing the gene for human interleukin-2: A novel antitumor agent? **Journal of Pediatric Surgery**, v. 32, n. 2, p. 301–306, 1997.

SALTZMAN, D. A. Cancer immunotherapy based on the killing of Salmonella typhimurium-infected tumour cells. **Expert opinion on biological therapy**, v. 5, n. 4, p. 443–9, 2005.

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 676–682, 2012.

SCOTT, A. M.; ALLISON, J. P.; WOLCHOK, J. D. Monoclonal antibodies in cancer therapy. **Cancer Immunity**, v. 12, p. 1–20, 2012.

SEKI, S. et al. Antitumor immunity produced by the liver kupffer cells, NK Cells, NKT cells, and CD8 + CD122 + T cells. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2011, 2011.

SHAHZAD, A. et al. Interleukin 8 (IL-8) - a universal biomarker? **International archives of medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–4, 2010.

SHANAFELT, A. B. et al. A T-cell-selective interleukin 2 mutein exhibits potent antitumor activity and is well tolerated in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 11, p. 1197–1202, 2000.

SHARMA, A.; ALMASAN, A. Autophagy as a mechanism of Apo2L/TRAIL resistance. **Cancer Biology and Therapy**, v. 19, n. 9, p. 755–762, 2018.

SHEETAL KORDE CHOUDHARI et al. Nitric oxide and cancer: a review. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 11, n. 118, p. 1–11, 2013.

SILVA-VALENZUELA, C. A. et al. Solid tumors provide niche-specific conditions that lead to preferential growth of Salmonella. **Oncotarget**, v. 7, n. 23, p. 35169–35180, 2016.

SMITH, A. B. et al. Muscle-invasive bladder cancer: Evaluating treatment and survival in the National Cancer Data Base. **BJU International**, v. 114, n. 5, p. 719–726, 2014.

SMITH, P. C.; KELLER, E. T. Anti-interleukin-6 monoclonal antibody induces regression of human prostate cancer xenografts in nude mice. **Prostate**, v. 48, n. 1, p. 47–53, 2001.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **WORLD CANCER REPORT 2014**. [s.l: s.n.].

SZLISZKA, E. et al. TRAIL-induced apoptosis and expression of death receptor TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in bladder cancer cells. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 47, n. 4, p. 579–585, 2009.

SZLISZKA, E.; KROL, W. Soy isoflavones augment the effect of TRAIL-mediated apoptotic death in prostate cancer cells. **Oncology Reports**, v. 26, n. 3, p. 533–541, 2011.

TAM, K. Y.; LEUNG, K. C. F.; WANG, Y. X. J. Chemoembolization agents for cancer treatment. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 1–2, p. 1–10, 2011.

THEURICH, S.; SHIMABUKURO, A. Overcoming tumor-mediated immunosuppression. v. 6, p. 973–988, 2014.

TORRES, W. et al. Bacteria in cancer therapy: beyond immunostimulation. **Journal of Cancer Metastasis and Treatment**, v. 4, n. 1, p. 4, 2018.

TRAN, L. et al. Advances in bladder cancer biology and therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 21, n. 2, p. 104–121, 2021.

VAN DE GRAAF, B., HOEFNAGEL, A. J., & WEPSTER, B. M. VAN DE GRAAF, B.; HOEFNAGEL, A. J.; WEPSTER, B. M. Substituent effects. 7. Microscopic dissociation constants of 4-amino- and 4-(dimethylamino) benzoic acid. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 653–657, 1981.

VAN DER POLL, T. et al. Interleukin-6 gene-deficient mice show impaired defense against pneumococcal pneumonia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 2, p. 439–444, 1997.

VICKERS, A. Alternative Cancer Cures: “Unproven” or “Disproven”? **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 54, n. 2, p. 110–118, 2004.

VOIGT, S. et al. TRAIL-induced programmed necrosis as a novel approach to eliminate tumor cells. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, 2014.

VON KARSTEDT, S.; MONTINARO, A.; WALCZAK, H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 6, p. 352–366, 2017.

WAJANT, H. The Role of TNF in Cancer. **Death Receptors and Cognate Ligands in Cancer**, p. 1–15, 2009.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, n. 1, p. 45–65, 2003.

WANG, C. Z.; KAZMIERCZAK, R. A.; EISENSTARK, A. Strains, mechanism, and perspective: Salmonella -based cancer therapy. **International Journal of Microbiology**, v. 2016, 2016.

WAUGH, D. J. J.; WILSON, C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 21, p. 6735–6741, 2008.

WILEY, S. R. et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. **Immunity**, v. 3, n. 6, p. 673–682, 1995.

WU, G. S. TRAIL as a target in anti-cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 285, n. 1, p. 1–5, 2009.

XU, S. et al. MiR-494 sensitizes gastric cancer cells to trail treatment through downregulation of survivin. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 51, n. 5, p. 2212–2223, 2018.

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Eaten alive: A history of macroautophagy. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 9, p. 814–822, 2010.

YOON, W. et al. Application of genetically engineered Salmonella typhimurium for interferon-gamma-induced therapy against melanoma. **European Journal of Cancer**, v. 70, p. 48–61, 2017.

YUHUA, L. et al. Oral cytokine gene therapy against murine tumor using attenuated Salmonella typhimurium. **International Journal of Cancer**, v. 94, n. 3, p. 438–443, 2001.

ZHANG, W.; CHEN, H. The study on the interleukin-8 (IL-8). **International archives of medicine**, v. 31, n. 1, p. 1–4, 2010.

ZHAO, M. et al. Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing Salmonella typhimurium. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 23, n. 5, p. 380, 2005.

ZHAO, S. et al. Generation of embryonic stem cells and transgenic mice expressing green fluorescence protein in midbrain dopaminergic neurons. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 5, p. 1133–1140, 2004.

ZHENG, J. H. et al. Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered Salmonella typhimurium secreting heterologous flagellin. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 376, p. 1–11, 2017.

ZHENG, J. H.; MIN, J.-J. Targeted Cancer Therapy Using Engineered Salmonella typhimurium. **Chonnam Medical Journal**, v. 52, n. 3, p. 173, 2016.

ZHU, X. et al. Tumor antigen delivered by Salmonella III secretion protein fused with heat shock protein 70 induces protection and eradication against murine melanoma. **Cancer Science**, v. 101, n. 12, p. 2621–2628, 2010.

ZINNAH, K. M. A.; PARK, S. Y. Duloxetine Enhances TRAIL-mediated Apoptosis via AMPK-mediated Inhibition of Autophagy Flux in Lung Cancer Cells. **Anticancer Research**, v. 39, n. 12, p. 6621–6633, 2019.



## 7. ANEXOS

### 7.1 Anexo 1: Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais - nº 8915061118

Pró Reitoria  
de Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos



#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Ação antitumoral das proteínas IL-2 e TRAIL expressas e veiculadas por Salmonella atenuada na terapia contra o tumor de bexiga nos modelos In vitro e In vivo", protocolada sob o CEUA nº 8915061118 (00 001125), sob a responsabilidade de **Bruna Dias de Lima Fragelli** e equipe; *Fernanda de Freitas Anibal* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 21/02/2019.

We certify that the proposal "Antitumor action of Salmonella attenuated and expressed IL-2 and TRAIL proteins in bladder tumor therapy in the In vitro and In vivo models", utilizing 92 Isogenics mice (92 females), protocol number CEUA 8915061118 (00 001125), under the responsibility of **Bruna Dias de Lima Fragelli** and team; *Fernanda de Freitas Anibal* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 02/21/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2019** a **03/2021**

Área: **Morfologia E Patologia**

Origem: **Biotério Externo**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

Idade: **4 a 6 semanas**

N: **92**

Linhagem: **C57BL/6**

Peso: **18 a 20 g**

Local do experimento: Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas (LIDI) do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da UFSCar Campus São Carlos

São Carlos, 21 de fevereiro de 2019

Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho  
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de São Carlos

## 7.2 Anexo 2: Artigo publicado: Antitumor Effect of IL-2 and TRAIL Proteins Expressed by Recombinant *Salmonella* in Murine Bladder Cancer Cell

### Antitumor Effect of IL-2 and TRAIL Proteins Expressed by Recombinant *Salmonella* in Murine Bladder Cancer Cells

Bruna Dias de Lima Fragelli<sup>a</sup> Luciana Camillo<sup>a</sup>  
Joice Margareth de Almeida Rodolpho<sup>a</sup> Krissia Franco de Godoy<sup>a</sup>  
Cynthia Aparecida de Castro<sup>a</sup> Patricia Brassolatti<sup>a</sup> Adilson José da Silva<sup>b</sup>  
Ricardo Carneiro Borra<sup>c</sup> Fernanda de Freitas Anibal<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas, Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil, <sup>b</sup>Laboratório de Fábrica Celular, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil, <sup>c</sup>Laboratório de Imunologia Aplicada, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil

#### Key Words

*Salmonella* • IL-2 • TRAIL • Bladder Tumor • MB49

#### Abstract

**Background/Aims:** Cancer is the second most deadly disease in the world. The bladder cancer is one of the most aggressive types and shows a continuous increase in the number of cases. The use of bacteria as live vectors to deliver molecules directly to the tumor is a promising tool and has been used as an adjuvant treatment against several types of cancer. The aim of this study was to investigate the antitumor effect of Interleukin 2 (IL-2), TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and protein MIX against murine bladder cancer cells, lineage MB49. **Methods:** The attenuated *Salmonella* strain SL3261 was transformed by inserting the IL-2 and TRAIL genes. The effects of proteins on cell viability (MTT method), cell morphology (optical microscopy), cell recovery (clonogenic assay), cell membrane (lactate dehydrogenase release - LDH), on oxidative stress pathway (levels of nitric oxide, NO) and apoptosis (flow cytometry and high resolution epifluorescence images) were evaluated at intervals of 24 and 48 hours of action. **Results:** The results showed that there was a decrease in cell viability via damage to the cell membrane, alteration of cell morphology, non-recovery of cells, increase in the production of NO and incubate for of cells in the state of apoptosis in the two periods analyzed. **Conclusion:** The data presented suggest that IL-2, TRAIL and their MIX proteins in MB49 cells have cytotoxic potential and that this is associated with oxidative stress and apoptosis pathways. These results may contribute to the development of new therapeutic strategies for bladder cancer.

© 2021 The Author(s). Published by  
Cell Physiol Biochem Press GmbH&Co. KG

Bruna Dias de Lima Fragelli

Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas, Departamento de Morfologia e Patologia,  
Universidade Federal de São Carlos  
Rod. Washington Luís, Km 235, São Carlos - SP - CEP. 13565-905 - Caixa Postal 676 (Brazil)  
Tel. +55 (16) 33518325, E-Mail: brufregelli@gmail.com

Periodico: Cellular Physiology and Biochemistry (ISSN: 1015-898). Qualis: A1. Fator de impacto: 5.5

**7.3 Anexo 3: Artigo em processo de submissão: Trabalho** que contém os dados com a linhagem celular RT4 e com animais C57BL/6: Anti-tumor effect of IL-2 and TRAIL expressed by recombinant *Salmonella*: an immunotherapeutic proposal against bladder cancer by iNOS, Caspases activation and modulation of the immune system. *Status: under review.*

#### **7.4 Anexo 4: Artigos publicados ao longo do Doutorado**

- 1) ASSIS, M. et al. Bactericidal activity of Ag<sub>4</sub>V<sub>2</sub>O<sub>7</sub>/β-AgVO<sub>3</sub> heterostructures against antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Biomaterials Advances*, v. 141, n. August, 2022.
- 2) BRASSOLATTI, P. et al. Functionalized Titanium Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Cell Death in Human Skin Cells. *International Journal of Nanomedicine*, v. 17, n. December 2021, p. 1495–1509, 2022.
- 3) CAGNAZZO, T. DI O. et al. Investigating Immunization With Nucleotide Enzymes of *Schistosoma mansoni*: Nucleoside Diphosphate Kinase and Adenylosuccinate Lyase as New Antigenic Targets Against Schistosomiasis. *Frontiers in Immunology*, v. 11, n. September, p. 1–11, 2020.
- 4) DE ALMEIDA RODOLPHO, J. M. et al. Apoptosis and oxidative stress triggered by carbon black nanoparticle in the LA-9 fibroblast. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 55, n. 3, p. 364–377, 2021.
- 5) DE GODOY, K. F. et al. New Multi-Walled carbon nanotube of industrial interest induce cell death in murine fibroblast cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 31, n. 7, p. 517–530, 2021.
- 6) DE GODOY, K. F. et al. Cytotoxic Effects Caused by Functionalized Carbon Nanotube in Murine Macrophages. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, v. 56, n. 16, p. 514–529, 2022.
- 7) DE LIMA FRAGELLI, B. D. et al. Antitumor effect of IL-2 and TRAIL proteins expressed by recombinant *Salmonella* in murine bladder cancer cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 55, n. 4, p. 460–476, 2021.
- 8) FATTORI, ANA CAROLINA MARAGNO, ET AL. Effects of Immunization with Recombinant *Schistosoma mansoni* Enzymes AK and HGPRT: Murine Infection Control. *Pathogens*, v. 12, n. 1, 2023.
- 9) RODOLPHO, JOICE MARGARETH DE ALMEIDA ; GODOY, KRISSIA FRANCO DE ; BRASSOLATTI, PATRICIA ; FRAGELLI, B. D. L. ; CAMILO, L. ; DE CASTRO,

CYNTHIA APARECIDA ; NOGUEIRA, C. T.; ASSIS, M.; SPEGLICH, CARLOS ; LONGO, ELSON ; DE FREITAS ANIBAL, F. Carbon Black CB-EDA Nanoparticles in Hepatocytes: Changes in the Oxidative Stress Pathway. nternational Journal Of Pharmaceutical And Bio-Medical Science, v. 2, p. 679–686, 2022.