

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA

**POTENCIAL ANTITUMORAL DAS PROTEÍNAS TRAIL E IL-2
EXPRESSAS E VEICULADAS POR *Salmonella* Typhimurium
ATENUADA EM MODELO DE CÂNCER COLORRETAL**

LUCIANA CAMILLO

São Carlos – SP

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA

**POTENCIAL ANTITUMORAL DAS PROTEÍNAS TRAIL E IL-2
EXPRESSAS E VEICULADAS POR *Salmonella* Typhimurium
ATENUADA EM MODELO DE CÂNCER COLORRETAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética evolutiva e Biologia molecular da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aluna: M.^a Luciana Camillo

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal

Coorientador: Prof. Dr. Adilson José da Silva

São Carlos – SP

2019



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 Luciana Camillo, realizada em 14/10/2019.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal (UFSCar)

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur (UFSCar)

Profa. Dra. Cynthia Aparecida de Castro (UFSCar)

Prof. Dr. Marcelo Brocchi (UNICAMP)

Profa. Dra. Miriane da Costa Gileno (UNIARA)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

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.

Esse trabalho é dedicado à minha família,
pelo amor e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal e ao Prof. Dr. Adilson José da Silva pela orientação científica e pela confiança, em mim depositada, para realizar este trabalho de doutorado. Só tenho a agradecer pelo apoio, paciência e disponibilidade.

Agradeço às professoras Dra. Teresa Cristina Zangirolami e Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur, pelo apoio que recebi durante esses anos de pesquisa e pela disponibilidade nos momentos em que precisei.

Agradeço à Dra. Elizabeth A. Martins do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, São Paulo-SP, que nos cedeu a cepa da bactéria atenuada e o plasmídeo utilizado para o desenvolvimento das linhagens recombinantes.

Agradeço à toda equipe do Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas e do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada, pelo companheirismo e pela ajuda nos experimentos. Eles me ajudaram muito, desde procedimentos simples até os mais cansativos. É muito bom trabalhar em laboratórios com clima tão gostoso e devo isso a eles. Agradeço em especial à Joice, Bruna e André, que, sobretudo, são meus amigos do coração. Sem eles não teria conseguido realizar este trabalho de forma satisfatória.

Agradeço à toda a equipe dos departamentos de Morfologia e Patologia, de Engenharia Química e de Genética e Evolução, que sempre estiveram à disposição quando eu precisei. Em especial à Regina e ao Paulo, que são técnicos e amigos maravilhosos.

Agradeço à Secretária do PPGGEV, Ivanildes, que sempre esteve à disposição com muita paciência e empenho em ajudar.

Agradeço, em especial, ao meu namorado, Vinícius, que sempre me deu força e foi meu principal ponto de apoio.

Agradeço à minha família: minha mãe Nisabel, meu pai José Antonio, meu irmão Juliano, minha cunhada Daniela e a família do Vinícius. Minha vida não teria sentido sem eles. Agradeço pela confiança e pelo apoio nas decisões tomadas.

Agradeço à Capes – Código de Financiamento 001 - pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização desse trabalho.

RESUMO

O câncer colorretal é a terceira doença maligna mais diagnosticada e a quarta principal causa de mortes relacionadas ao câncer no mundo. Os tratamentos contra o câncer não se mostram totalmente eficazes e a baixa seletividade ao tecido tumoral traz efeitos colaterais marcantes, por isso a importância de estudos que buscam novas alternativas para o tratamento dessa doença. Neste trabalho foi utilizada uma linhagem atenuada de *Salmonella* como vetor bacteriano vivo, a qual apresenta preferência por invadir o microambiente tumoral e nele produzir as proteínas heterólogas com potencial imunoterapêutico. Os objetivos se pautaram em desenvolver plasmídeos e inseri-los na *Salmonella* atenuada SL3261, contendo os genes que codificam o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) e a Interleucina 2 (IL-2); e avaliar, *in vitro* e *in vivo*, o potencial antitumoral dessas linhagens em tumor colorretal (linhagem HCT-8). A confirmação da construção e expressão das proteínas foi realizada em eletroforese, Western Blot e ELISA, com anticorpos monoclonais anti-TRAIL e anti-IL-2. O efeito em HCT-8 foi determinado pelo teste de citotoxicidade (MTT), reação de Griess e ensaio de apoptose (Anexina V). Para analisar a progressão tumoral *in vivo*, camundongos receberam células tumorais e, após a implantação do tumor, foram tratados com as linhagens construídas. O tamanho dos tumores foi calculado a cada três dias e o peso dos tumores foi determinado após a eutanásia. Os resultados demonstraram que a construção do vetor de expressão se mostrou eficaz e as proteínas foram expressas pela SL3261. Os testes *in vitro* mostraram diminuição da viabilidade e aumento da morte celular nos grupos tratados com as linhagens SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2 quando comparados aos grupos controles, e houve produção de óxido nítrico. Em relação aos testes *in vivo*, os tratamentos com SL3261, SL3261_TRAIL e SL3261_MIX (TRAIL + IL-2) apresentaram efeito antitumoral neste modelo, uma vez que apresentaram tumores diminuídos em relação ao controle não tratado, 14 dias após o tratamento. Assim, sugere-se que TRAIL e IL-2, expressas por SL3261, apresentam efeito antitumoral no modelo de câncer colorretal, propondo uma possível imunoterapia contra esse tipo de tumor.

Palavras-chave: Imunoterapia; *Salmonella* SL3261; TRAIL, Interleucina-2, vetor bacteriano vivo.

ABSTRACT

Colorectal cancer is the third most diagnosed malignant disease and the fourth leading cause of cancer-related deaths in the world. Cancer treatments are not fully effective and low selectivity to tumor tissue has marked side effects, so there is a high importance of studies that seek new alternatives for the treatment of this disease. In this work we use an attenuated strain of *Salmonella* as a live bacterial vector, which prefers to invade the tumor microenvironment and can produce heterologous proteins with immunotherapeutic potential. The objectives were to develop plasmids and insert them into the attenuated *Salmonella* SL3261, containing the genes that encode tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Interleukin 2 (IL-2); and evaluate, *in vitro* and *in vivo*, the antitumor potential of these strains in colorectal tumor (HCT-8 strain). Confirmation of protein construction and expression was done by electrophoresis, Western Blot and ELISA, with anti-TRAIL and anti-IL-2 monoclonal antibodies. The effect on HCT-8 was determined by the cytotoxicity test (MTT), Griess reaction and apoptosis assay (Annexin V). To analyze tumor progression *in vivo*, mice received tumor cells and, after tumor implantation, were treated with the constructed strains. Tumor size was calculated every three days and tumor weight was determined after euthanasia. The results demonstrated that the expression vector construction was effective and the proteins were expressed by SL3261. *In vitro* tests showed decreased viability and increased cell death in groups treated with SL3261_TRAIL and SL3261_IL-2 when compared to control groups, and nitric oxide production. Regarding the *in vivo* tests, the SL3261, SL3261_TRAIL and SL3261_MIX (TRAIL + IL-2) treatments showed antitumor effect in this model, since they presented decreased tumors compared to the untreated control 14 days after treatment. Thus, it is suggested that TRAIL and IL-2, expressed by SL3261, have antitumor effect in the colorectal cancer model, proposing a possible immunotherapy against this type of tumor.

Keywords: Immunotherapy; *Salmonella* SL3261; TRAIL, Interleukin-2, live bacterial vector.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER.....	10
1.2 CÂNCER DE CÓLON E RETO (COLORRETAL)	13
1.3 TRATAMENTOS E SUAS LIMITAÇÕES	16
1.4 USO DE BACTÉRIAS CONTRA O CÂNCER	18
1.5 <i>Salmonella</i> COMO VETOR BACTERIANO VIVO	25
1.6 ASPECTOS GERAIS DA <i>Salmonella</i> E LINHAGEM SL3261	27
1.7 TRAIL – LIGANTE INDUTOR DE APOPTOSE RELACIONADO AO TNF	29
1.8 INTERLEUCINA – 2.....	35
1.9 MODELOS EXPERIMENTAIS EM ESTUDOS SOBRE O CÂNCER	38
2. OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVO GERAL	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO	43
3.1.1 Obtenção das sequências nucleotídicas e fusão com marcador fluorescente	43
3.1.2 Plasmídeo de expressão em <i>Salmonella</i>	44
3.1.3 Análise do sítio de múltipla clonagem e de restrição	44
3.1.4 Transformação de <i>E. coli</i> com os plasmídeos pUC57kan_IL-2 e pUC57kan_TRAIL.....	45
3.1.5 Extração plasmidial.....	45
3.1.6 Digestão com enzimas de restrição	46
3.1.7 Subclonagem dos insertos no vetor de expressão	46
3.1.8 Preparação do estoque de SL3261 eletrocompetente.....	47
3.1.9 Transformação da SL3261 com os plasmídeos pAE_IL-2 e pAE_TRAIL ..	47
3.2 PRODUÇÃO DE TRAIL E IL-2 PURIFICADAS	48
3.2.1 Ligação dos insertos ao vetor de expressão pET28a	48
3.2.2 Transformações de <i>E. coli</i> DH5 α	48
3.2.3 Transformações de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	49
3.2.4 Expressão heteróloga e purificação por cromatografia de afinidade	49
3.3 ANÁLISES DE EXPRESSÃO DE TRAIL E IL-2	50
3.3.1 Análise por SDS-PAGE	50
3.3.2 Análise das proteínas do sobrenadante dos cultivos por Western blot.....	50

3.3.3	Análise de produção das proteínas por ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)	51
3.3.4	Detecção por fluorescência da expressão das proteínas TRAIL e IL-2 fusionadas à EmGFP e YFP	52
3.4	ENSAIOS <i>in vitro</i> COM CÉLULAS TUMORAIS HCT-8	52
3.4.1	Cultivo de HCT-8	52
3.4.2	Ensaio de citotoxicidade	52
3.4.3	Avaliação da produção de óxido nítrico durante a exposição da HCT-8 ao sobrenadante dos cultivos bacterianos.....	53
3.4.4	Determinação de apoptose por Citometria de fluxo	54
3.5	ENSAIOS <i>in vivo</i> COM CAMUNDONGOS BALB/c E BALB/c NUDE	55
3.5.1	Determinação das curvas de crescimento das linhagens de SL3261	55
3.5.2	Animais	56
3.5.3	Inoculação oral de SL3261 em BALB/c	56
3.5.4	Inserção do tumor em BALB/c NUDE	56
3.5.5	Inoculação intratumoral de SL3261 em BALB/c NUDE	57
3.5.6	Acompanhamento do tamanho e peso do tumor	57
3.5.7	Quantificação de citocinas TNF, IL-12 e IFN- γ	57
3.5.8	Contagem de células globais e diferenciais	58
3.5.9	Biodistribuição	58
3.5.10	Histologia do tumor	58
3.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1	CONSTRUÇÃO DAS LINHAGENS SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2.....	60
4.1.1	Confirmação das construções sintetizadas em pUC57-kan e retirada dos insertos	60
4.1.2	Confirmação das construções pAE_TRAIL e pAE_IL-2.....	60
4.1.3	Produção de TRAIL e IL-2 purificadas	61
4.2	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS TRAIL e IL-2 PELA SL3261 ..	62
4.2.1	Análise da expressão heteróloga por SDS-PAGE e Western blot	62
4.2.2	Análise das proteínas do sobrenadante dos cultivos por ELISA.....	63
4.2.3	Detecção e Emissão de fluorescência	65
4.3	AValiação DO EFEITO <i>in vitro</i> COM A LINHAGEM TUMORAL HCT-8.....	66
4.3.1	Citotoxicidade	66
4.3.2	Produção de óxido nítrico induzido pelas proteínas TRAIL e IL-2	69
4.3.3	Detecção de Anexina V	72

4.4. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE SL3261_IL-2 e SL3261_TRAIL	74
4.5. ENSAIOS <i>in vivo/ex vivo</i>	75
4.5.1. Testes com as linhagens produzidas em camundongos BALB/c	75
4.5.1.1 Avaliação da produção de TNF e IL-12 no plasma de camundongos BALB/c	75
4.5.1.2 Perfil celular em camundongos BALB/c inoculados com SL3261	77
4.5.2 Modelo murino em BALB/c NUDE de câncer colorretal.....	78
4.5.2.1 Progressão tumoral pós tratamento com as diferentes linhagens de SL3261 e dose de 5×10^7 UFC/mL.....	78
4.5.2.2 Progressão tumoral pós tratamento com SL3261_TRAIL e SL3261_MIX com a dose de 1×10^7 UFC/mL.....	81
4.5.2.3 Avaliação da produção de TNF, IL-12 e IFN- γ no plasma e LCP	85
4.5.2.4 Perfil celular global e diferencial no sangue	88
4.5.2.5 Análise da presença de TRAIL e IL-2 circulantes.....	89
4.5.2.6 Análise histológica do tumor.....	90
4.5.3 Biodistribuição de <i>S. Typhimurium</i> - SL3261	92
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO	95
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	109
ANEXO 2 – Sequência de YFP + IL-2 e tradução da proteína.....	110
ANEXO 3 – Sequência de EmGFP + TRAIL e tradução da proteína.....	112

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imunovigilância X imunoeedição	11
Figura 2 – Mecanismos de evasão do sistema imune.....	11
Figura 3 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.	14
Figura 4 - Progressão do pólipo colorretal para o câncer	15
Figura 5 - Mecanismos terapêuticos bacterianos	22
Figura 6 – Representação esquemática da secção transversal de um tumor sólido evidenciando a diminuição da concentração de oxigênio em relação à distância dos vasos sanguíneos	24
Figura 7 - Sinalização apoptótica através da via do ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral - TRAIL.....	31
Figura 8 - Sistemas de receptor TRAIL humano e de camundongo.....	33
Figura 9 - Efeitos antitumorais da IL-2.....	36
Figura 10 - Plasmídeo pAE.....	45
Figura 11 - Plasmídeo pET28a.....	48
Figura 12 - Análise de restrição dos vetores e esquema representativo – pUC57-kan	60
Figura 13 - Análise de restrição dos vetores e esquema representativo - pAE	61
Figura 14 - Análise de restrição dos vetores e géis da purificação de TRAIL e IL-2	62
Figura 15 - Análise da expressão de TRAIL e IL-2 recombinantes	63
Figura 16 - Análise de produção das proteínas por ELISA.....	64
Figura 17 - Emissão de fluorescência	65
Figura 18 - Viabilidade celular da linhagem HCT-8 após 24, 48 e 72 horas de exposição ao sobrenadante da SL3261	67
Figura 19 - Comparação da porcentagem de viabilidade celular da linhagem HCT-8 após 24, 48 e 72 horas de exposição às proteínas TRAIL e IL-2 purificadas	68
Figura 20 - Produção de NO e Viabilidade celular.....	70
Figura 21 – Determinação da apoptose	73
Figura 22 - Curvas de crescimento celular de SL3261_IL-2 e SL3261_TRAIL	75
Figura 23 - Dosagem de IL-12 e TNF no sangue de animais BALB/c inoculados com SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2.	76
Figura 24 – Perfil celular.....	77
Figura 25 - Imagens representativas de animais BALB/c NUDE de cada grupo e sobrevida.....	79
Figura 26 – Desenvolvimento tumoral	82

Figura 27 – Análise da produção de TNF e IL-12 no sangue e no LCP	86
Figura 28 – Análise da produção de IFN- γ no sangue e no LCP.....	87
Figura 29 – Perfil celular.....	88
Figura 30 – Análise de TRAIL e IL-2 no sangue.....	89
Figura 31 - Fotomicrografias de cortes de tumor.....	91
Figura 32 - Fotomicrografias de cortes de tumor com <i>Salmonella</i>	92
Figura 33 – Biodistribuição no tumor, baço e fígado	93

1. INTRODUÇÃO

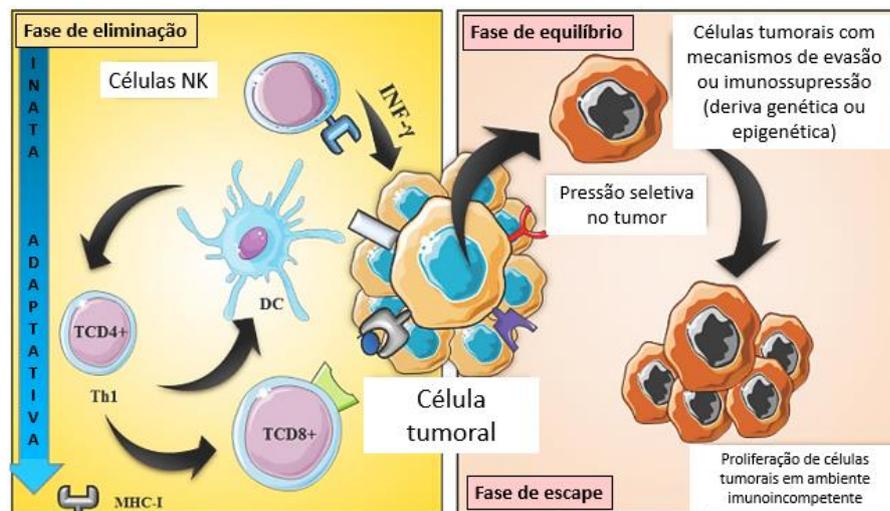
1.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

O câncer é uma doença multifatorial e representa uma das principais causas de morte no mundo. Os fatores que contribuem para seu desenvolvimento incluem antecedentes genéticos específicos, exposição crônica a vários estresses ambientais, dieta inadequada, entre outros. Todos esses fatores de risco levam ao acúmulo de alterações moleculares ou mutações importantes que contribuem para o início da carcinogênese em um determinado tecido (PADMA, 2015).

O câncer surge a partir de células que sofrem uma sequência de mutações ou alterações genéticas que favorecem seu crescimento indiferenciado e descontrolado, permitindo invasão de tecidos adjacentes ou ainda o desenvolvimento de metástases. Diferentes fatores podem levar a essas alterações genéticas, sendo tanto intrínsecos, como erros aleatórios na replicação do DNA ou mutações genéticas herdadas; quanto extrínsecos, como danos e instabilidade genética induzida por radiação, por substâncias químicas ou por infecção viral (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010). O envelhecimento é outro fator fundamental para o desenvolvimento do câncer. A incidência de câncer aumenta drasticamente com a idade, sobretudo devido a tendência de mecanismos de reparação celular serem menos eficazes à medida que há um envelhecimento (WHO, 2019).

O sistema imunológico pode reconhecer e eliminar células anormais, em um processo contínuo e bidirecional entre a imunidade inata e adaptativa, que é chamada de "Imunovigilância". Células *natural killer* (NK), linfócitos T citotóxicos (TCD8⁺) e macrófagos são os principais mediadores nesse processo. O câncer pode se tornar clinicamente detectável em estágios avançados, em que as células tumorais escapam da vigilância imune. Essa teoria relaciona processo de "imunoedição", em que o sistema imunológico funciona inversamente: criando um ambiente imunossuprimido que favorece o crescimento do tumor. Conforme mostrado na figura 1, esse processo é composto por três fases: eliminação, equilíbrio e fuga. A fase de eliminação possui mecanismos homólogos àqueles observados na vigilância imunológica (TORRES et al., 2018).

Figura 1 - Imunovigilância X imunoeedição



Principais pontos da regulação do sistema imunológico na progressão/regressão tumoral. Imunoeedição compreende 3 fases: **A - eliminação**: quando as células tumorais começam a proliferar, uma resposta inflamatória é induzida pelo tecido lesionado. Isso causa a migração de células do sistema imunológico, orquestrando a resposta imune inata; **B – fase de equilíbrio**: esse processo contínuo produz uma pressão seletiva nessas células que pode causar rearranjo genético ou epigenético, fazendo com que certas células evitem esses mecanismos efetores imunológicos; **C – fase de escape**: quando as células que escaparam desses mecanismos também ganham capacidade de crescimento descontrolada. DC: células dendríticas; MHC: complexo principal de histocompatibilidade; NK: *Natural Killer*. **Fonte:** (TORRES et al., 2018).

Segundo a revisão de Hanahan e Weinberg (2011), existem alterações na fisiologia celular que são fundamentais no processo de transformação de uma célula normal em tumoral (figura 2). As características do câncer compreendem seis capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento em múltiplos passos de tumores. Estão incluídas: sustentação da sinalização proliferativa, evasão de supressores de crescimento, evasão de apoptose, potencial replicativo ilimitado, indução de angiogênese e invasão tecidual e metástase. Na última década houve um progresso desses conceitos que acrescentou duas marcas a essa lista: a reprogramação do metabolismo energético e a evasão da destruição imunológica. Subjacente a essas características estão a instabilidade do genoma, que gera a diversidade genética e que acelera suas aquisições, e a inflamação, que promove múltiplas alterações de funções (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 2 – Mecanismos de evasão do sistema imune



Capacidades funcionais adquiridas do câncer que permitem a sobrevivência, proliferação e disseminação de células tumorais. **Fonte:** (HANAHAN; WEINBERG, 2011 - modificado).

O tumor é um tecido complexo, em que a homeostasia tecidual original é prejudicada e células normais são forçadas a funcionar de acordo com a nova dinâmica tecidual, coordenada pelas células cancerígenas. Cada uma das alterações, advindas de diferentes mecanismos moleculares, torna a célula mais apta a superar diferentes estratégias de combate ao desenvolvimento tumoral, que é intrínseco às células e tecidos. Sendo assim, o acúmulo dessas alterações contribui à crescente malignidade do câncer (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

Embora a gênese do câncer seja representada pelas células mutadas (ou cancerígenas), considerar o tumor sendo composto apenas por essas células não é mais admitido como correto. Atualmente, são levadas em consideração outras células, tecidos e substâncias que também fazem parte do microambiente tumoral, que interagem células geneticamente alteradas, como: células normais (como fibroblastos, células imunes, células endoteliais), vasos, e substâncias produzidas localmente ou provenientes da irrigação sanguínea. De fato, estudos recentes mostram que células não-cancerígenas têm importante participação na progressão tumoral, como: angiogênese, metástase e proliferação celular (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e estima-se que tenha sido responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018. Câncer de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado são os tipos mais comuns de câncer em

homens, enquanto mama, colorretal, pulmão, colo do útero e de tireoide são os mais comuns entre as mulheres (WHO, 2019).

De maneira geral, as maiores taxas de incidência são observadas em países desenvolvidos, taxas intermediárias na América do Sul e Central, no Leste Europeu e em grande parte do Sudeste Asiático, e taxas menores em grande parte da África e no Sul e Oeste da Ásia (INCA, 2017). Em países desenvolvidos predominam os tipos de câncer associados à urbanização e ao desenvolvimento (pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto). Já nos países de baixo e médio desenvolvimentos, tipos de câncer associados a infecções (colo do útero, estômago, esôfago, fígado) têm alta ocorrência (FERLAY et al., 2015).

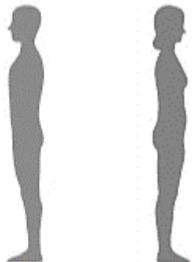
Globalmente, cerca de uma em seis mortes é devida ao câncer. O impacto econômico do câncer é significativo e está aumentando, sendo o custo econômico anual em 2010 estimado em aproximadamente US\$ 1,16 trilhão (WHO, 2019).

1.2 CÂNCER DE CÓLON E RETO (COLORRETAL)

O câncer colorretal é a terceira doença maligna mais comumente diagnosticada e a quarta principal causa de mortes relacionadas ao câncer no mundo. Sua incidência deverá aumentar em 60%, representando mais de 2,2 milhões de novos casos e 1,1 milhão de mortes por câncer até 2030 (ARNOLD et al., 2016). Sendo assim, o câncer de cólon e reto possui relevância epidemiológica em âmbito mundial, tendo representado 1,4 milhão de casos novos e quase 700 mil óbitos em 2012. A incidência difere entre os sexos, com taxas de 20,6/100 mil para os homens e de 14,3/100 mil para as mulheres. Uma grande variação geográfica tem sido observada, com taxas elevadas nos países mais desenvolvidos comparados àqueles menos desenvolvidos (FERLAY et al., 2015).

Segundo a estimativa do INCA em 2018, no Brasil estima-se 36.360 novos casos de câncer de cólon e reto, sendo 17.380 em homens e 18.980 em mulheres, para cada ano do biênio 2018-2019 (figura 3). Esses valores representam um risco estimado de 16,83 casos novos a cada 100 mil homens e 17,90 para cada 100 mil mulheres. Trata-se do terceiro tipo de câncer mais frequente em homens e o segundo nas mulheres.

Figura 3 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma, no Brasil.

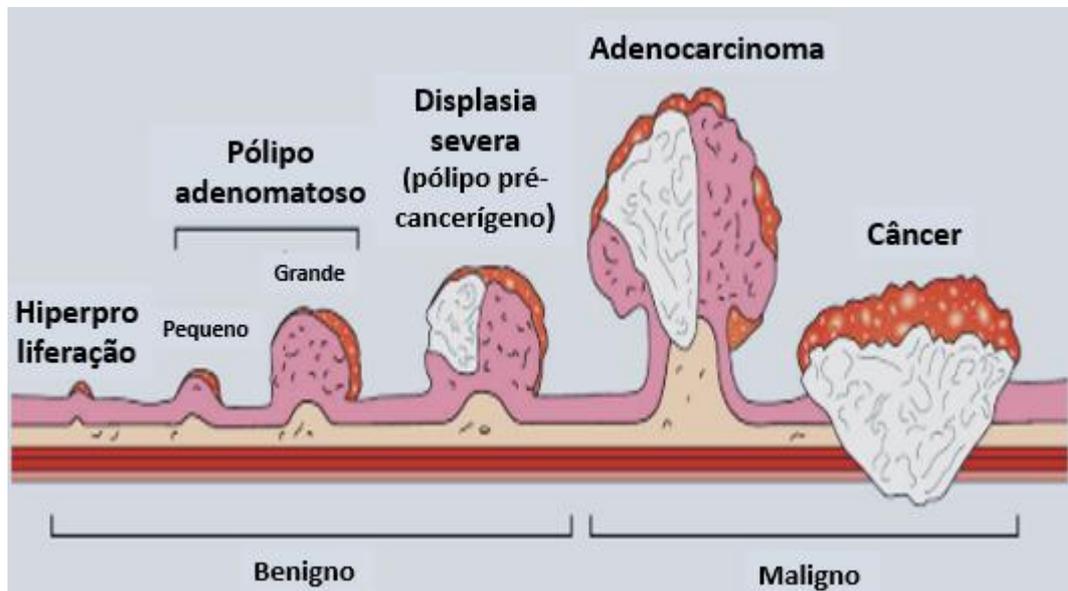
Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Homens Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: (INCA, 2017).

Apesar de muito progresso, não há uma elucidação completa da patogênese do câncer colorretal. A visão é que a maioria dos cânceres colorretais surgem a partir de precursores adenomatosos em que há mutações de ganho de função em proto-oncogenes e mutações de perda de função em genes supressores de tumor, propiciando o início de lesões adenomatosas podendo progredir para carcinoma (HINOI et al., 2007). A grande maioria dos cânceres colorretais malignos surgem a partir de pólipos adenomatosos benignos (figura 4) ao longo de várias décadas, de modo que o pico de incidência de carcinoma colorretal ocorre entre as idades de 60 a 80 anos (JOHNSON; FLEET, 2013) .

Figura 4 - Progressão do pólipo colorretal para o câncer



Fonte: (THRUMURTHY et al., 2016 - modificado)

O câncer colorretal é uma doença multifatorial influenciada por fatores ambientais, genéticos e relacionados ao estilo de vida. Em relação à hereditariedade, o histórico familiar de câncer de cólon e reto (polipose adenomatosa familiar e câncer colorretal hereditário sem polipose), de doenças inflamatórias do intestino (retocolite ulcerativa crônica e doença de Crohn) e histórico pessoal de câncer (intestino, ovário, útero ou mama) representam fatores observados na carga global da doença. Diferenças na incidência de acordo com áreas geográficas se devem possivelmente a adoção de hábitos de vida ocidentais. Os fatores que oferecem maior risco de desenvolvimento de câncer do colorretal são: idade igual ou acima de 50 anos, excesso de peso corporal e alimentação não saudável (dieta pobre em vegetais, frutas e fibras). O consumo de carnes processadas e a ingestão excessiva de carne vermelha (acima de 500 gramas de carne cozida por semana) também aumentam o risco para este tipo de câncer. Outros importantes fatores de risco ligados ao estilo de vida incluem: consumo de bebidas alcoólicas, o tabagismo e pouca prática de atividade física (INCA, 2017).

Outros fatores devem ser considerados em relação ao desenvolvimento do câncer colorretal. Em sua revisão, Bishehsari et al. (2014) citam a influência de alterações epigenéticas. Mudanças no padrão de metilação do DNA, nas histonas e em RNAs não-codificantes, principalmente envolvidos na regulação pós-

transcricional, podem afetar os padrões de expressão gênica independente ou em combinação com padrões herdados, ou alterar a sequência de DNA, causando mutações que propiciam o câncer. Outro fator abordado é a influência da microbiota intestinal, que também desempenha um papel importante, pois é responsável pela manutenção das funções imunes da mucosa e no balanceamento de sinais pró e anti-inflamatórios, influenciando na patogênese desse tipo de câncer (BISHEHSARI et al., 2014).

Um aspecto desfavorável desse quadro é seu desenvolvimento silencioso, pois leva a um diagnóstico tardio. Isso ocorre devido ao longo período em que as lesões e o tumor permanecem assintomáticos. Os tumores devem ser detectados precocemente para que haja um melhor prognóstico. Os principais exames são: pesquisa de sangue oculto nas fezes e endoscopias (colonoscopia ou retossigmoidoscopias). Esses exames devem ser realizados nas pessoas pertencentes a grupos de maior risco ou quando há sinais e sintomas sugestivos de câncer colorretal. Para um diagnóstico final é necessário que uma biópsia seja realizada e caso se trate de um tumor, a cirurgia é indicada para que haja retirada da parte afetada do intestino e os nódulos próximos à região (INCA, 2017).

Há uma tendência de aumento nos casos de câncer colorretal em países em desenvolvimento. Isso ocorre devido a um crescente avanço econômico que leva à adoção de um estilo de vida ocidental, como mudança de hábitos alimentares com maior ingestão de carne, gordura e calorias totais. Além disso, o aumento da expectativa de vida e crescimento populacional também devem ser considerados (BISHEHSARI et al., 2014).

1.3 TRATAMENTOS E SUAS LIMITAÇÕES

A ineficácia do sistema imunológico em combater a progressão do tumor, apesar de evidências claras de imunogenicidade do tecido tumoral, ainda hoje é um importante obstáculo na terapia contra o câncer. Existem amplas provas de que a presença de células T específicas do tumor em circulação ou em nódulos linfáticos infiltrados com tumor é, muitas vezes, insuficiente ou ineficazes para conter o crescimento tumoral (AL-RAMADI et al., 2009).

Em relação ao câncer colorretal, quando detectado em estágios precoces, normalmente é tratado por cirurgias curativas, sendo aplicada a quimioterapia de

forma adjuvante em estágios mais tardios. De forma resumida, o tratamento do câncer colorretal consiste em: ressecção cirúrgica curativa em pacientes diagnosticados em estágios iniciais da doença (localizada); ressecção cirúrgica do tumor acompanhada ou não de quimioterapia adjuvante quando há acometimento de tecidos ao redor porém sem envolvimento linfático; e ressecção cirúrgica do tumor seguida de quimioterapia adjuvante quando em estágios avançados, com envolvimento nodular linfático ou com presença de metástases em outros órgãos (HECTOR; PREHN, 2009). Embora a cirurgia com fins curativos seja o tratamento de forma primária, não é possível sua realização em cerca de 25% dos pacientes e mesmo quando a cirurgia é realizada retirando todo o tecido tumoral, recorrências intra-abdominais e/ou distantes se desenvolvem em mais de um terço dos casos (ASCHELE; BERGAMO; LONARDI, 2009).

Atualmente, o tratamento contra o câncer utiliza radioterapia e quimioterapia. Estes não se mostram totalmente eficazes e metástases continuam aparecendo como a principal causa de morte por essa doença. A baixa seletividade desse tipo de tratamento para células tumorais reduz marcadamente o benefício destas terapias. O mecanismo de ação baseado nesse processo não pode fornecer citotoxicidade limitada ao tecido tumoral, resultando em efeitos secundários devastadores, uma vez que as células saudáveis estão igualmente expostas. Uma imunoterapia seletiva contra o câncer deve ultrapassar estes obstáculos e a inibição de metástases aparece como importante alvo para esse tipo de terapia (CHOROBK; MARCINKIEWICZ, 2011).

A maioria das quimioterapias padrão de câncer tem eficácia limitada devido à resistência a múltiplas drogas, que torna o tratamento de cânceres em estágio avançado problemático e muitas vezes malsucedido. A resistência a múltiplos fármacos, que reduz significativamente a eficácia da maioria das terapias contra o câncer, é causada por dois mecanismos: penetração limitada do fármaco e baixa sensibilidade celular (KASINSKAS; FORBES, 2007). Trata-se de mecanismos de nível tecidual que surgem devido a microambientes heterogêneos dentro de tumores sólidos. Vasculatura caótica, grandes distâncias intercapilares e fluxo sanguíneo variável criam diferentes regiões: células com alta perfusão e com proliferação rápida; células pouco alcançadas e, portanto, quiescentes; e células avasculares, sendo necróticas ou apoptóticas. A má perfusão limita a concentração de quimioterápicos veiculados pelo sangue, que devem penetrar em uma distância maior através do

tecido intersticial para alcançar células cancerígenas em concentrações suficientes para serem efetivamente citotóxicas. A maioria dos quimioterápicos tem como alvo células de câncer de crescimento rápido e possuem eficácia limitada em células quiescentes que estão distantes da rede vascular. As regiões expostas a concentrações mais baixas de agentes terapêuticos são menos sensíveis a seus efeitos, reduzindo significativamente a eficácia do medicamento (KASINSKAS; FORBES, 2006).

As limitações das terapias antitumorais convencionais, como a alta toxicidade para as células normais do tecido, a incapacidade de tratar tecidos tumorais profundos e a possibilidade de produzir resistência a drogas em células tumorais, levaram à busca de abordagens alternativas (LIANG et al., 2019).

Nesse cenário, os anaeróbios facultativos móveis, que incluem *Salmonella Typhimurium*, têm o potencial de superar a resistência a múltiplas drogas pois podem penetrar ativamente no tecido tumoral e vencer as limitações de difusão passiva, pois podem atacar as células tumorais quiescentes que não são alcançadas nas quimioterapias padrão (KASINSKAS; FORBES, 2006, 2007). Existe essa barreira para o fornecimento de drogas antitumorais convencionais devido a organização irregular dos vasos sanguíneos dentro do tecido tumoral, que frequentemente leva ao desenvolvimento de regiões com hipóxia e/ou necróticas (SILVA-VALENZUELA et al., 2016), porém bactérias podem ser observadas nessas regiões (KASINSKAS; FORBES, 2007).

1.4 USO DE BACTÉRIAS CONTRA O CÂNCER

Bactérias constituem o reino dos microrganismos procarióticos. Normalmente, com alguns micrômetros de comprimento, as bactérias têm uma ampla gama de formas, variando de formas de bastões e espirais. A princípio, os microrganismos eram considerados agressores primários que governavam a interação patógeno-hospedeiro, resultando em doença. Posteriormente, novas informações sobre os atributos microbianos e seus hospedeiros resultaram no entendimento de que a interação do patógeno-hospedeiro nem sempre resulta em doença e não é necessariamente maléfica ao hospedeiro (MOHITE; SURVE; KARPE, 2015). Nesse sentido, uma das abordagens descobertas foi o uso de bactérias vivas visando diminuição ou desaparecimento do tecido tumoral.

A prática do uso de bactérias para terapia contra o câncer remonta ao século XIX. Os médicos alemães W. Busch e F. Fehleisen observaram que certos tipos de câncer regrediram após a infecção acidental por *Streptococcus pyogenes*, ocorrida durante a hospitalização de pacientes (MOHITE; SURVE; KARPE, 2015). Em 1893, William Coley, um médico de Nova York, após observar o mesmo padrão em seus pacientes, preparou uma mistura filtrada de bactérias e lisados bacterianos, composta por *Streptococcus pyogenes* e *Serratia marcescens*, e chamou de "Toxina de Coley". Ele descobriu que, em alguns casos, os tumores regrediam quando a toxina de Coley era injetada neles (COLEY, 1893). Mais tarde, ele desenvolveu uma terapia segura, uma mistura de *S. pyrogenes* e *S. marcescenes* mortos pelo calor, para tratar com sucesso o sarcoma, o carcinoma, o linfoma, o melanoma e o mieloma. Esses procedimentos praticados por Coley formaram a base dos recentes avanços na imunoterapia do câncer usando cepas bacterianas atenuadas. Hoje, as espécies mais comuns de bactérias usadas como agentes imunoterapêuticos são: *Clostridium novyi*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (daqui em diante referida como *Salmonella* Typhimurium). Pensa-se que a infecção de tumores pouco antigênicos por bactérias anaeróbias facultativas aumenta a sua antigenicidade. (KAIMALA et al., 2018).

Apesar das curas e melhorias notáveis obtidas em pacientes tratados com a terapia bacteriana de Coley, seu chefe, o renomado patologista James Ewing, forçou o Dr. Coley a encerrar todos os projetos envolvendo tratamentos bacterianos alegando dados inconsistentes e pronunciando-se a favor da radioterapia, que rapidamente assumiu o mercado da terapêutica do câncer (KRAMER et al., 2018). Após a morte de Coley em 1936, houve a introdução de tratamentos de câncer com radioterapia e o ganho de aceitação da quimioterapia. Ambos os tratamentos eram mais facilmente padronizados, porém iam contra a imunoterapia por serem altamente imunossupressores. Durante a Segunda Guerra Mundial, o aumento do uso de antibióticos diminuiu as infecções pós-cirúrgicas e a gravidade/duração das infecções. Além disso, antitérmicos entraram em uso rotineiro para eliminar os sintomas desconfortáveis da resposta imune.

Em vista disso, essas estratégias, que antes eram utilizadas no processo de combate ao câncer quando havia infecção por bactéria, acabaram acontecendo cada vez menos. Em comparação com as taxas de sobrevivência de 10 anos de sucessos anteriores, usando o regime de Coley para o tratamento de câncer, os pacientes que

receberam terapias convencionais modernas não se saíram melhor do que os pacientes que receberam tratamento iniciado por Coley há mais de 100 anos (MOHITE; SURVE; KARPE, 2015).

Durante os estudos com bactérias parecia que, se nem o câncer nem a infecção estivessem muito avançados, ainda que a infecção tivesse gravidade ou duração suficientes, alguns tumores desapareceram completamente e os pacientes permaneceram livres de recorrência. No entanto, esses estudos eram controversos, porque eram difíceis de reproduzir e não cumpriam os padrões para ensaios clínicos. Evidências subsequentes em camundongos com tumores indicaram que pelo menos alguns dos efeitos antitumorais das infecções bacterianas poderiam, de fato, ter reduzido o tamanho do tumor e, em parte, os efeitos pareciam ter sido mediados pela estimulação do sistema imune do hospedeiro.

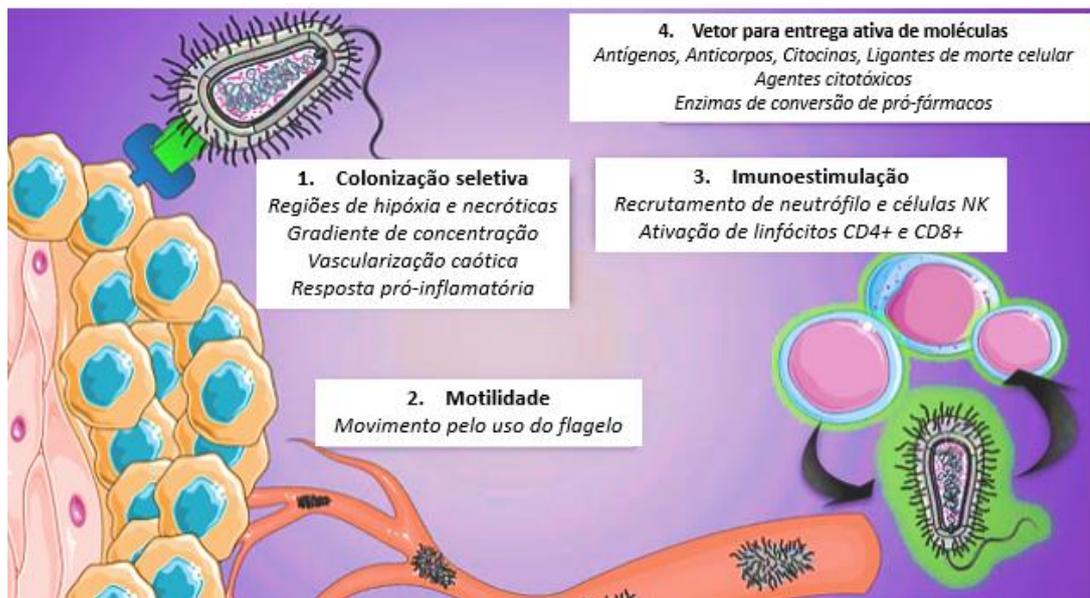
Estudos relatam que a endotoxina (lipopolissacarídeo - LPS) de bactérias gram-negativas desencadeia a liberação do fator de necrose tumoral (TNF) por células do sistema imunológico iniciando uma cascata de reações mediadas por citocinas, culminando na destruição de células tumorais (CARSWELL et al., 1975). Posteriormente, os adjuvantes bacterianos mostraram estar estimulando o sistema imunológico em pacientes com câncer. Hoje, esses e muitos outros estudos culminaram na vasta pesquisa sobre imunoterapia do câncer, do qual William Coley é geralmente reconhecido como o fundador (PAWELWK; LOW; BERMUDES, 2003).

Nas últimas décadas, um ressurgimento do campo ocorreu e pesquisadores contemporâneos demonstraram a eficácia de diversas bactérias vivas atenuadas em destruir células tumorais *in vitro* (LIANG et al., 2019). A partir daí foram descobertas características como: acumulação seletiva no tumor, replicação e destruição de tumores em roedores, indução de uma resposta antitumoral mediada pelo sistema imunológico e direcionamento para pequenos nódulos metastáticos espalhados no organismo, inibindo seu crescimento. Resultados promissores foram obtidos utilizando métodos modernos de genética bacteriana, biologia molecular, cultivos de células tumorais e aquisição de imagens *in vivo*. O mecanismo de ação da terapia bacteriana do câncer e da toxicidade *in vivo* ainda não é completamente entendido e a aquisição potencial de resistência a antibióticos ou mutações, que reverteriam o fenótipo atenuado de bactérias, poderia ser um risco para os pacientes. Portanto, a construção de um quadro amplo e integrado requer uma visão científica e médica crítica, visando avanços ainda mais consistentes nessa área (KRAMER et al., 2018).

Embora, o uso de bactérias como terapêutica remonte a mais de um século, os recentes avanços na biologia sintética estão tornando o uso clínico de bactérias geneticamente manipuladas, como terapêuticas e diagnósticos "inteligentes", uma realidade. As bactérias interagem intimamente com o seu nicho no corpo humano, respondem a uma série de doenças e estão bem sintonizadas pela evolução no sentido de detectar e produzir níveis fisiológicos de biomoléculas de interesse. É a combinação dessas características com as habilidades dos sistemas vivos, como a quimiotaxia e a secreção de biomoléculas, que podem permitir que os sistemas bacterianos modificados superem os diagnósticos e terapias tradicionais (RIGLAR; SILVER, 2018). Além disso, há evidências de que alguns componentes bacterianos, como as exotoxinas, podem iniciar atividades antitumorais não apenas pela ativação indireta do sistema imunológico, mas também por sua ação direta nas células tumorais (ZHAO et al., 2005).

As bactérias exibem uma série de características que podem ser relevantes na terapia contra o câncer (figura 5). As propriedades antitumorais direta e imunomediada derivam de interações biológicas entre as bactérias e o microambiente tumoral do hospedeiro. Características importantes das bactérias, tais como motilidade, quimiotaxia tumoral, capacidade invasiva, potencial citotóxico, composição e abundância de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP), entre outras, variam entre as cepas e podem afetar a forma como desencadeiam a resposta antitumoral. Além disso, genes específicos envolvidos no processo de colonização tumoral preferencial após inoculação de bactérias na forma sistêmica também foram identificados (SILVA-VALENZUELA et al., 2016).

Figura 5 - Mecanismos terapêuticos bacterianos



Diferentes características bacterianas que podem ser exploradas em novas terapias contra o câncer.

Fonte: (TORRES et al., 2018 - modificado).

Diferentes variantes dos gêneros *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Lactococcus*, *Shigella*, *Vibrio*, *Listeria*, *Escherichia* e *Salmonella* foram testados em modelos animais de câncer (FELGNER et al., 2017; FORBES, 2010; KRAMER et al., 2018; PAWELWK; LOW; BERMUDES, 2003).

Hoje, com a descoberta de cepas bacterianas que visam especificamente tumores, e auxiliado por sequenciamento genômico e engenharia genética, há um novo interesse no uso de bactérias como vetores tumorais. *Bifidobacterium*, *Clostridium* e *Salmonella* mostraram se replicar preferencialmente dentro de tumores sólidos quando injetados a partir de um local distante e os três tipos de bactérias foram usados para transportar e amplificar genes que codificam agentes terapêuticos, como enzimas conversoras de pró-fármacos, toxinas, inibidores de angiogênese e citocinas (CHOROBK; MARCINKIEWICZ, 2011; PAWELWK; LOW; BERMUDES, 2003).

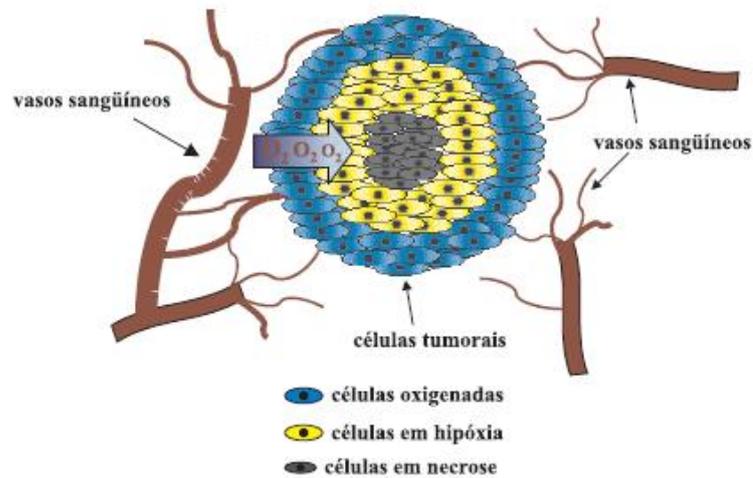
O uso de bactérias contra o câncer é baseado no fato dessas apresentarem preferência pela colonização em microambientes tumorais, sendo a quimiotaxia essencial para iniciar a acumulação. A explicação do direcionamento ao tumor refere-se ao tecido tumoral como fonte de nutrientes altamente concentrados e além disso, pode evitar a depuração pelo sistema imunológico do hospedeiro (LIANG et al., 2019; ZHENG; MIN, 2016). Múltiplos mecanismos imunossupressores induzidos por

tumores têm sido propostos para explicar a colonização e proliferação preferencial de vetores bacterianos em tumores. As massas tumorais podem conter células imunossupressoras derivadas de células mieloides, que alteram e reprogramam a ativação de macrófagos e células apresentadoras de antígenos (KERKAR; RESTIFO, 2012). Além disso, existem estudos que mostram a inibição direta da ativação das células imunes através do acúmulo de ligantes de receptores imunossupressores no microambiente tumoral (SCHLÖSSER et al., 2014). Cada um desses eventos de desregulação estrutural e imunológica nos tumores cria um ambiente para a colonização por essas bactérias.

A quimiotaxia bacteriana em resposta a pequenas moléculas de nutrientes, que são liberadas pelos tecidos tumorais que estão morrendo, ocorre em tumores *in vitro* e *in vivo* (ZHENG; MIN, 2016). A resposta quimiotática é desencadeada através da estimulação de receptores específicos. *Salmonella* e outras bactérias detectam serina, aspartato, e gradiente ribose/galactose, que as guiam para tumores. Sendo assim, a inativação do receptor de ribose/galactose leva à acumulação de bactérias em áreas tumorais quiescentes. Estas áreas são isquêmicas, com focos de anaerobiose e, portanto, têm limitada capacidade de resposta à quimioterapia (CHOROBIK; MARCINKIEWICZ, 2011). Em detalhe, o receptor de aspartato inicia a quimiotaxia em direção ao tumor, o receptor de serina inicia a penetração e o receptor de ribose/galactose direciona a bactéria para a região de necrose do tumor (LIANG et al., 2019).

A característica da hipóxia foi totalmente utilizada para aumentar o acúmulo específico de bactérias no tumor, reduzindo a citotoxicidade para tecidos normais e aumentando a especificidade do alvo. O oxigênio é um dos sinais mais importantes usados pelas bactérias para detectar o microambiente do tumor. Devido à rápida proliferação celular e à angiogênese contínua durante o crescimento do tumor, os vasos sanguíneos recém-formados são prematuros tanto em termos do revestimento de células endoteliais quanto em extremidades de ligação, resultando em fluxo sanguíneo lento e entrega insuficiente de oxigênio e nutrientes para o tecido do tumor. A hipóxia (< 1% de oxigênio) é uma característica quase universal do câncer (figura 6), o que a torna particularmente resistente à radioterapia e à quimioterapia (ZHENG; MIN, 2016).

Figura 6 – Representação esquemática da secção transversal de um tumor sólido evidenciando a diminuição da concentração de oxigênio em relação à distância dos vasos sanguíneos



Fonte: (DE OLIVEIRA; ALVES, 2002)

Os vasos sanguíneos tumorais são estruturalmente irregulares e comumente exibem um revestimento celular defeituoso composto de células endoteliais desorganizadas, ramificadas ou sobrepostas. Assumiu-se que as bactérias, assim como muitos quimioterápicos macromoleculares, entram no tecido do tumor através das aberturas entre essas células endoteliais desorganizadas. O escape de bactérias da corrente sanguínea no tecido tumoral pode ser passivo ou ativo. De acordo com um mecanismo ativo, a bactéria poderia procurar as aberturas usando seus sistemas quimiotáticos e de motilidade. No cenário passivo, um pequeno número de bactérias entraria no tumor por meio dessas aberturas e, então, se replicaria. Bactérias provavelmente induzem forte influxo de sangue no tecido tumoral, promovendo a expressão de fatores de ruptura dos vasos sanguíneos e esse influxo libera mais bactérias no tecido tumoral. De fato, esses mecanismos ativos e passivos não são mutuamente exclusivos, e a bactéria pode usar ambos para se direcionar especificamente ao tumor (LIANG et al., 2019).

Outro ponto importante é que as bactérias podem fornecer agentes terapêuticos que, de outra forma, seriam degradados rapidamente na corrente sanguínea ou durante o trânsito do trato gastrointestinal superior. O uso de bactérias possibilita sua administração em locais do corpo em que essas possam viver, mas que sejam difíceis de alcançar por via oral ou parenteral (RIGLAR; SILVER, 2018). A

produção de agentes terapêuticos de forma intratumoral é mais tóxica para o tecido tumoral e menos tóxica para o tecido normal. Essa mudança da localização do agente terapêutico pode eliminar os tumores de dentro para fora, tendo efeitos simultâneos de aumentar a eficácia do tratamento e diminuir os danos ao tecido normal (FORBES, 2010).

O principal problema com o uso de bactérias como agentes anticancerígenos é a sua possível toxicidade na dose necessária para a eficácia terapêutica e a redução dos resultados em doses menores afetando a eficácia. O obstáculo básico na terapia gênica do câncer é o direcionamento específico da terapia diretamente para um tumor sólido. Uma abordagem para superar essas limitações tem sido o uso de bactérias geneticamente modificadas para expressar um gene terapêutico específico. Ao produzir a proteína de interesse especificamente no microambiente tumoral, esses vetores bacterianos podem fornecer uma poderosa terapia adjuvante para vários tratamentos contra o câncer. Vários estudos pré-clínicos mostraram a capacidade de diferentes cepas bacterianas em transportar e amplificar genes que codificam agentes terapêuticos especificamente dentro de tumores (MOHITE; SURVE; KARPE, 2015).

1.5 *Salmonella* COMO VETOR BACTERIANO VIVO

Salmonella Typhimurium atenuada tem sido amplamente estudada no contexto de bactérias utilizadas como vetores bacterianos vivos, devido à sua pronta disponibilidade e facilidade de manipulação genética. *S. Typhimurium* pode crescer sob condições aeróbicas e anaeróbicas e assim pode colonizar tumores grandes e pequenos. Para aumentar a eficácia terapêutica, podem ser desenvolvidas estratégias de terapia bacteriana em combinação com radioterapia e quimioterapia ou a utilização de bactérias entregando moléculas anticancerígenas no tumor. A *S. Typhimurium* tem propriedades únicas que podem superar limitações das terapias convencionais: crescimento preferencial em microambiente específico do tumor, capacidade de detectar e se direcionar ao tumor, boa penetração intratumoral, baixa citotoxicidade e imunogenicidade ao organismo como um todo e facilidade de manipulação/programação genética (ZHENG; MIN, 2016).

Pesquisadores descobriram que a *Salmonella* atenuada impede o crescimento tumoral em uma ampla gama de tumores humanos e de camundongos, implantados em camundongos. Na maioria dos casos o crescimento do tumor foi inibido por longos

períodos, até várias semanas após os animais não tratados terem vindo a óbito devido ao tumor. Estas observações, juntamente com a facilidade de manipulação genética, sugerem que essa bactéria se apresenta como uma boa candidata para agente terapêutico antineoplásico (PAWELWK; LOW; BERMUDES, 2003).

Estudos demonstraram que a *Salmonella* pode se acumular preferencialmente em tumores numa proporção superior a 1000:1 em comparação com tecidos saudáveis, como o fígado e o baço (LIANG et al., 2019). Como resultado dessa afinidade pelo microambiente tumoral, a ação terapêutica é focada no tumor e o resto do corpo é exposto a moderados efeitos colaterais. Ferramentas modernas de manipulação genética, apoiadas por genética e fisiologia relativamente bem conhecidas do gênero *Salmonella*, permitem introduzir modificações sofisticadas no fenótipo bacteriano para melhorar a segurança e a eficácia (CHOROBK; MARCINKIEWICZ, 2011). Sendo assim, a *Salmonella* pode ser projetada como parte de uma abordagem terapêutica ativa para o controle do câncer.

Células tumorais são frequentemente reconhecidas pelo sistema imune, mas a ausência de sinal de perigo decorrente de evasão do sistema imune por essas células impede que haja a indução de imunidade efetiva. A supressão tumoral induzida por *Salmonella* é uma combinação de citotoxicidade direta contra células tumorais infectadas e imunidade anticâncer provocada por uma inflamação aguda, incluindo respostas imunes dependentes de células T. No curso da infecção, a *Salmonella* expele proteínas efetoras que interagem com as células do hospedeiro e influenciam a resposta imune. Um dos principais obstáculos para se obter uma terapia antitumoral eficaz é o ambiente imunossupressor gerado pelos tumores, que inclui células supressoras derivadas de mielóides e células T reguladoras. Microrganismos atenuados, incluindo *Salmonella* são promissores para induzir uma mudança do microambiente tumoral de imunossupressor para imunogênico (CHOROBK; MARCINKIEWICZ, 2011; ZHAO et al., 2005).

A angiogênese é um fator chave na progressão e eventual metástase de tumores. Ter ferramentas que controlem essa angiogênese é um fator relevante para diminuir o crescimento do tumor. A bactéria *Salmonella* pode inibir a angiogênese ou destruir vasos sanguíneos dentro do tecido tumoral para retardar o crescimento do tumor. Tanto *in vitro* como *in vivo*, a infecção por *Salmonella* pode reduzir a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um importante fator angiogênico (LIANG et al., 2019).

A *Salmonella* invade, sobrevive e se replica dentro das células de um organismo infectado. Portanto, ela pode servir como um veículo que fornece uma carga terapêutica às células na forma de DNA codificante (cDNA). Os genes codificados são expressos por aparelhos de tradução bacteriano, de modo a originar um produto proteico ativo. Não há necessidade de envolver qualquer medicamento pré-formado. Em vez disso, o uso dessa estratégia permite que o material genético seja amplificado, preferencialmente após as bactérias atingirem o tumor, para liberar uma proteína terapêutica localmente dentro do tumor. O DNA fornecido pode codificar antígenos específicos de tumor ou associados a tumor, enzimas conversoras de pró-fármaco, citocinas, fatores indutores de apoptose, fatores antiangiogênicos, RNA regulador e outros (CHOROBK; MARCINKIEWICZ, 2011; WANG; KAZMIERCZAK; EISENSTARK, 2016).

O fato da *Salmonella* se direcionar e acumular no tumor fez surgir a abordagem de usá-la como ferramenta de detecção de tumores e análise de sua localização dentro de organismos. Proteínas fluorescentes, como a GFP (proteína verde fluorescente), têm sido usadas para rotular e visualizar *Salmonella*, bem como outras linhagens bacterianas dirigidas ao tumor (WANG; KAZMIERCZAK; EISENSTARK, 2016). O controle de visualização de forma externa pode ser conseguido utilizando estratégias de inserção de genes que codificam marcadores sob ação de promotores que levam a produção de proteínas que respondem a pequenas moléculas ou radiação. Bactérias podem ser detectadas usando luz, ressonância magnética e tomografia por emissão de pósitrons (FORBES, 2010).

1.6 ASPECTOS GERAIS DA *Salmonella* E LINHAGEM SL3261

O gênero *Salmonella* é composto por três espécies: *Salmonella subterranea*, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *S. enterica* é composta por diversos sorotipos, entre eles o sorotipo Typhimurium. O gênero é caracterizado por bactérias em forma de bacilos, com diâmetro médio entre 0,7 a 1,5 μm e comprimento de 2 a 5 μm , gram-negativas, não-esporulantes, anaeróbias facultativas, que apresentam motilidade associada à presença de flagelos, e sendo proximamente relacionadas ao gênero *Escherichia* (POPOFF; LE MINOR, 2005). *Salmonella* Typhimurium é um dos microrganismos mais amplamente estudados, particularmente nas áreas de pesquisa científica básica, infecções bacterianas sistêmicas, perfil

imunológico e resistência do hospedeiro a patógenos. É também amplamente estudada por seu uso como vacina de vetor bacteriano vivo e como vetor antitumoral devido às suas propriedades intrínsecas (LALSIAMTHARA; KIM; LEE, 2018).

Para o desenvolvimento de vetores de *Salmonella*, diversas atenuações têm sido estudadas para a geração de linhagens apropriadas. Essas atenuações devem fazer com que a bactéria não consiga se desenvolver no indivíduo que a recebe e que o crescimento do vetor não aumente significativamente em indivíduos imunocomprometidos. Em contrapartida, atenuações excessivas são indesejáveis, uma vez que podem comprometer a capacidade da bactéria de persistir nos tecidos tempo suficiente para produzir e secretar os agentes terapêuticos codificados em seus plasmídeos (MASTROENI et al., 2001).

Por meio do uso de técnicas de engenharia genética, a identificação e eliminação de importantes genes de virulência é possível, o que permite a atenuação de bactérias patogênicas e a criação de vetores incapazes de reverter às suas formas virulentas. Várias mutações foram descritas para diferentes sorotipos de *Salmonella enterica*, sendo uma das mais utilizadas a mutação *aroA*, que bloqueia a capacidade do microrganismo de sintetizar compostos aromáticos (DA SILVA et al., 2014). A deleção de *aroA* é comumente usada como uma mutação metabólica para atenuar *Salmonella*, mas também outras bactérias (RUBY et al., 2012).

Para o sucesso da terapia associada ao vetor bacteriano é preciso dispor de um microrganismo que não apresente risco inerente aos indivíduos que serão tratados. A linhagem utilizada neste trabalho é a *S. Typhimurium* SL3261 que possui essa atenuação no gene *aroA*. Esse gene é parte da via do chiquimato, que conecta diretamente a glicólise à síntese de aminoácidos aromáticos (BENTLEY, 1990). Assim, a deleção de *aroA* torna a *Salmonella* auxotrófica para aminoácidos aromáticos, que não são livremente disponíveis no hospedeiro mamífero. Consequentemente, presume-se que as cepas de *Salmonella* deficientes em *aroA* sejam altamente atenuadas e sejam consideradas sistemas de vetores adequados por ter sua capacidade de reprodução inibida (HOISETH; STOCKER, 1981). Mutantes auxotróficos que requerem metabólitos que não estão disponíveis em tecidos de mamíferos têm reduzida capacidade de crescer *in vivo* (MASTROENI et al., 2001).

Muitos estudos buscando terapias contra o câncer têm sido desenvolvidos com o uso da linhagem SL3261, sendo utilizada tanto como vetor bacteriano vivo em abordagem vacinal, bem como para imunoterapia expressando citocinas e outros

agentes terapêuticos (ARGORIO et al., 2007; JIANXIN et al., 2013; LIN et al., 2012; SALTZMAN et al., 2018; ZHU et al., 2010).

1.7 TRAIL – LIGANTE INDUTOR DE APOPTOSE RELACIONADO AO TNF

Em 1995, o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) foi identificado pela primeira vez (WILEY et al., 1995). Também conhecido como ligante de Apo2, é uma proteína receptora transmembrana do tipo II que foi originalmente identificada e clonada com base na homologia da sequência de seu domínio extracelular com CD95L e TNF. Como a maioria dos outros membros da superfamília do TNF (TNFSF), o TRAIL forma homotrímeros que se ligam a moléculas receptoras. No entanto, ao contrário de outros membros dessa família, cuja expressão é rigidamente regulada e muitas vezes é transitoriamente expressa em células ativadas, o mRNA TRAIL é constitutivamente expresso em uma ampla gama de tecidos. O TRAIL induz a apoptose através da interação com seus receptores, sugerindo seletividade às células tumorais (MONGKOLSAPAYA et al., 1999; WILEY et al., 1995).

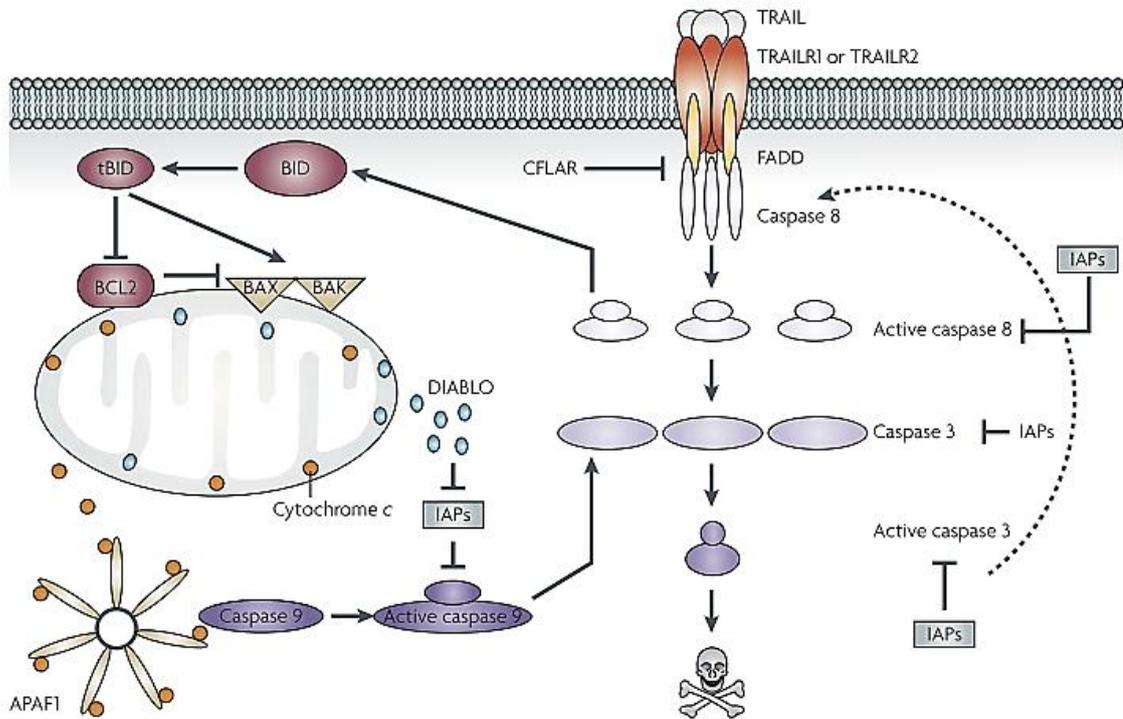
Os organismos multicelulares normalmente eliminam as células danificadas de forma mais eficaz por meio da apoptose, um mecanismo celular controlado que resulta em morte. No entanto, uma das características da célula tumoral é a prevenção ativa da apoptose, promovendo sua sobrevivência (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Em vista disso, métodos de indução da apoptose tornaram-se uma abordagem importante na concepção de novas terapias contra o câncer.

Na década de 70 foi proposto que o TNF conduzia o tecido tumoral à necrose, o que deu origem ao nome dessa proteína (CARSWELL et al., 1975). No entanto, descobriu-se que o tratamento sistêmico com TNF induzia uma síndrome de choque inflamatório letal. Em busca de outra molécula com propriedades antitumorais semelhantes, a atenção voltou-se para o CD95 (também conhecido como FAS e APO-1), um receptor homólogo ao TNFR1 e TNFR2 que pode desencadear a apoptose em muitas células tumorais (ITOH et al., 1991). O tratamento sistêmico com agonistas de CD95 conduziu à toxicidade fulminante no fígado de camundongos poucas horas após o tratamento, excluindo novamente uma molécula semelhante a TNF para utilização terapêutica (OGASAWARA et al., 1993). A terceira pesquisa se voltou ao uso de outro membro da TNFSF, denominado ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF, o

TRAIL. Alguns anos depois, foi descoberto que esse fator era capaz de matar células tumorais sem causar os efeitos adversos letais encontrados com os agonistas TNF ou CD95 (LEBLANC; ASHKENAZI, 2003; VON KARSTEDT; MONTINARO; WALCZAK, 2017). O TRAIL induz a apoptose em uma variedade de células transformadas ou tumorais, mas não em células normais, tornando-o um agente atraente para a terapia do câncer por apresentar seletividade ao tecido tumoral (MONGKOLSAPAYA et al., 1999; WILEY et al., 1995).

A apoptose é definida por mudanças morfológicas e bioquímicas distintas, que são mediadas pelas caspases, e pode ser induzida por duas vias de sinalização: a via intrínseca, que é ativada por sinais intracelulares da mitocôndria, ou a via extrínseca, que é iniciada por meio de receptores de morte na superfície celular. A via intrínseca é controlada pelas proteínas pró e antiapoptóticas da família Bcl2 e tem um papel substancial na quimioterapia e na morte celular induzida por radiação. Em contraste, a via de morte extrínseca é iniciada através de cascatas de transdução de sinal apoptóticas mediadas por membros da TNFSF (JOHNSTONE; FREW; SMYTH, 2008).

Figura 7 - Sinalização apoptótica através da via do ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral - TRAIL



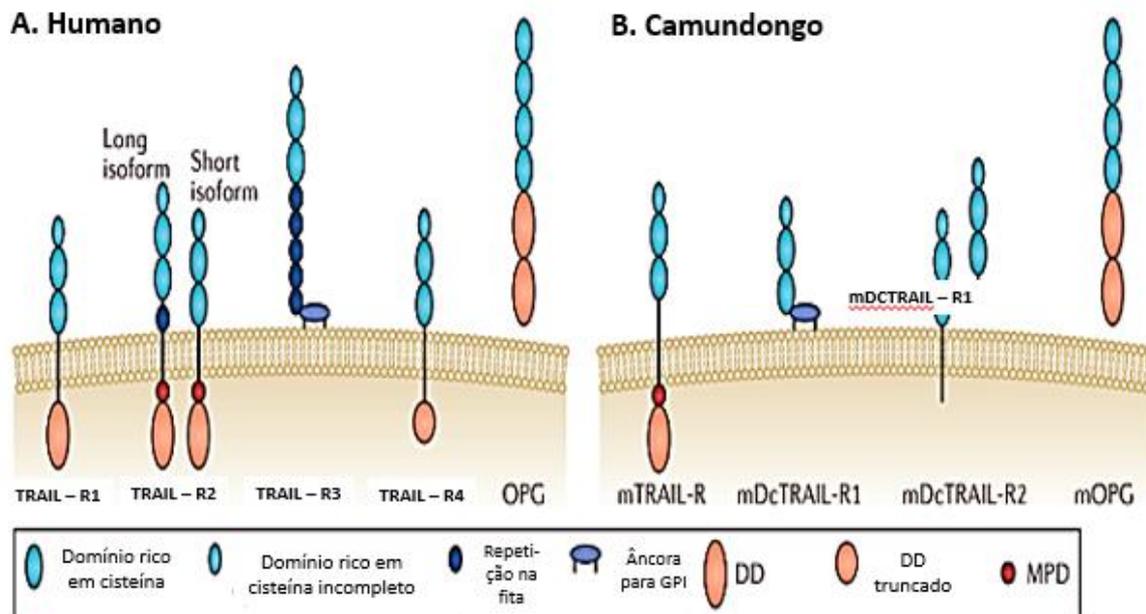
A ligação de TRAIL ao TRAILR1 ou TRAILR2 resulta em oligomerização do receptor e recrutamento de proteína associada a FAS com domínio de morte (FADD) e caspase 8 para formar um complexo de sinalização indutor de morte funcional (DISC). Na formação da DISC, a caspase 8 é clivada e ativada, que por sua vez pode clivar e ativar a caspase 3 e a proteína BID. A BID ativa, clivada (tBID) pode se ligar à BAX e BAK pró-apoptóticas, resultando na permeabilização da membrana mitocondrial e liberação de proteínas mitocondriais, citocromo c e DIABLO. O citocromo c, o fator ativador da protease apoptótica 1 (APAF1) e a caspase 9 se combinam com o ATP para formar um apoptossomo funcional que resulta na clivagem e ativação da caspase 9, que pode então clivar a caspase 3. O DIABLO suprime as atividades inibidoras da caspase das IAPs. A caspase 3 pode clivar diversos alvos intracelulares, resultando nas marcas morfológicas e bioquímicas da apoptose. A caspase 3 também pode clivar e ativar a caspase 8, amplificando assim o sinal apoptótico. **Fonte:** (JOHNSTONE; FREW; SMYTH, 2008)

Nas células tumorais, a apoptose induzida pela via extrínseca complementa aquela induzida pela via intrínseca, portanto, o direcionamento dos receptores de morte é considerado uma útil abordagem terapêutica. As drogas anticâncer ideais são aquelas que podem matar seletivamente as células tumorais sem prejudicar as células normais. Atualmente, existem poucos agentes que são verdadeiramente específicos de células tumorais em termos de eficácia e indução de morte celular. TRAIL é um exemplo de molécula que seletivamente mata as células transformadas e tumorais, mas não a maioria das células normais (WU, 2009).

Em relação ao sistema de ligação entre TRAIL e seus receptores, como revisado por Karstedt et al (2017), entre os membros da TNFSF, o TRAIL humano é

único que se liga a quatro receptores de membrana e um receptor solúvel. Os TRAIL-Rs humanos podem ser subdivididos em duas classes: os receptores intracelulares TRAIL-R1 e TRAIL-R2, que podem induzir apoptose e são mais amplamente expressos, e os receptores alternativos TRAIL-R3, TRAIL-R4 e osteoprotegerina (OPG), que também funciona como um receptor solúvel para o receptor ativador do fator nuclear- κ B (NF- κ B). Em contraste com os humanos, os camundongos expressam apenas um único TRAIL-R (mTRAIL-R) e com um domínio de morte intracelular que compartilha quase o mesmo nível de identidade com o TRAIL-R1 humano e TRAIL-R2 humano. Assim como suas contrapartes humanas, o mTRAIL-R é capaz de induzir a apoptose. Mais dois mTRAIL-Rs, mDcTRAIL-R1 e mDcTRAIL-R2, foram descritos, mas estes não possuem um domínio de morte intracelular. Eles diferem substancialmente em sua sequência de aminoácidos do TRAIL-R3 e TRAIL-R4 humanos e não induzem apoptose ou ativação do NF- κ B na superexpressão. Notavelmente, o TRAIL humano liga-se apenas fracamente ao mTRAIL-R, enquanto o TRAIL murino tem alta afinidade com o TRAIL-R humano (VON KARSTEDT; MONTINARO; WALCZAK, 2017).

Figura 8 - Sistemas de receptor TRAIL humano e de camundongo



A: O sistema do ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral humano (TRAIL) - sistema TRAIL-receptor (TRAIL-R). Os seres humanos expressam três receptores com um domínio intracelular contendo um domínio de morte (DD) ou, no caso de TRAIL-R4, um DD truncado. TRAIL-R2 é expresso como uma isoforma longa e uma curta, que diferem pela presença ou ausência, respectivamente, de um único domínio TAPE (treonina, alanina, prolina e glutamina). Além disso, o TRAIL-R3 está ligado à membrana através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), expressa cinco domínios TAPE, mas é desprovido de um domínio intracelular. Osteoprotegerina 2 (OPG) serve como um receptor solúvel de baixa afinidade para TRAIL. **B: O sistema de camundongo TRAIL – TRAIL-R.** O mTRAIL-R é homólogo ao TRAIL-R1 e TRAIL-R2 humanos, enquanto o mDcTRAIL-R1 e o mDcTRAIL-R2 diferem significativamente e o último também é encontrado como uma forma solúvel. Semelhante ao OPG humano, o mOPG serve como um receptor TRAIL solúvel de baixa afinidade. MPD, domínio proximal da membrana. **Fonte:** (VON KARSTEDT; MONTINARO; WALCZAK, 2017 - modificado).

Existem outras ações de TRAIL que também devem ser consideradas. A sinalização através do TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 resulta na ativação do NF- κ B (FALSCHLEHNER et al., 2007). Consistente com o papel proposto de NF- κ B na regulação da apoptose induzida por TRAIL, a inibição da atividade de NF- κ B *in vitro* sensibiliza células tumorais a apoptose mediada por TRAIL e induz regressão tumoral dependente de TRAIL *in vivo*. Contudo, embora a inibição da atividade de NF- κ B possa sensibilizar as células tumorais para a apoptose induzida por TRAIL, isto não é um efeito universal em todos os tipos de células. Uma visão simplista é que, quando a apoptose é suprimida, a ativação da via NF- κ B muda o sinal TRAIL de indução de apoptose para estimular a sobrevivência e/ou proliferação celular. De fato, isto foi demonstrado em células tumorais que são resistentes a apoptose mediada por TRAIL

devido à sinalização de receptor de morte defeituosa. Estas células mostraram proliferação ou metástase aumentada dependente de NF- κ B e invasão *in vitro* após estimulação com TRAIL. No entanto, o NF- κ B é um complexo multiproteico e, dependendo de sua composição, a ativação da via pode resultar em desfechos biológicos inteiramente diferentes (JOHNSTONE; FREW; SMYTH, 2008).

Resultados obtidos por Ganai et al. (2009), indicam que *S. typhimurium* pode expressar e secretar uma proteína TRAIL funcional. O TRAIL secretado, ativando a via do receptor da morte, pode estimular a apoptose nas células do carcinoma mamário e diminuir significativamente o crescimento do tumor, além de aumentar a sobrevivência do hospedeiro (GANAI; ARENAS; FORBES, 2009). Em outros estudos, Cao et al. (2010) mostraram que a entrega de TRAIL por *S. typhimurium* atenuada foi capaz de inibir significativamente o crescimento de células tumorais gástricas *in vitro* e *in vivo* (CAO et al., 2010).

Os resultados de ensaios clínicos utilizando TRAIL na forma solúvel não têm sido muito positivos, mostrando pouca eficácia antitumoral. Diversos estudos mostraram que a coadministração com certas drogas quimioterápicas pode sensibilizar as células cancerígenas à apoptose induzida por TRAIL. No entanto, os quimioterápicos carecem de seletividade e causam efeitos adversos graves ao atacar também as células normais. A entrega direcionada de TRAIL especificamente ao tumor aumentaria a concentração local e minimizaria a diluição do fármaco em circulação. Principalmente duas abordagens de métodos de direcionamento estão sendo buscadas: direcionamento passivo baseado no efeito de permeabilidade e retenção aprimoradas, como o uso de nanopartículas, e o direcionamento ativo usando fragmentos de anticorpos ou peptídeos que levem o TRAIL a antígenos específicos do tumor (DE MIGUEL et al., 2016). Dessa forma, o presente estudo contribui com informações acerca da entrega específica de TRAIL no microambiente tumoral utilizando um vetor bacteriano para o *delivery*.

TRAIL tem um papel limitado como uma terapia de forma sistêmica por causa de sua depuração renal rápida e meia-vida curta (KELLEY et al., 2001). Apesar de sua especificidade em relação aos tumores em detrimento da maioria dos tecidos, o TRAIL também pode induzir a morte celular hepática (ZHENG et al., 2004), o que sugere que uma abordagem que permita sua entrega seletiva em tumores evitaria potencial hepatotoxicidade. Nesse cenário, o uso de bactérias que direcionem a produção de TRAIL no microambiente tumoral pode reduzir possíveis efeitos

colaterais tóxicos em células normais enquanto mantém altas concentrações intratumorais da proteína, podendo levar à morte de células tumorais.

1.8 INTERLEUCINA – 2

A imunoterapia, tipo de tratamento que utiliza o próprio sistema imunológico para combater o câncer, está emergindo como um acréscimo importante às terapias convencionais. Estudos se voltam à ativação do sistema imune, que pode ou não ser aliada a terapias convencionais, para a indução de respostas antitumorais robustas e sustentadas em uma ampla variedade de tumores (FARKONA; DIAMANDIS; BLASUTIG, 2016). Nesse cenário, a interleucina-2 (IL-2) aparece como um importante ativador do sistema imune tanto inato quanto adaptativo.

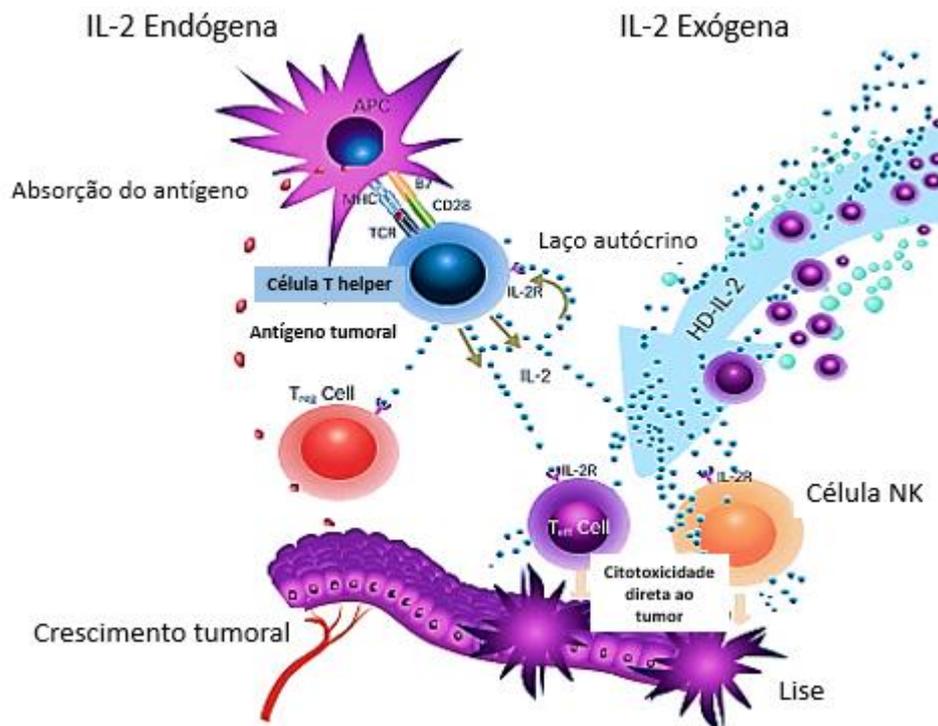
A IL-2 é uma citocina de 15 kDa produzida por células T CD4+ ativadas, mas também pode ser produzida por células T CD8+, células NK e células dendríticas ativadas. A IL-2 pode estimular células que expressam um receptor trimérico de IL-2 de elevada afinidade contendo as cadeias α -, β - e γ - ou um receptor dimérico de baixa afinidade, consistindo apenas nas cadeias β - e γ -. Tanto a IL-2 humana quanto a murina causa proliferação celular das espécies homólogas com alta eficiência, ou seja, humanos e camundongos possuem reatividade cruzada (MOSMANN et al., 1987). Nas células CD8, a IL-2 pode estimular o crescimento celular, assim como a diferenciação em células de memória e linfócitos diferenciados. A IL-2 promove a proliferação de linfócitos e aumenta a função citolítica das células T e células NK, que causam destruição de células malignas (GUPTA; AGARWAL, 2016). Essa característica resultou em décadas de estudos de imunoterapia baseada em IL-2 e tem sido eficaz em modelos de tumores murinos e humanos (ROSENBERG, 2014).

A interleucina-2 tem sido amplamente utilizada em modelos de câncer murino e em ensaios clínicos em humanos, principalmente devido aos seus efeitos sobre a atividade em CD8, particularmente os citotóxicos (CTLs). Nem todos os estudos mostraram um resultado clínico significativo, entretanto, aqueles que observaram imunidade antitumoral em resposta à terapia com IL-2 (em humanos e camundongos) relataram mecanismos conflitantes, variando de mecanismos mediados ou não pelo sistema imunológico (JACKAMAN et al., 2003).

As células *Natural killer* (NK) desempenham um papel importante na supressão da carcinogênese, sendo componentes importantes do sistema imune inato. Elas

controlam tumores liberando perforinas e granzimas de seus grânulos citolíticos, bem como produzindo muitas citocinas, principalmente Interferon- γ . A ativação de células NK ocorre quando entram em contato com células malignamente transformadas que perderam moléculas de classe I do MHC e, portanto, tornam-se suscetíveis à lise. Sendo assim, esse processo ocorre de forma independente da apresentação de antígeno (MARTINOVIĆ et al., 2016). Vários estudos demonstram que as células NK inibem o crescimento tumoral e que a interleucina IL-2 é uma citocina essencial para a proliferação e ativação de células NK. Assim, as células NK podem servir como uma ferramenta para o tratamento promissor para câncer (SEKI et al., 2011).

Figura 9 - Efeitos antitumorais da IL-2



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 ativadas, como interferon gama e fator de necrose tumoral. **Fonte:** (GUPTA; AGARWAL, 2016 - modificado).

Existe uma rápida ativação de neutrófilos, macrófagos e NK após a exposição à IL-2. Diferente das células T, as células NK e os macrófagos reconhecem e se direcionam às células tumorais de maneira não restrita ao MHC. Uma vez ativadas pela IL-2, as células NK adquirem maior capacidade de lise com expressão aprimorada de marcadores de ativação como CD25 e CD69 na superfície celular,

enquanto os macrófagos se tornam maiores e mais granulares com maior citotoxicidade às células tumorais (ZHANG et al., 2018).

Al-Ramadi et al (2009), avaliaram a ação de *Salmonella* que expressa IL-2 quanto à sua atividade antitumoral no modelo de melanoma B16 altamente tumorigênico. Os resultados demonstram capacidade de inibir o crescimento do tumor e melhorar a sobrevivência do hospedeiro a um nível significativamente maior do que a cepa bacteriana que não sintetizava a citocina. A atividade antitumoral correlacionou-se com uma forte resposta intratumoral antiangiogênica e pró-apoptótica que foi preferencialmente induzida pela cepa bacteriana que expressa IL-2 (AL-RAMADI et al., 2009);

Outra importante característica da IL-2 é se apresentar como uma potente indutora de óxido nítrico sintase (iNOS) e, portanto, da síntese de NO, que pode contribuir para as respostas antitumorais. A atividade da IL-2 pode ser parcialmente mediada via NO, que possui propriedades antiangiogênicas e antitumorais (SAKKOULA; PIPILI-SYNETOS; MARAGOUDAKIS, 1997).

Conforme revisado por Rosenberg (2014), o progresso na administração de IL-2 foi estimulado pela clonagem do gene que codifica IL-2 em 1983 e a subsequente produção e caracterização em 1984 da atividade biológica da rIL-2 produzida em *Escherichia coli*. A produção de IL-2 recombinante finalmente permitiu avaliar o impacto da administração *in vivo* de grandes quantidades de IL-2 em camundongos e humanos portadores de câncer. A administração de IL-2 pode levar a regressões duradouras, completas e aparentemente curativas em pacientes com melanoma metastático e câncer renal (ROSENBERG, 2014). No entanto, o uso de altas doses de IL-2 resultou em toxicidade grave em muitos pacientes. As principais toxicidades associadas à administração de altas doses de IL-2 incluem mal-estar, febre, anasarca (edema generalizado), icterícia, disfunção renal e síndrome de vazamento capilar (SALTZMAN, 2005).

No intuito de encontrar uma preparação de IL-2 na qual sua eficácia clínica pudesse ser mantida com toxicidades associadas reduzidas, pesquisadores desenvolveram uma linhagem atenuada de *S. Typhimurium* que sintetiza IL-2 localmente em áreas de colonização bacteriana. Foi demonstrado que a IL-2 produzida por *S. Typhimurium* possui atividade biológica, e que a sua administração resulta em significativa diminuição de metástases hepáticas decorrentes de adenocarcinoma do cólon em modelo murino. Além disso, demonstrou-se que tanto

as células T CD8+ como as células NK parecem ser as populações celulares mais influentes quando subgrupos de linfócitos foram estudados quanto aos seus papéis antitumorais específicos em camundongos administrados oralmente por *Salmonella* expressando IL-2 (SALTZMAN et al., 1997).

A IL-2 foi aplicada diretamente em tumores sólidos acessíveis, ou em torno deles, com resultados promissores e efeitos colaterais baixos. Fundamental para esta abordagem intratumoral é a observação de diferentes tipos celulares associados ao sistema imunológico que infiltram nos tumores em progressão. Estas células incluem aquelas que exercem atividade citolítica antitumoral, tais como linfócitos T citotóxicos e células NK, bem como células que os ativam, como células dendríticas. Estas populações celulares representam alvos ideais para imunoterapia local. A IL-2 intratumoral pode aumentar as respostas das células T antitumorais, tanto atuando como um segundo sinal coestimulatório na ativação de CTL quanto por ativação adicional de células dendríticas expressando IL-2Rs (JACKAMAN et al., 2003). Além disso, a exposição local à IL-2 pode ativar uma gama mais ampla de tipos de células efetoras, incluindo células NK, macrófagos, células B e células TCD4 *in vivo*. É possível que uma combinação de respostas imunes inatas e adaptativas ativadas, bem como respostas não imunes, possam ser necessárias para induzir uma resposta antitumoral efetiva (JACKAMAN et al., 2003).

1.9 MODELOS EXPERIMENTAIS EM ESTUDOS SOBRE O CÂNCER

Muitos estudos têm como alvo a compreensão do processo de desenvolvimento de tumor. A análise *in vitro* de tecidos tumorais promove grande parte do conhecimento atual sobre carcinogênese, uma vez que tecidos são removidos de pacientes em estágios avançados de desenvolvimento tumoral. Essa prática permite elucidação de muitas questões referentes a alterações genômicas e moleculares apresentadas pelas células tumorais (PANTALEÃO; LUCHS, 2010) e respostas a agentes antitumorais. No entanto, informações adicionais relacionadas ao desenvolvimento *in vivo* são de grande valia. Para isso, o uso de modelos tumorais em animais são largamente utilizados e contribuem com informações para melhorar a aplicação desse tipo de terapêutica no câncer.

O modelo experimental *in vivo* fornece informações sobre a tumorigênese, que pode ocorrer de forma semelhante em humanos, tendo como principais aspectos:

evidências da progressão tumoral, origem e expansão clonal do tumor, estudo sobre o papel da resposta imune, análise de invasão tecidual, padrões de expressão gênica, aplicação de terapias antitumorais, e estudos patológicos e histológicos (HANN; BALMAIN, 2001).

Linhagens de camundongos têm sido utilizadas há décadas como modelos *in vivo*, pois possuem alguns pontos favoráveis como: genoma sequenciado, capacidade de manipulação genética por técnicas moleculares, são semelhantes fisiologicamente e molecularmente a humanos, tamanho pequeno que proporciona fácil manipulação, curto período de gestação e alta reprodução. A engenharia de camundongos transgênicos para desenvolver cânceres semelhantes aos humanos tem sido um avanço importante no campo da pesquisa sobre o câncer. Camundongos transgênicos forneceram modelos que mimetizam com precisão cânceres humanos, permitem o monitoramento de câncer desde os primeiros estágios e têm aplicações promissoras no desenvolvimento de terapias antitumorais (CONMY; NASHEUER, 2010).

Em suma, modelos murinos representam uma importante ferramenta experimental que possibilita caracterização de métodos para elucidar os mecanismos relacionados à progressão tumoral e metástases, além de permitir o desenvolvimento de estudos sobre potenciais de fármacos e imunoterapias para o tratamento do câncer.

No presente estudo foram utilizadas ambas as abordagens: *in vitro* e *in vivo*. Para os testes *in vitro*, foi escolhida a linhagem celular HCT-8. Trata-se de uma linhagem tumoral humana retirada de um paciente de 67 anos de idade com adenocarcinoma colorretal. O tecido cujas células foram retiradas foi o cólon e a morfologia celular é epitelial com crescimento aderente (TOMPKINS et al., 1974). Em relação aos estudos *in vivo* de inserção do câncer e avaliação da progressão tumoral, bem como a resposta aos agentes terapêuticos propostos, foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c NUDE, em que a HCT-8 é oncogênica e tumores podem ser vistos após aproximadamente dez dias de inoculação (ROSENTHAL et al., 1977). Embora vários estudos tenham explorado o uso de bactérias como vetor bacteriano vivo, nesse estudo é proposto o uso de SL3261, carregando genes de TRAIL e IL-2, a serem usados no controle do câncer colorretal em um modelo experimental ainda não avaliado, sobretudo no que diz respeito a ação de TRAIL e IL-2 sendo administradas de forma conjunta. Assim, este estudo possibilitou avaliação

dos efeitos da inoculação da *Samonella* carregando os genes de TRAIL e IL-2 no modelo de câncer colorretal, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo a construção de linhagens de *Salmonella* Typhimurium atenuada (SL3261) capazes de expressar os agentes terapêuticos TRAIL e IL-2 a fim de avaliar seus potenciais antitumorais em modelo de câncer colorretal *in vitro* e *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construção de dois plasmídeos carregando individualmente os genes da TRAIL e IL-2 a serem inseridos em *Salmonella* Typhimurium atenuada (SL3261), permitindo expressão heteróloga dessas proteínas, resultando no desenvolvimento de vetores bacterianos vivos.
- Confirmar a expressão das proteínas TRAIL e IL-2 pela SL3261 transformada.
- Verificar a possível ação citotóxica de SL3261, SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2 em células tumorais (HCT-8).
- Avaliar a produção de Óxido Nítrico (NO) pelas células HCT-8 expostas à SL3261, SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2.
- Investigar a ação das proteínas TRAIL e IL-2 recombinantes em células HCT-8 *in vitro*.
- Quantificar as citocinas TNF e IL-12 em camundongos BALB/c inoculados com SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2 para avaliar o risco de ocorrência de um quadro de sepse.
- Inserir o câncer colorretal em camundongos BALB/c NUDE e acompanhar a progressão tumoral nos grupos com e sem tratamento com a SL3261 (carregando ou não os plasmídeos construídos).
- Analisar o perfil celular (leucócitos totais e neutrófilos) no sangue dos animais BALB/c NUDE tratados ou não.
- Avaliar a produção de TNF, IL-12 e IFN- γ no plasma e LCP (lavado da cavidade peritoneal) dos animais BALB/c NUDE tratados ou não.
- Analisar a presença de TRAIL e IL-2 circulantes no sangue dos animais BALB/c NUDE tratados ou não.

- Avaliar a biodistribuição de SL3261 no tumor, baço e fígado dos animais BALB/c NUDE a fim de confirmar a tendência de colonização do tumor pela bactéria.
- Realizar análise histológica de tumor de animais dos diferentes grupos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Essa seção se encontra basicamente subdividida em três partes. Na primeira parte foram abordadas as metodologias empregadas para a produção de duas linhagens de *Salmonella* capazes de produzir, por expressão heteróloga, as proteínas de interesse com potencial ação antitumoral no modelo proposto. São descritos os métodos de biologia molecular que viabilizaram a produção desses vetores de expressão e os testes utilizados para a confirmação da expressão das proteínas pela *Salmonella*. Essa parte inicial foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Aplicada da USFCar, com auxílio da profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur e do doutorando M.e André Vessoni Alexandrino. A segunda parte aborda a metodologia empregada em testes *in vitro* com culturas celulares da linhagem tumoral HCT-8 e a terceira parte é relacionada aos ensaios *in vivo* com camundongos BALB/c e BALB/c NUDE.

3.1 CONSTRUÇÃO DOS VETORES DE EXPRESSÃO

3.1.1 Obtenção das sequências nucleotídicas e fusão com marcador fluorescente

Para os estudos, foram escolhidas duas proteínas de camundongo com conhecida ação antitumoral: TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral) e IL-2 (interleucina-2). As sequências de cDNA de TRAIL e IL-2 foram obtidas a partir da biblioteca do GenBank (códigos de acesso: AF470537.1 e AY147902.1, respectivamente). As sequências se encontram nos Anexos 2 e 3. Foi realizada a otimização de códons para a expressão heteróloga dessas proteínas em *Salmonella Typhimurium*. As sequências gênicas foram sintetizadas pela empresa americana Biomatik, por intermédio da empresa FastBio, de Ribeirão Preto – SP e submetidas a sequenciamento para confirmar se a síntese ocorreu de forma correta.

Para possível análise da expressão das proteínas sob microscopia de fluorescência, as proteínas foram sintetizadas fusionadas à EmGFP e YFP (TRAIL e IL-2, respectivamente). Os genes da EmGFP e YFP foram adicionados à porção N-terminal da proteína de interesse e fusionados *in frame* (SNAPP, 2005). A GFP e seus derivados não requerem quaisquer substratos ou cofatores para a fluorescência e sua

expressão em células vivas não causa nenhum dano biológico aparente (ZHAO et al., 2003).

3.1.2 Plasmídeo de expressão em *Salmonella*

O plasmídeo utilizado nesse trabalho foi gentilmente cedido pela pesquisadora Dra. Elizabeth A. L. Martins, do Instituto Butantan de São Paulo, SP. O promotor desse plasmídeo é o *nirB*, amplamente utilizado em *Salmonella*. Originalmente, o promotor *nirB* dirige a expressão de um *operon* que inclui o gene *nirB* da enzima nitrito redutase. É regulado tanto pelo nitrito quanto pelas mudanças na tensão de oxigênio do ambiente, tornando-se ativo sob condições anaeróbias. Dessa forma, a utilização desse sistema permite que a expressão das proteínas recombinantes pelas células de *Salmonella* seja induzida pela condição de hipóxia presente no microambiente tumoral. A resposta à anaerobiose é mediada pela proteína FNR, atuando como um ativador transcricional, em um mecanismo comum a muitos genes respiratórios anaeróbios (OXER et al., 1991).

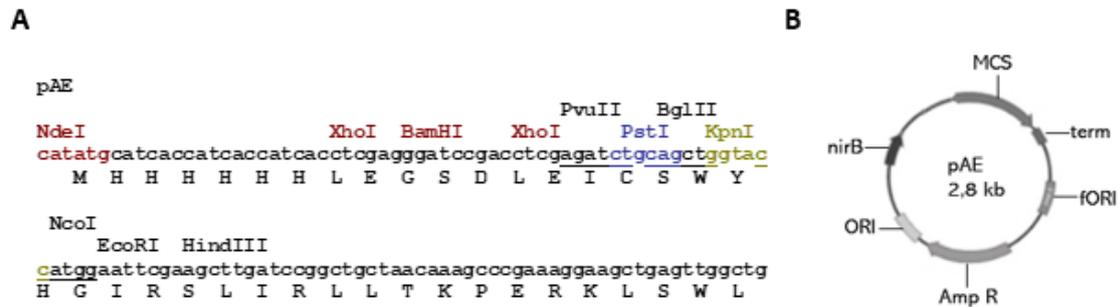
O plasmídeo pAE foi construído a partir dos plasmídeos pRSET e pET, combinando as vantagens de ambos os vetores: tamanho pequeno e elevado número de cópias do plasmídeo (pRSET) e expressão de um curto marcador 6XHis no terminal N (pET3-His). O tamanho pequeno do vetor (2,8 kb) e o alto número de cópias/célula (200-250 cópias) facilitam os procedimentos de subclonagem e sequenciamento quando comparados ao sistema pET (pET3-His, 4,6 kb e 40-50 cópias) e também resulta em alto nível de expressão de proteínas recombinantes (RAMOS et al., 2004).

3.1.3 Análise do sítio de múltipla clonagem e de restrição

O sítio de múltipla clonagem do plasmídeo pAE foi analisado para definição dos sítios de restrição a serem adicionados nas extremidades 5' e 3' das sequências a serem sintetizadas, de modo que fossem adotadas endonucleases cujos sítios não estivessem presentes nas sequências nucleotídicas originais dos fragmentos gênicos, e estivessem presentes e adequadamente posicionados nos vetores. Foram adicionados os sítios de restrição *NdeI* e *HindIII* à sequência da EmGFP+TRAIL e *NdeI* e *EcoRI* à sequência YFP+IL-2. As sequências tiveram seus códons otimizados

para expressão em *Salmonella enterica* Typhimurium e foram sintetizadas e inseridas em plasmídeos pUC57-kan.

Figura 10 - Plasmídeo pAE



A: sítio de múltipla clonagem do pAE; **B:** mapa do plasmídeo pAE contendo o promotor nirB. **Fonte:** arquivo pessoal.

3.1.4 Transformação de *E. coli* com os plasmídeos pUC57kan_IL-2 e pUC57kan_TRAIL

Os plasmídeos adquiridos (contendo as sequências de interesse TRAIL e IL-2) se encontravam na forma liofilizada e foram reconstituídos segundo instruções do fabricante. As transformações de *E. coli* DH5 α com os plasmídeos pUC57kan_IL-2 e pUC57kan_TRAIL foram feitas por choque térmico. Para isso, foram utilizadas 50 μ L de células competentes e 1 μ L dos plasmídeos, previamente quantificados em Nanodrop (pUC57kan_IL2: 214 ng/ μ L e pUC57kan_TRAIL: 203,4 ng/ μ L). Os tubos foram mantidos no gelo e então foi realizado o choque térmico em banho maria a 42°C, por um minuto. Após isso, os tubos foram colocados no gelo novamente por 2 minutos e 400 μ L de meio SOC foram adicionados às amostras. Os tubos foram incubados a 37°C por uma hora. Após a incubação, 100 μ L de cada amostra foram plaqueados em meio LB com kanamicina a 40 μ g/mL e a placa foi incubada a 37°C para o crescimento das colônias de células transformadas.

3.1.5 Extração plasmidial

Para obtenção de material necessário para realizar a subclonagem dos genes TRAIL e IL-2 no plasmídeo pAE, foram realizados cultivos das linhagens de *E. coli*

contendo os plasmídeos pUC57kan_TRAIL, pUC57kan_IL-2 e pAE em 5 mL de LB com os antibióticos adequados. As células foram incubadas de 14 a 18 horas e o conteúdo total foi utilizado para a miniprep. Os procedimentos foram feitos de acordo com o Kit *Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep* da Cellco Biotec. A eluição foi feita em 40 µL de água MilliQ e os eluatos contendo os plasmídeos extraídos foram quantificados em Nanodrop: 400 ng/µL de pAE, 216 ng/µL de pUC57kan_TRAIL e 206 ng/µL de pUC57kan_IL-2.

3.1.6 Digestão com enzimas de restrição

Os plasmídeos extraídos foram digeridos com as enzimas *NdeI* e *HindIII* para clonagem do gene da TRAIL e *NdeI* e *EcoRI* para o gene IL-2. As enzimas de restrição utilizadas foram *FastDigest — Thermo Scientific* e a digestão ocorreu de 14 a 18 horas a temperatura de 37 °C. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de TAE agarose (0,8%) contendo brometo de etídeo. As bandas que continham os insertos foram recortadas do gel e os insertos foram purificados com o kit *Agarose Gel Extraction* da Cellco Biotec para serem usados na reação de ligação.

3.1.7 Subclonagem dos insertos no vetor de expressão

Foram realizadas duas reações de ligação seguindo a razão de massa de 3:1 (inserto/vetor): pAE+TRAIL e pAE+IL-2. Para isso, foram adicionados a um eppendorf 100 ng de pAE, 300 ng do inserto (TRAIL ou IL-2), 1,5 µL de tampão de ligação (10x), 1 µL de T4 DNA ligase e água MilliQ para completar o volume final de 15 µL. A reação foi incubada a temperatura ambiente de 14 a 18 horas.

As transformações de *E. coli* DH5α com os plasmídeos construídos pAE_IL-2 e pAE_TRAIL também foram feitas por choque térmico, como descrito no item 3.1.4. As colônias transformadas foram selecionadas em meio LB contendo ampicilina 100 µg/mL. Algumas dessas colônias foram selecionadas, incubadas em meio LB líquido com ampicilina e utilizadas para extração plasmidial. A confirmação das construções foi realizada por ensaio de restrição dos plasmídeos extraídos com as enzimas *NdeI* e *HindIII* para o plasmídeo pAE_TRAIL e *NdeI* e *EcoRI* para o plasmídeo pAE_IL-2. Em seguida foi feita a análise das bandas das amostras digeridas por eletroforese em gel de TAE agarose (0,8%) contendo brometo de etídeo. As colônias positivas

confirmadas foram utilizadas para preparação de estoques em glicerol 20% e armazenamento a -80°C .

3.1.8 Preparação do estoque de SL3261 eletrocompetente

Inicialmente foi feito um inóculo da linhagem SL3261 em meio LB (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 5 g/L), sendo incubado a 37°C e 200 rpm de 14 a 18 horas. Alíquotas da cultura foram diluídas em meio fresco de modo a obter densidade ótica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 0,1 e a partir daí incubadas novamente nas mesmas condições de crescimento até atingirem $\text{DO}_{600\text{nm}} \cong 0,4$. Em seguida, foi feita centrifugação de 80 mL da cultura a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 mL de solução de glicerol 10% (v/v). Foi realizada nova centrifugação e essa etapa de lavagem das células (ressuspensão em glicerol seguida de centrifugação) foi repetida mais 4 vezes, com volumes decrescentes de solução de glicerol: 2 lavagens com 10 mL, 1 lavagem com 5 mL e a última lavagem com 1 mL. O *pellet* final foi ressuspensado em 100 μL de glicerol 10%, e a suspensão foi armazenada a -80°C em duas alíquotas de 50 μL .

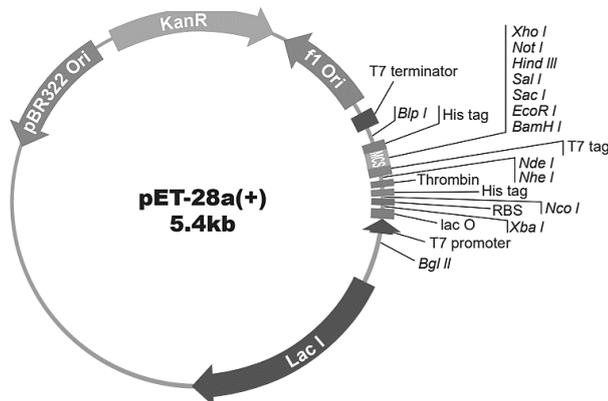
3.1.9 Transformação da SL3261 com os plasmídeos pAE_IL-2 e pAE_TRAIL

O estoque de células eletrocompetentes foi descongelado em banho de gelo e incubado com aproximadamente 100 ng do DNA de interesse. Em seguida, a mistura de células e DNA foi transferida para uma cubeta de eletroporação de 0,2 mm de distância entre os eletrodos e foi feita a descarga do pulso elétrico de 25 μF de capacitância, 2,5 KV e 200 Ohms de resistência (eletroporador Bio-Rad, modelo Gene Pulser). Imediatamente após o pulso, foram adicionados 400 μL de meio SOC à cubeta, e a suspensão foi transferida para um tubo de 1,5 mL, a fim de ser incubada por 1 hora a 37°C e 200 rpm. Após isso, foi feito o plaqueamento de alíquotas de 200 μL da cultura em placas de LB ágar com ampicilina a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que foram então incubadas a 37°C por 16 horas. Algumas colônias crescidas no meio seletivo foram inoculadas em meio líquido LB contendo ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incubadas a 37°C e 200 rpm de 14 a 18 horas para preparação de estoques em glicerol 20%.

3.2 PRODUÇÃO DE TRAIL E IL-2 PURIFICADAS

As proteínas TRAIL e IL-2 foram também produzidas por expressão heteróloga de forma que pudessem ser purificadas. No momento da definição das sequências a serem sintetizadas, foi levada em consideração a necessidade de expressar essas proteínas de forma que a purificação por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) fosse possível. Para isso, foram adicionados sítios de restrição que viabilizassem a inserção das sequências sintetizadas à plasmídeos que possuem a his-tag e que a adicionassem à TRAIL e IL-2. O plasmídeo escolhido foi o pET28a (figura 11). As proteínas purificadas foram utilizadas para controle no Western blot e posteriormente para uma das abordagens do teste de MTT (viabilidade celular).

Figura 11 - Plasmídeo pET28a



Mapa do plasmídeo pET28a com detalhe para o sítio de múltipla clonagem. **Fonte:** Genscript, 2019.

3.2.1 Ligação dos insertos ao vetor de expressão pET28a

O vetor pET28a foi previamente digerido com as enzimas de restrição específicas para cada inserto (TRAIL e IL-2). Os insertos foram então ligados ao plasmídeo conforme descrito 3.1.7. Foram realizadas duas reações de ligação: pET28a+TRAIL e pET28a+IL-2.

3.2.2 Transformações de *E. coli* DH5α

As transformações de *E. coli* DH5 α com os plasmídeos construídos pET28a_TRAIL e pET28a_IL-2 foram realizadas por choque térmico, como descrito no item 3.1.4. As colônias transformadas foram selecionadas em meio LB contendo kanamicina 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Algumas dessas colônias foram selecionadas, incubadas em meio LB líquido com kanamicina e utilizadas para extração plasmidial. A confirmação das construções foi realizada por ensaio de restrição dos plasmídeos extraídos com as enzimas *NdeI* e *HindIII* para o plasmídeo pET28a_TRAIL e *NdeI* e *EcoRI* para o plasmídeo pET28a_IL-2. Em seguida foi feita a análise das bandas das amostras digeridas por eletroforese em gel de TAE agarose (0,8 %) contendo brometo de etídio.

3.2.3 Transformações de *E. coli* BL21(DE3)

O restante dos plasmídeos advindos da extração plasmidial de *E. coli* DH5 α para a confirmação da construção em gel de agarose foi utilizado para a transformação de células de *E. coli* BL21(DE3) competentes. A transformação foi feita por choque térmico e as células foram plaqueadas em LB ágar contendo kanamicina 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.2.4 Expressão heteróloga e purificação por cromatografia de afinidade

Colônias isoladas dos transformantes foram inoculadas em meio LB adicionado de kanamicina 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ensaios de expressão pela indução com IPTG 0,1 mM, adicionado na fase *mid-log* de crescimento populacional bacteriano ($\text{DO}_{600\text{nm}} \cong 0,5$). Os ensaios de expressão foram incubados por 16 horas a 20 °C em agitação a 250 rpm. Ao final da indução, as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em 50 mL de tampão (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM) e lisadas por 5 pulsos de ultrassom (Sonic Dismembrator 500, Fisher Scientific), com intervalos de 1 minuto entre os pulsos, sob banho de gelo. A fração solúvel do lisado foi separada do particulado insolúvel por centrifugação a 4 °C, 12.000 x *g* por 10 minutos.

Para a purificação da proteína recombinante por IMAC, a fração solúvel do lisado celular foi aplicada sobre uma coluna de níquel imobilizado (IMAC *Sepharose 6 Fast Flow resin* - GE Healthcare) e a proteína foi eluída da coluna aplicando-se um gradiente de concentrações de imidazol (de 5 mM a 250 mM). Alíquotas das frações solúvel e insolúvel, bem como alíquotas do pós-coluna (após a passagem da fração

solúvel do lisado pela coluna cromatográfica de afinidade) e dos eluatos em imidazol foram submetidas à análise em SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) para averiguar a funcionalidade dos sistemas de expressão e purificação.

3.3 ANÁLISES DE EXPRESSÃO DE TRAIL E IL-2

3.3.1 Análise por SDS-PAGE

Para análise de expressão das proteínas foram realizados cultivos de SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2 induzidos por anaerobiose, posteriormente analisados por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Foram inoculados, a partir de uma colônia isolada, 5 mL de meio LB com ampicilina a 100 µg/mL. Para indução, os tubos foram completados com meio LB e bem fechados, para vetar a entrada de oxigênio, quando a DO_{600nm} do cultivo atingiu 0,4. As amostras permaneceram incubadas, a 37 °C, por 4-6 h para expressão das proteínas. Após esse período, foi retirado 1 mL de cada cultivo e centrifugado a 10.000 x g por 1 minuto e foram utilizados apenas os sobrenadantes. Foi adicionado tampão Laemmli às amostras proteicas (50 µL de amostra e 50 µL de tampão), sendo q.s.p. 1X (loading buffer 2X) e foram fervidas por 15 minutos. Em seguida, as amostras e o marcador (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards 10-250KDa* – Bio-Rad) foram aplicados em um gel de poliacrilamida 12%. A eletroforese foi realizada (100 V a 200 V) e após a corrida, o gel foi corado com Coomassie blue de 14 a 18 horas a temperatura ambiente e descorado com ácido acético 7%.

3.3.2 Análise das proteínas do sobrenadante dos cultivos por Western blot

Primeiramente foi realizado um gel SDS-PAGE com as amostras de sobrenadante dos cultivos de expressão das proteínas de interesse (TRAIL E IL-2). Após a corrida, as proteínas resolvidas em gel SDS foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose sob corrente elétrica de 100 V, a 300 mA por aproximadamente 4 horas (Mini-PROTEAN Tetra Cell - BioRad). A membrana foi retirada do sistema de transferência e corada com vermelho Ponceau por 5 minutos para a confirmação da transferência e, em seguida, foram descoradas rapidamente com água destilada. Com uma agulha, as bandas do marcador de massa molecular

(*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards 10-250KDa* – Bio-Rad) foram marcadas. Após a marcação, a membrana foi bloqueada com leite desnatado 9% em tampão TBST à temperatura ambiente e deixada em leve agitação de 14 a 18 horas. A membrana foi lavada 5 vezes por 5 minutos para a total retirada do leite. Após o bloqueio, a membrana foi incubada por duas horas à temperatura ambiente na presença de anticorpos primários diluídos em TBST (anti-TRAIL e anti-IL-2 da Thermo Fisher Scientific ®), em uma concentração de 1:5000. Novo ciclo de lavagem foi realizado e a membrana foi incubada com anticorpo secundário (anti-Rat IgG2a da Thermo Fisher Scientific ®), em concentração 1:5000. Após duas horas, nova lavagem foi realizada. O substrato de H₂O₂ e Tetrametilbenzidina 1:1 (TMB – revelador Kit Bio-Rad) foi adicionado e incubado por 5 minutos. A aquisição de imagem foi realizada por equipamento de detecção quimio luminescente ChemiDoc (Bio-Rad).

3.3.3 Análise de produção das proteínas por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

Para a análise de produção das proteínas TRAIL e IL-2 pelas linhagens SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2, foram utilizadas amostras do sobrenadante de cultivo celular de 14 a 18 horas e o sobrenadante do cultivo da linhagem SL3261 sem plasmídeos foi utilizado para comparação. Além disso, foi feito um controle contendo apenas meio LB. A DO de cada cultivo foi medida a 600nm e ajustada para equalização dos grupos. Os procedimentos foram seguidos de acordo com a indicação do fabricante (Thermo Fisher Scientific ®).

Inicialmente, placas de 96 poços de poliestireno foram sensibilizadas com 100µL/poço de sobrenadante das três linhagens utilizadas e meio LB. As amostras foram plaqueadas em quadruplicata. As placas foram incubadas por até 18 h a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas por 3 vezes com 300 µL/poço de PBST e foram adicionados 200 µL/poço da solução de albumina 1% para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficos, por 1 hora e meia. Após novo ciclo de lavagem, 50 µL/poço de anticorpos primários (monoclonais anti-TRAIL e anti-IL-2) foram adicionados, em concentração 1:10000, diluídos em tampão carbonato e incubados a 37°C por 2 horas. As placas foram então novamente lavadas e 100 µL/poço do anticorpo secundário (anti-Rat IgG2a) diluído em PBS, em concentração 1:10000, foram adicionados e incubados a 37°C. Após 1 hora e meia, foram feitas lavagens e 100 µL/poço de

Substrato de H₂O₂ e Tetrametilbenzidina 1:1 (TMB – revelador) foram adicionados, reagindo com as amostras por até 30 minutos. A reação foi bloqueada pela adição de 50 µL/poço de Solução Stop (2,0 M H₂SO₄). A leitura da absorbância foi obtida no comprimento de onda de 450 nm em um espectrofotômetro de placa (Multiskan Go). A análise foi feita a partir da comparação da absorbância entre os diferentes grupos.

3.3.4 Detecção por fluorescência da expressão das proteínas TRAIL e IL-2 fusionadas à EmGFP e YFP

Foram realizados cultivos de SL3261 (aerobiose), SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2 em anaerobiose de 14 a 18 horas, a 37°C e alíquotas foram centrifugadas a 5000 x g. Os sobrenadantes foram adicionados a placas pretas Costar® 96 poços. A leitura foi feita em Espectrofotômetro SpectraMax i3 da Molecular Devices, localizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSCar, gentilmente cedido pela Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo. Esse equipamento é constituído em monocromador para leituras de fluorescência intensiva, sendo a leitura de EmGFP com emissão a 509 nm e excitação a 487 nm; e a leitura de YFP com emissão a 527 nm e excitação a 514 nm.

3.4 ENSAIOS *in vitro* COM CÉLULAS TUMORAIS HCT-8

3.4.1 Cultivo de HCT-8

A linhagem celular HCT-8 foi adquirida comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram mantidas em garrafas de cultura com meio DMEM (Sigma D5648), contendo L-glutamina a 4 mM e glucose 4,5 g/L. Houve suplementação com 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 1 mM de piruvato de sódio, 1% de P/S (penicilina e streptomina) e 10% de soro fetal bovino. O pH do meio foi ajustado para 7,2. As células foram cultivadas a 37 °C em incubadora com 5% de CO₂. Os repiques celulares para novas garrafas eram realizados com o uso de tripsina e a cada dois dias.

3.4.2 Ensaio de citotoxicidade

As atividades citotóxicas de TRAIL e IL-2 foram avaliadas de duas formas distintas. No primeiro teste foram utilizados sobrenadantes de SL3261, SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2, além do grupo MIX (dose com metade de SL3261_TRAIL e metade de SL3261_IL-2). No segundo teste TRAIL e IL-2 foram utilizadas na sua forma purificada em que as células HCT-8 foram expostas a 10 ng/mL de cada proteína e o MIX. A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio colorimétrico MTT (MTT- [3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) 2, 5-difeniltetrazolium bromide] - Sigma-Aldrich, EUA), em que a viabilidade celular é proporcional à intensidade de cor apresentada (MOSMANN, 1983). A linhagem celular HCT-8 foi plaqueada em placas de 96 poços, contendo 1×10^4 células/poço em 200 μ L de meio de cultura e cultivadas para que houvesse adesão celular ao poço, a 37 °C em incubadora com 5% de CO₂. Após a adesão (24 h), o meio de cultivo foi descartado e 100 μ L de DMEM foram adicionados novamente a cada poço. Além do meio de cultura, foram adicionados mais 100 μ L dos sobrenadantes de cultivo em crescimento de 14 a 18 horas de SL3261, SL3261_TRAIL, SL3261_IL-2 e MIX ou das proteínas purificadas, em sextuplicata. Como controle negativo (C-) foi utilizado meio de cultura DMEM e como controle positivo (C+) foi utilizado extran 5%. As placas foram então incubadas pelos períodos de 24, 48 e 72 horas (KIM et al, 2015). Em seguida, os sobrenadantes foram armazenados e os poços foram lavados com PBS 1X estéril. Então, 100 μ L de solução de MTT (5 mg/mL de MTT + meio de cultura incompleto) foram adicionados às placas e estas foram incubadas nas mesmas condições por 4 horas. A solução de MTT foi retirada com auxílio de pipetador multicanal e os cristais de formazan formados foram solubilizados com 100 μ L DMSO. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro de placa (Multiskan Go) a 570 nm. A porcentagem da viabilidade celular foi calculada com a absorbância de células não tratadas (controle negativo) representando 100% da viabilidade celular (% de células vivas = Abs. teste X 100/Abs. do controle negativo). Foram realizados três experimentos independentes.

3.4.3 Avaliação da produção de óxido nítrico durante a exposição da HCT-8 ao sobrenadante dos cultivos bacterianos

Para mensurar a produção de NO foi realizada a reação de Griess (SALTZMAN, 1954). 1×10^4 células/poço em 200 μ L de meio de cultura DMEM foram adicionadas às placas de 96 poços e incubadas em estufa de CO₂ por 24 horas, para

aderência celular. Em seguida, o meio foi retirado e 100 µL de meio DMEM foram novamente adicionados. Junto com o DMEM, 100 µL do sobrenadante de cultivo de 14 a 18 horas de SL3261, SL3261_TRAIL, SL3261_IL-2 e MIX foram adicionados. Como controle negativo foi utilizado apenas meio DMEM. A quantificação de NO foi realizada nos períodos de 24, 48 e 72 horas após a exposição da HCT-8 ao sobrenadante dos cultivos. Após os tempos estipulados, um volume de 50 µL do sobrenadante de cada grupo foi retirado e a ele adicionado 50 µL do reagente de Griess (diamina di-hidroclorido naftaleno-NEED a 0.1% diluído em água destilada (Sigma- Aldrich, EUA) + sulfanilamida a 1% (Sigma-Aldrich, EUA) diluída em ácido fosfórico a 5%). A produção de NO foi estimada pela quantificação do metabólito estável de NO, o nitrito (NO_2^-) (SALTZMAN, 1954). A absorvância a 550 nm foi medida em um espectrofotômetro de placas (Multiskan Go) após 15 minutos de reação. A concentração de nitrito no sobrenadante foi quantificada a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio. Foram realizados três experimentos independentes.

3.4.4 Determinação de apoptose por Citometria de fluxo

A apoptose/necrose *in vitro* induzida por TRAIL e IL-2 foi determinada por meio de marcação com kit de Anexina V (*PE Annexin V Apoptosis Detection Kit – BD Biosciences*) e leitura em citômetro de fluxo. A citometria de fluxo é uma técnica que permite a análise e quantificação de células em suspensão. O seu princípio baseia-se na dispersão da luz frontal (forward scatter – FSC, que determina o tamanho) e a luz lateral (side scatter – SSC, que determina granulosidade), emitidas de um feixe de luz (laser de argônio), e pela fluorescência emitida pelos fluorocromos ligados a anticorpos.

Nas células apoptóticas, o fosfolípido de membrana fosfatidilserina (PS) é translocado do interior para o exterior da membrana plasmática, ficando exposto ao ambiente celular externo. Anexina V tem uma alta afinidade pelo PS, e se liga a células em que o PS se encontra exposto. O kit possui a Anexina V conjugada com PE e o 7-AAD, uma solução corante de ácido nucleico. A Anexina V-PE permite a quantificação de células em apoptose. Por outro lado, a aplicação do 7-AAD permite a marcação das células em que há perda da integridade da membrana, células em necrose ou mortas por apoptose, dado que se intercala na dupla cadeia do DNA emitindo fluorescência. Neste sentido, pela exposição simultânea à Anexina V-PE e ao 7-AAD,

é possível a discriminação de quatro grupos: células viáveis, não marcadas pela Anexina V-PE e nem pelo 7-AAD; células em apoptose inicial, marcadas apenas pela Anexina V-PE; células em apoptose tardia/necrose, marcadas tanto pela Anexina V-PE quanto pelo 7-AAD; e células em necrose, apenas marcadas pelo 7-AAD.

Para a marcação celular foram utilizadas 1×10^5 células/poço em placas de 24 poços. Após 48 horas de exposição ao sobrenadante de cultivos de SL3261, SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2, as células foram centrifugadas a 1500 rpm, durante 5 minutos. Para o controle foram utilizadas células HCT-8 duplamente marcadas. Além disso, foi feito um grupo exposto à Camptotecina, como controle de apoptose (conforme indicado pelo Kit), pois se trata de uma substância conhecida por sua capacidade de induzir a apoptose em células *in vitro*. Para a marcação com os fluorocromos foram utilizados 2 μ L de cada marcador durante 15 minutos, a 4 °C no escuro. Os procedimentos foram realizados de acordo com as orientações do kit, e posteriormente as amostras foram submetidas ao Citômetro BD Accuri™ C6, localizado no Laboratório de Biologia do Envelhecimento da UFSCar, gentilmente cedido pela Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti. Foi estabelecido um *gate* com aquisição de 10.000 células por meio do *Software* BD Accuri™ C6, em que também foram realizadas as análises. Os resultados foram expressos em porcentagem de células identificadas com base na positividade de marcação para Anexina V-PE e 7-AAD.

3.5 ENSAIOS *in vivo* COM CAMUNDONGOS BALB/c E BALB/c NUDE

3.5.1 Determinação das curvas de crescimento das linhagens de SL3261

O crescimento celular foi acompanhado por leituras de absorbância do caldo de cultivo em DO_{600nm} e medidas de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Os cultivos foram realizados a partir da raspagem de células provenientes de criotubos armazenados a -80°C, incubadas em 10 mL de meio LB com Ampicilina a 100 μ g/mL, a 37°C e agitação de 200 rpm por 16 horas. Em seguida, foram transferidos 2 mL dessa cultura para 2 frascos com 200 mL de meio LB com Ampicilina 100 μ g/mL em Erlenmeyer de 500 mL, e as células foram incubadas a 37°C e agitação de 200 rpm. As medidas de concentração celular foram utilizadas para confeccionar uma curva de calibração para os valores de DO e tempo.

3.5.2 Animais

Para os testes de segurança do uso da linhagem SL3261 foram utilizados camundongos fêmeas SPF (*specific pathogen free*) da linhagem BALB/c, com aproximadamente 6 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da USP - Ribeirão Preto. Para a análise de desenvolvimento tumoral foram utilizados camundongos fêmeas SPF (*specific pathogen free*) da linhagem BALB/c NUDE, com aproximadamente 6 semanas de idade, provenientes do Biotério de Matrizes do ICB/USP – SP.

Os animais foram mantidos em racks ventiladas com isoladores no Biotério do Departamento de Morfologia e Patologia - UFSCar com livre acesso à água e alimento. Os experimentos foram feitos com a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar, atestada pelo protocolo nº 9970220817 presente no Anexo 1.

3.5.3 Inoculação oral de SL3261 em BALB/c

Para analisar a segurança do uso das linhagens produzidas, foi realizada a inoculação de SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2 em dois grupos distintos de animais. Os grupos receberam 5×10^7 UFC em uma dose de 200 μ L por via oral. O grupo controle recebeu apenas 200 μ L bicarbonato de sódio 0,05 M com pH 9,6 (também administrado aos outros grupos previamente à dose de bactérias). Os animais foram eutanasiados um e sete dias após a inoculação.

3.5.4 Inserção do tumor em BALB/c NUDE

A fim de realizar os testes de progressão tumoral e resposta aos agentes terapêuticos, os camundongos BALB/c NUDE receberam 1×10^7 células HCT-8 em 150 μ L de meio de cultura. A inoculação foi realizada por via subcutânea no flanco direito e os tumores já se encontravam em desenvolvimento a partir do terceiro dia pós inoculação.

3.5.5 Inoculação intratumoral de SL3261 em BALB/c NUDE

Para os tratamentos do câncer implantado foram realizados 4 grupos experimentais: Controle (inoculado com PBS), SL3261, SL3261_TRAIL e SL3261_TRAIL + SL3261_IL-2 (denominado MIX, sendo metade da dose de SL3261_TRAIL e metade de SL3261_IL-2). Os animais tratados foram inoculados com 200 µL de suspensão de bactérias (em solução salina 0,9%) com 5×10^7 UFC/mL ou 1×10^7 UFC/mL. A inoculação foi realizada no décimo dia pós inserção do tumor e os animais foram eutanasiados 14 dias após o tratamento.

3.5.6 Acompanhamento do tamanho e peso do tumor

O desenvolvimento tumoral foi acompanhado por meio de medidas realizadas de 3 em 3 dias após inoculação do tratamento. Para determinação do volume tumoral foi utilizada a fórmula: volume = (comprimento) x (largura)² x 0,52 (CHEN et al., 2012; YOON et al., 2017). No momento da eutanásia os tumores foram retirados e pesados.

3.5.7 Quantificação de citocinas TNF, IL-12 e IFN-γ

Para a quantificação das citocinas TNF, IL-12 e IFN-γ foram utilizadas amostras de plasma de animais BALB/c ou BALB/c NUDE que receberam ou não o tratamento. O procedimento foi realizado pelo método de ELISA conforme protocolo do fabricante (BD Biosciences®).

Inicialmente, placas de 96 poços de poliestireno foram sensibilizadas com 100µL/poço de uma solução contendo o tampão fosfato e anticorpos primários específicos para cada citocina, em concentração de 1:250. As placas foram incubadas por até 18 h a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas por 3 vezes com 300 µL/poço de PBST e foram adicionados 200 µL da solução de Albumina 1% para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficos. As placas foram novamente incubadas durante 1 hora e meia à temperatura ambiente e depois lavadas. Em seguida, foram adicionadas a curva padrão com as respectivas diluições e as amostras (100 µL/poço). O ensaio foi realizado em triplicata. Após 2 horas de incubação, foram feitas lavagens e 100 µL do anticorpo de detecção foram adicionados aos poços, em concentração de 1:250 (anticorpo secundário com streptavidina conjugado com a enzima

peroxidase). Após incubação a temperatura ambiente por 1 hora e meia, outro ciclo de lavagem foi realizado e foram adicionados 100 µL/poço de Substrato de H₂O₂ e Tetrametilbenzidina 1:1 (TMB – revelador), reagindo com as amostras por até 30 minutos. A reação foi bloqueada pela adição de 50 µL/poço de Solução Stop (2 M H₂SO₄). A leitura da absorbância foi obtida no comprimento de onda de 450 nm em um espectrofotômetro de placa (Multiskan Go). A análise foi feita a partir da curva de titulação dos padrões das citocinas e as concentrações finais foram determinadas em pg/mL.

3.5.8 Contagem de células globais e diferenciais

O sangue foi retirado por punção braquial utilizando-se pipetas Pasteur. A contagem global foi feita em câmara de Neubauer no momento da retirada do sangue em aumento de 400x, com solução de Turk (1:20 – amostra/reagente). A contagem diferencial de células foi feita em aumento de 1000x nos esfregaços sanguíneos corados com o kit Panótico rápido (Laborclin). O plasma foi separado por centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos e transferido para tubos de 1,5 mL com tampa, para armazenamento a -20°C.

3.5.9 Biodistribuição

Os tumores, baços e fígados dos animais BALB/c NUDE inoculados com SL3261 foram macerados separadamente em microtubos contendo 1,0 mL de solução salina NaCl 0,9%. Em seguida, foi realizada diluição seriada das amostras com solução salina (até 1:10 ou 1:100) e alíquotas de 100µL foram plaqueadas em LB ágar. As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas e a contagem das unidades formadoras de colônias foi realizada.

3.5.10 Histologia do tumor

Os tumores de dois camundongos por grupo experimental foram submetidos à análise histológica para avaliação de possível processo necrótico. Após a remoção no momento da eutanásia, os tumores foram lavados com PBS 1X e secos cuidadosamente em papel. Posteriormente, foram fixados em formol tamponado (4 g

de NaH_2PO_4 , 6,5 g de Na_2HPO_4 , 100 mL de formol e 900 mL de água destilada). A confecção das lâminas histológicas foi realizada pela técnica Ana Maria da Rocha do Laboratório de Citopatologia, no Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP – USP. Fragmentos de cada órgão foram incluídos em blocos de parafina e seccionados em cortes de 4 μm . As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação das células que compõem o tecido. A leitura das lâminas foi realizada pelo médico patologista responsável pelo laboratório, Prof. Dr. Edson Garcia Soares.

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos com média \pm EPM e analisados no programa GraphPad versão 5.0. Todos os dados foram submetidos ao teste de Normalidade e teste One Way RM Anova, no programa SigmaStat 4.0, para avaliar se eram dados paramétricos ou não. Para os dados paramétricos foi utilizado o teste One-way ANOVA e o pós-teste foi realizado pelo método de Tukey, ou então Two Way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste foi realizado pelo método de Dunn. No caso de comparações entre dois grupos independentes foram utilizados Teste t (paramétrico) ou Mann-Whitney (não paramétrico). A significância estatística foi estabelecida em valores de $p < 0,05$.

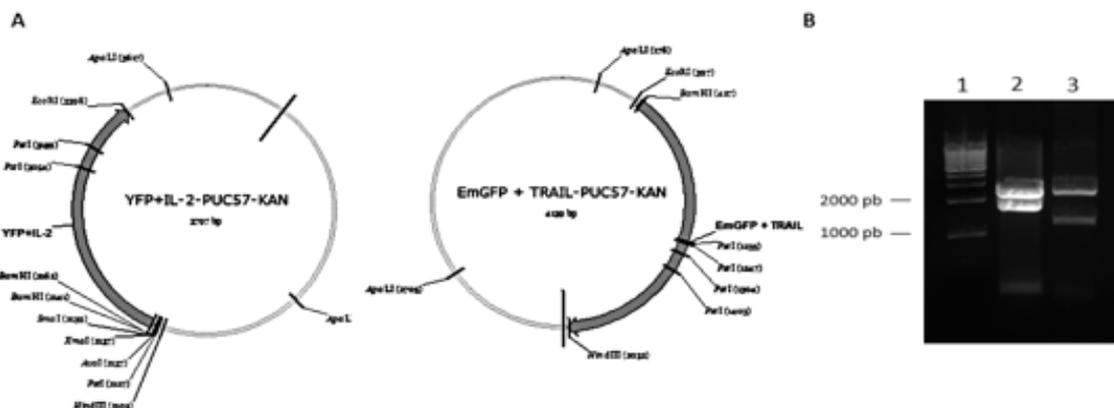
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONSTRUÇÃO DAS LINHAGENS SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2

4.1.1 Confirmação das construções sintetizadas em pUC57-kan e retirada dos insertos

A figura 12A mostra os vetores pUC57-kan_TRAIL e pUC57-kan_IL-2 que foram utilizados para transformação em *E. coli* DH5 α para fins de propagação. O DNA plasmidial foi retirado das células cultivadas por miniprep e submetido à digestão com as enzimas de restrição específicas e, pela análise da eletroforese em gel de agarose (figura 12B), foi possível confirmar as construções em pUC57-kan e visualizar as bandas correspondentes aos insertos (TRAIL: 1617 pb e IL-2: 1248 pb) e aos vetores pUC57-kan (aproximadamente 2,6 kb).

Figura 12 - Análise de restrição dos vetores e esquema representativo – pUC57-kan



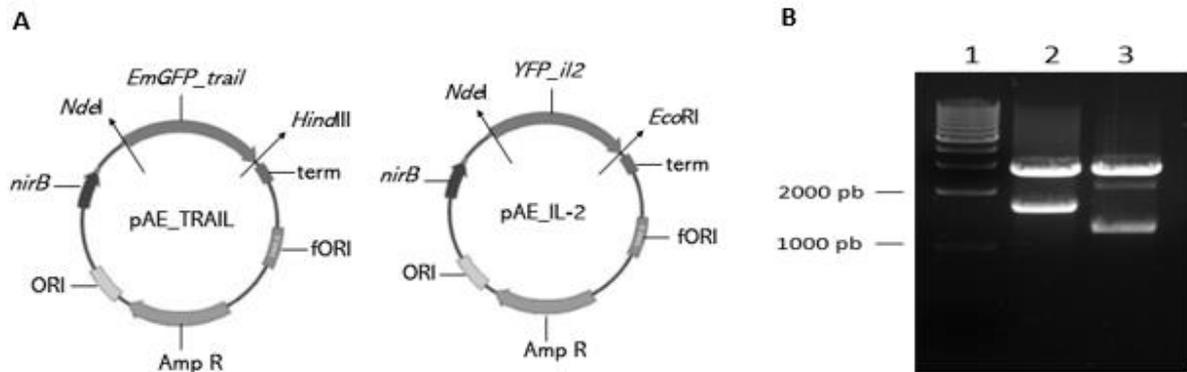
A- Mapa dos vetores com as seqüências gênicas de interesse: pUC57-kan_IL-2 e pUC57-kan_TRAIL adquiridas comercialmente. **B- Gel da digestão:** 1 – marcador molecular *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific®); 2 - pUC57-kan_TRAIL; 3 - pUC57-kan_IL-2. **Fonte:** arquivo pessoal.

4.1.2 Confirmação das construções pAE_TRAIL e pAE_IL-2

A figura 13A mostra os plasmídeos resultantes das reações de ligação e que foram utilizados na transformação de células de *E. coli* DH5 α para fins de propagação e extração de DNA plasmidial. Clones resistentes à ampicilina foram confirmados para a presença de inserto por dupla digestão do DNA plasmidial com as respectivas

endonucleases em eletroforese em gel de TAE agarose, conforme mostrado na figura 13B.

Figura 13 - Análise de restrição dos vetores e esquema representativo - pAE



A- Mapa das construções: pAE_TRAIL e pAE_IL-2. **B – Gel da digestão:** 1 – marcador molecular *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific®); 2 - pAE_TRAIL; 3 - pAE_IL-2. **Fonte:** arquivo pessoal.

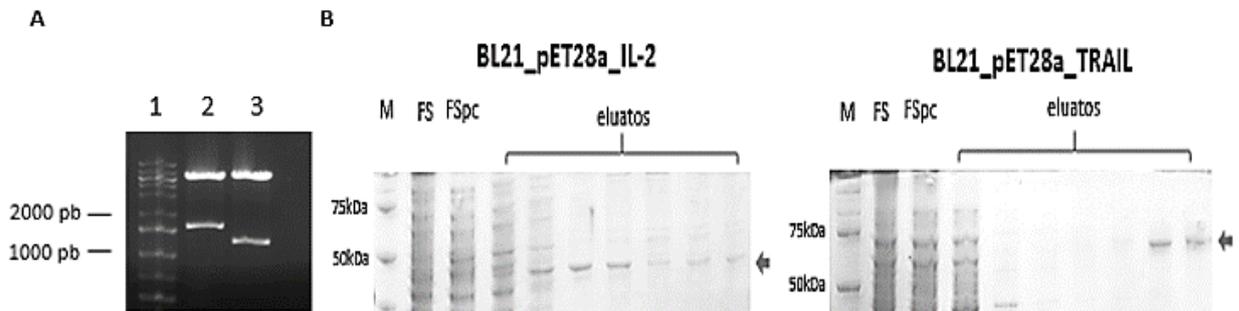
A análise do gel mostra que os insertos foram efetivamente ligados ao pAE e que as células de SL3261 eletrocompetentes poderiam receber os plasmídeos de interesse. É possível a visualização das bandas correspondentes aos insertos (TRAIL: 1617 pb e IL-2: 1248 pb) e aos vetores pAE (aproximadamente 2,8 kb).

Após transformação das linhagens por eletroporação foi possível iniciar os estudos com o vetor bacteriano vivo desenvolvido.

4.1.3 Produção de TRAIL e IL-2 purificadas

Para a produção das proteínas recombinantes purificadas foram realizados cultivos primeiramente na linhagem *E. coli* DH5 α carregando os plasmídeos pET28a_TRAIL e pET28a_IL-2. A análise do gel de agarose mostra que os insertos foram efetivamente ligados ao pET28a (figura 14A) e que a linhagem BL21 poderia receber os plasmídeos de interesse, e assim servir como vetor de expressão.

Figura 14 - Análise de restrição dos vetores e géis da purificação de TRAIL e IL-2



A- gel da digestão 1 – marcador molecular *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific ®); 2 – pET28a_TRAIL; 3 - pET28a_IL-2; **B – géis da purificação do pET28a:** M - Marcador (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* - Bio-Rad), FS- fração solúvel, FSpc- fração solúvel pós coluna.
Fonte: arquivo pessoal.

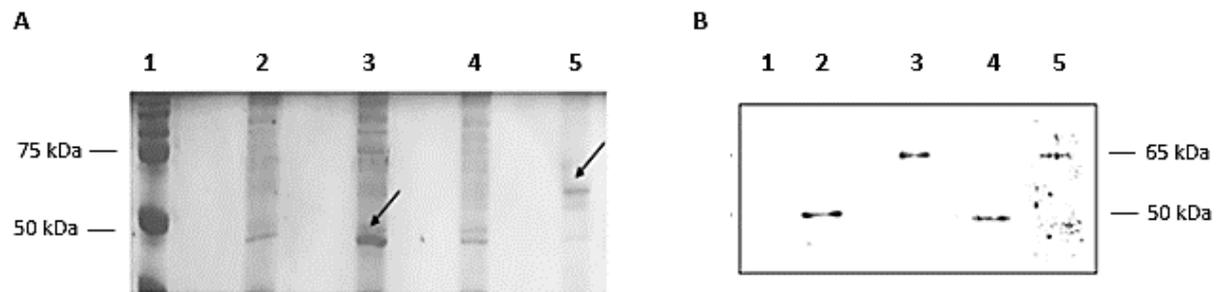
A figura 14B permite a análise do gel SDS que evidencia as bandas correspondentes às proteínas recombinantes purificadas por IMAC.

4.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS TRAIL e IL-2 PELA SL3261

4.2.1 Análise da expressão heteróloga por SDS-PAGE e Western blot

A figura 15 mostra a expressão de TRAIL e IL-2 em cultivos de SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2 pela visualização de bandas correspondentes às proteínas de interesse em gel SDS e em membrana de nitrocelulose. As proteínas produzidas por SL3261 possuem tamanhos conhecidos e com isso a identificação das proteínas no gel é possível (figura 15A). A fusão de EmGFP+ TRAIL possui massa molecular teórica de 64,2 kDa, já a fusão de YFP+IL-2 possui massa molecular teórica de 49,57 kDa.

Figura 15 - Análise da expressão de TRAIL e IL-2 recombinantes



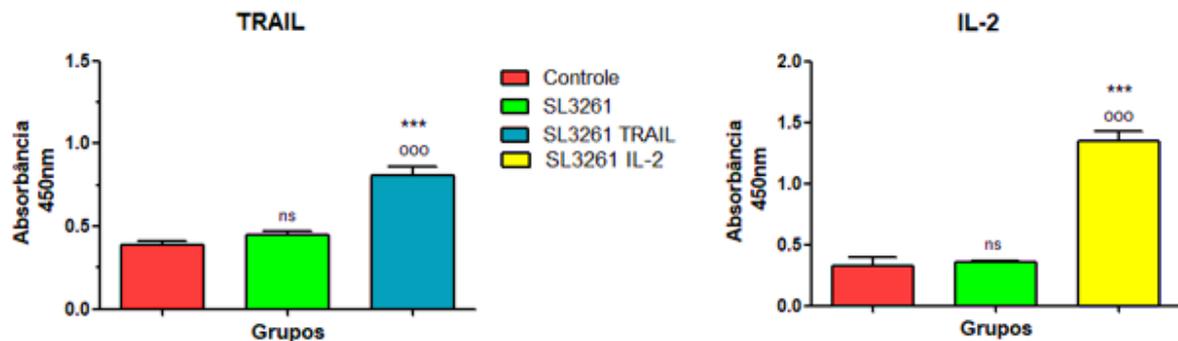
A: SDS-PAGE- 1- Marcador (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* - Bio-Rad); 2- SL3261_IL-2 em aerobiose; 3 – SL3261_IL-2 em anaerobiose; 4 – SL3261_TRAIL em aerobiose; 5 – SL3261_TRAIL em anaerobiose. **B: Western blot** - 1- marcador (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* - Bio-Rad); 2- IL-2 purificada marcada com anticorpo anti-His tag; 3- TRAIL purificada marcada com anticorpo anti-His tag; 4- IL-2 presente no sobrenadante de SL3261_IL-2 marcada com anticorpo anti-IL-2; 5- TRAIL presente no sobrenadante de SL3261_TRAIL marcada com anticorpo anti-TRAIL. **Fonte:** arquivo pessoal.

Pelas bandas expressas comparadas ao padrão, pode-se sugerir que a condição de anaerobiose induziu as expressões das proteínas TRAIL e IL-2 pela SL3261. Conforme mostrado na figura 15B, para a análise do Western blot foram utilizadas amostras de TRAIL e IL-2 purificadas como controle para comparação de altura das bandas na membrana e também foi possível confirmar a expressão das proteínas pela SL3261.

4.2.2 Análise das proteínas do sobrenadante dos cultivos por ELISA

A figura 16 mostra a expressão das proteínas de interesse no sobrenadante de cultivos induzidos de SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2, pelo método de ELISA. Nesta figura é possível observar uma produção significativa de TRAIL e IL-2 por esses grupos quando comparados aos grupos SL3261 e Controle.

Figura 16 - Análise de produção das proteínas por ELISA



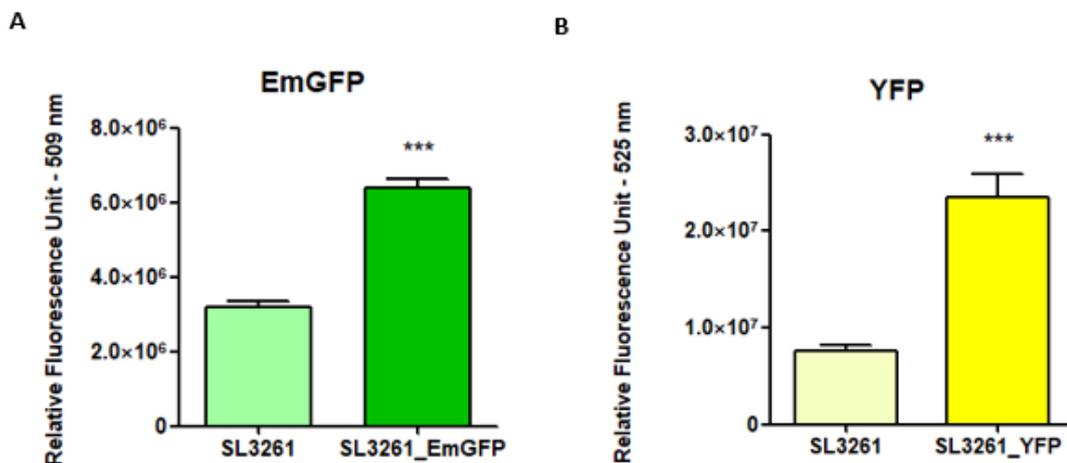
Produção de TRAIL/IL-2 no sobrenadante de cultivo celular de SL3261. Os dados representam a média \pm EPM em quadruplicata. O símbolo ***($p < 0,001$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo SL3261_TRAIL/SL3261_IL-2 quando comparado ao grupo Controle (meio LB). *** ($p < 0,001$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo SL3261_TRAIL/SL3261_IL-2 quando comparado ao grupo SL3261. ns representa que não há diferença estatística significativa quando comparado ao grupo Controle. **Fonte:** arquivo pessoal.

O promotor nirB, utilizado neste trabalho, é induzido por anaerobiose e seu uso é indicado em bactérias anaeróbias facultativas. Este apresenta excelente estabilidade e tem sido explorado em imunoterapia de câncer mediada por *Salmonella* (CHEN et al., 2012). Muitos estudos atestam a expressão de suas proteínas alvo por esse promotor (CHEN et al., 2012; HUANG; HAJISHENGALLIS; MICHALEK, 2000; JIANG et al., 2017; REZA; AKBARI EIDGAHI, 2014; YANG et al., 2016). O nirB é regulado pelo ambiente do hospedeiro e tem sido demonstrado que induz a produção de vários imunógenos na sorovar Typhimurium, sob condições anaeróbias ou dentro de células eucarióticas. Evidências *in vivo* sugerem que o promotor nirB pode ser um sistema de expressão altamente eficiente para o uso em vetor bacteriano vivo (HUANG; HAJISHENGALLIS; MICHALEK, 2000). Em seus estudos, Chen et al. (2012), avaliaram a expressão de TRAIL pelo promotor nirB em *Salmonella* atenuada, constatando seu acúmulo preferencial em tecidos tumorais (melanoma) e que o promotor conduziu eficazmente à expressão dirigida de TRAIL. O promotor nirB é derivado de *E. coli* e representa um dos melhores promotores regulados *in vivo* em *S. Typhimurium* atenuada (DUNSTAN; SIMMONS; STRUGNELL, 1999). Conforme os resultados mostrados nas figuras 15, 16 e 17, esse promotor se mostrou eficiente ao conduzir a expressão das proteínas TRAIL e IL-2 pelas linhagens recombinantes propostas nesse estudo.

4.2.3 Detecção e Emissão de fluorescência

A figura 17 mostra a fluorescência emitida por amostras de sobrenadante de cultivo em anaerobiose de SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2. O comprimento de onda utilizado na medição foi o correspondente ao pico de emissão de cada fluoróforo específico. As emissões foram comparadas com sobrenadante de SL3261 e as emissões de EmGFP (figura 17A) e YFP (figura 17B) se mostraram aumentadas significativamente em relação a este.

Figura 17 - Emissão de fluorescência



A: leitura a 509 nm de EmGFP (TRAIL); **B:** leitura a 525 nm de YFP (IL-2). Os dados representam a média \pm EPM em quadruplicata. O símbolo ***($p < 0,001$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo SL3261_EmGFP/SL3261_YFP quando comparado ao grupo SL3261. **Fonte:** arquivo pessoal.

A emissão produzida pelas linhagens confirma a expressão heteróloga das proteínas de interesse pela SL3261, uma vez que as sequências do marcador e da proteína foram sintetizadas de forma fusionada. O uso de marcadores fluorescentes é comum nesse tipo de construção, sendo presente em muitos estudos de modelos tumorais, inclusive de forma combinada com a TRAIL (CHEN et al., 2012) e com a IL-2 (BARNETT et al., 2005).

A aquisição de imagens de fluorescência se trata de uma técnica não invasiva que tem sido utilizada na terapia gênica do câncer com sucesso para visualizar vetores bacterianos e proteínas. Para isso, uma fonte de luz externa excita um fluoróforo por luz filtrada, de um comprimento de onda definido, resultando na emissão de um sinal fluorescente. Este sinal pode ser identificado e quantificado tanto *in vitro* como *in vivo*,

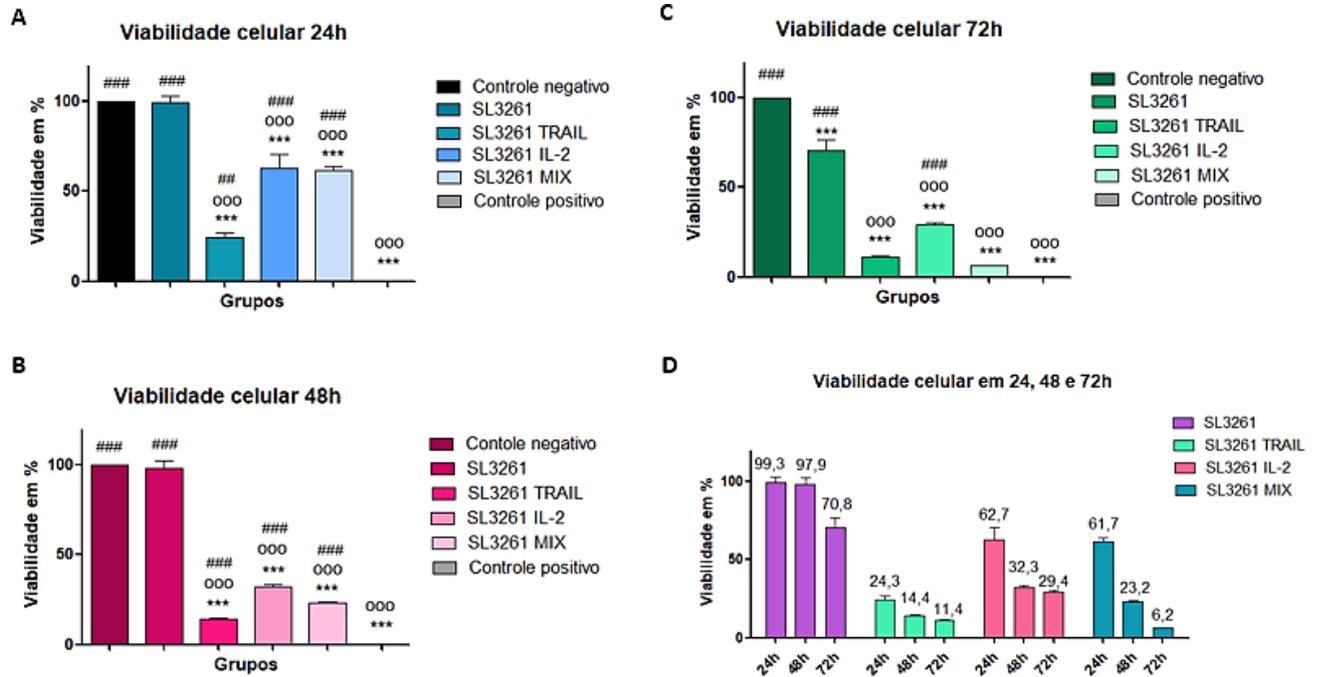
sem a necessidade de sacrifício de células/animais. A marcação por fluorescência permite que as amostras sejam analisadas por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo (CRONIN et al., 2012).

4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO *in vitro* COM A LINHAGEM TUMORAL HCT-8

4.3.1 Citotoxicidade

A figura 18 mostra a viabilidade celular analisada pelo teste de MTT após a exposição das células HCT-8 ao sobrenadante dos cultivos das diferentes linhagens de SL3261. Segundo os resultados, tanto TRAIL quanto IL-2 apresentaram efeito citotóxico quando em contato com as células por 24, 48 e 72h (figura 18A, 18B e 18C, respectivamente). Houve uma redução significativa da viabilidade celular dos grupos TRAIL, IL-2 e MIX quando comparados aos grupos Controle e SL3261. Esses resultados sugerem que o efeito citotóxico exercido por essas proteínas, que leva à inviabilidade celular, tem início já nas primeiras 24h de exposição às proteínas recombinantes e vai se intensificando ao longo dos dias, sugerindo um efeito tempo dependente. A figura 18D mostra a comparação das viabilidades celulares encontradas nos diferentes grupos tratados nos três tempos de exposição avaliados.

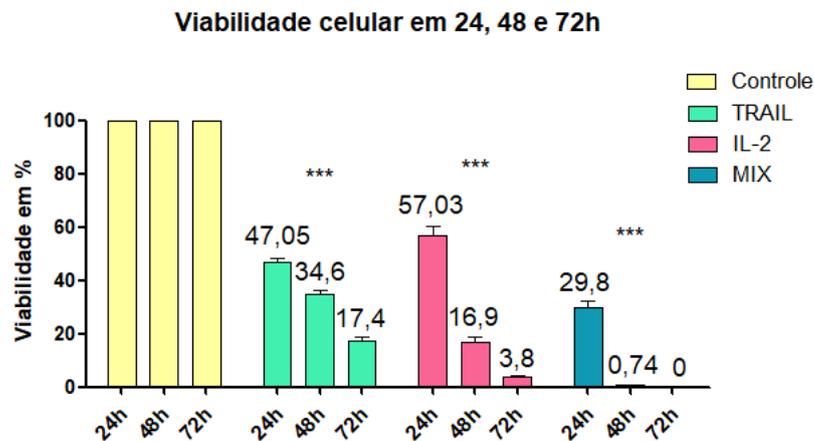
Figura 18 - Viabilidade celular da linhagem HCT-8 após 24, 48 e 72 horas de exposição ao sobrenadante da SL3261



A, B e C: viabilidade celular dos diferentes grupos. Os dados representam a média \pm EPM (n= 6). O símbolo *** (p<0,001) representa a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos SL3261, SL3261_TRAIL, SL3261_IL-2, SL3261_MIX e Controle Positivo quando comparados ao grupo Controle Negativo. O símbolo ^{ooo} (p<0,001) representa a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos SL3261_TRAIL, SL3261_IL-2, SL3261_MIX e Controle Positivo quando comparados ao grupo SL3261. Os símbolos # (p<0,01) e ### (p<0,001) representam a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos Controle Negativo, SL3261, SL3261_TRAIL, SL3261_IL-2 e SL3261_MIX quando comparados ao grupo Controle Positivo. **D: Comparação da porcentagem de viabilidade celular após 24, 48 e 72h de exposição das células HCT-8 ao sobrenadante dos cultivos celulares bacterianos.** Fonte: arquivo pessoal.

Para fins de comparação do efeito citotóxico, o ensaio de MTT foi abordado também de outra maneira, em que TRAIL e IL-2 foram utilizadas na forma purificada em contato com as células HCT-8 (figura 19). Nesse teste foi possível analisar um padrão de perda de viabilidade celular, assim como encontrado nos estudos de exposição ao sobrenadante de culturas bacterianas. Há uma acentuada diminuição da viabilidade celular nos grupos que foram expostos a TRAIL e IL-2 purificadas, sobretudo no grupo em que ambas as proteínas foram colocadas em contato com as células (MIX). É possível observar que após 72h de exposição ao MIX, não há mais viabilidade nas células HCT-8. Isso mostra um efeito citotóxico que pode ser atribuído às proteínas recombinantes (figura 19).

Figura 19 - Comparação da porcentagem de viabilidade celular da linhagem HCT-8 após 24, 48 e 72 horas de exposição às proteínas TRAIL e IL-2 purificadas



Os dados representam a média \pm EPM ($n=6$). O símbolo *** ($p<0,001$) representa a diferença significativa entre os resultados obtidos nos grupos expostos às proteínas purificadas TRAIL, IL-2 e ao MIX quando comparados ao grupo Controle. **Fonte:** arquivo pessoal.

Os ensaios de MTT são amplamente utilizados para avaliação de citotoxicidade, viabilidade celular e estudos de proliferação em biologia celular (STOCKERT et al., 2012). A técnica é baseada na ação de enzimas desidrogenases mitocondriais encontradas em células vivas e metabolicamente ativas, que clivam o anel de tetrazólio (sal de MTT de coloração amarela e solúvel em água), transformando-o em cristais de formazan lipossolúvel (coloração purpura/roxo e insolúvel em água), que pode ser extraído com solventes orgânicos e estimado por espectrofotometria. Sendo assim, a redução do MTT a formazan é proporcional a viabilidade celular (MOSMANN, 1983; STOCKERT et al., 2012). Muitos estudos com células tumorais utilizam esse método para evidenciar a ação da terapia proposta e muitos destes analisam o desempenho da TRAIL nesse contexto (CAO et al., 2010; KIM et al., 2015; LIN et al., 1995; QIU et al., 2013; VOIGT et al., 2014; ZHAO et al., 2018).

Em seus estudos Chen et al. (2012), demonstraram a sensibilidade *in vitro* do melanoma para a apoptose induzida por TRAIL recombinante tanto na forma purificada, quanto em sobrenadantes de cultivos. Houve um aumento da indução de apoptose nesses casos em relação à bactéria que não produzia TRAIL (CHEN et al., 2012). A ação acentuada na diminuição da viabilidade celular nos grupos TRAIL e MIX está associada ao efetivo mecanismo de indução de apoptose mediada por TRAIL.

Existem duas principais vias de sinalização que levam à apoptose em células de mamíferos: a via intrínseca e a via extrínseca. A via intrínseca é controlada pelas proteínas da família Bcl-2 pró apoptótica na mitocôndria e tem um papel substancial na morte celular. Em contraste, a via de morte extrínseca é iniciada através de cascatas de transdução de sinal apoptótico, mediadas por membros da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral, que quando ativados por seus ligantes como o TRAIL, rapidamente iniciam a ativação da caspase resultando em apoptose (JOHNSTONE; FREW; SMYTH, 2008; MACFARLANE, 2003). Dessa forma, nossos resultados sugerem que, possivelmente a diminuição da viabilidade celular da célula tumoral seja devido a ativação de morte direta pela via extrínseca, mas também possa ocorrer uma ativação da via intrínseca de forma indireta, em que a expressão da proteína TRAIL poderia contribuir progressivamente com a morte dessas células por essas vias.

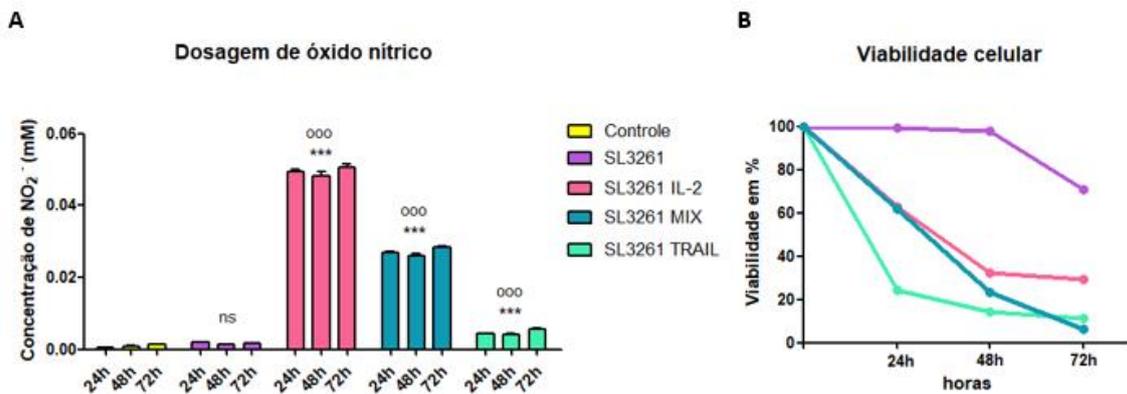
4.3.2 Produção de óxido nítrico induzido pelas proteínas TRAIL e IL-2

A figura 20 mostra a produção de óxido nítrico, por meio da reação de Griess (AL-RAMADI et al., 2003), pelas células HCT-8 expostas às proteínas recombinantes e a compara com a viabilidade celular obtida pelo ensaio de MTT. Pela análise da figura 20A pode-se ressaltar a diferença significativa na concentração de NO_2^- nos grupos IL-2, TRAIL e MIX em relação aos grupos Controle e SL3261. Quando esses dados são comparados à viabilidade celular (figura 20B), pode-se associar a baixa viabilidade dos grupos TRAIL, IL-2 e MIX com a significativa produção de óxido nítrico. No caso da TRAIL, é possível observar uma menor concentração de óxido nítrico comparado à IL-2 e MIX, o que sugere uma menor mortalidade induzida por ele, embora o teste de MTT dos sobrenadantes do cultivo indique menor viabilidade no grupo da TRAIL do que no grupo da IL-2. Isso pode ser atribuído ao fato da principal ação de TRAIL na indução da morte celular ser a ligação desta aos receptores de morte, que no caso das células tumorais, induzem apoptose tanto pela via extrínseca quanto pela via intrínseca (JOHNSTONE; FREW; SMYTH, 2008).

A atividade da IL-2 pode ser parcialmente e indiretamente mediada via NO, que possui propriedades anti-angiogênica e antitumorais (SAKKOULA; PIPILI-SYNETOS; MARAGOUDAKIS, 1997). Os dados indicam que a morte celular, principalmente no grupo da IL-2 e MIX (sugerindo papel da IL-2), pode estar associada a elevada

concentração de NO_2^- . Além disso, não houve aumento de NO_2^- no grupo exposto à SL3261 quando comparado ao Controle, sugerindo que a indução de morte por essa via não se mostrou significativa e isso é confirmado pela alta viabilidade celular desse grupo.

Figura 20 - Produção de NO e Viabilidade celular



A: produção de óxido nítrico em HCT-8 após exposição ao sobrenadante de SL3261. Os dados representam a média \pm EPM (n= 6). O símbolo ***($p < 0,001$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos TRAIL, IL-2 e MIX quando comparados ao grupo Controle. ^{ns} representa que não há diferença estatística significativa do grupo SL3261 quando comparado ao grupo Controle. O símbolo ^{ooo} ($p < 0,001$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos TRAIL, IL-2 e MIX quando comparados ao grupo SL3261. **B: comparação da viabilidade celular dos grupos em 24, 48 e 72h de exposição ao sobrenadante de SL3261, TRAIL, IL-2 e MIX.** Fonte: arquivo pessoal.

O óxido nítrico é produzido em grandes quantidades a partir do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase. O excesso de produção não controlada de NO pode resultar em danos à célula hospedeira devido ao seu alto potencial reativo (LALSAMTHARA et al., 2018). Muitas células são capazes de sintetizar NO. Três isoenzimas NO sintase foram identificadas como responsáveis por esta síntese. A isoforma II de NO sintase, a iNOS, geralmente não é expressa constitutivamente mas pode ser induzida em macrófagos e muitas outras células durante diferentes respostas imunes (FÖRSTERMANN et al., 1994). Trata-se de uma enzima capaz de produzir quantidades tóxicas de NO que representam um importante componente da atividade antimicrobiana, antiparasitária e antineoplásica das células. Células diferentes podem usar diferentes vias para indução da iNOS, embora essas vias possam eventualmente convergir na ativação dos mesmos fatores de transcrição, como a ativação do fator de transcrição NF- κ B, que parece ser um passo essencial para a ação de iNOS. Estudos demonstraram a enzima em vários tipos de células, incluindo macrófagos, linfócitos,

neutrófilos e eosinófilos no baço, células de Kupffer, células endoteliais, hepatócitos, macrófagos alveolares no pulmão, eosinófilos, mastócitos e células endoteliais no cólon (BANDALETTOVA et al., 1993). As citocinas (ou combinações de citocinas) que produzem alta expressão de iNOS variam entre espécies e tipos de células. Além disso, em alguns tipos celulares, outros agentes são indutores eficazes da iNOS como: radiação ultravioleta, ozônio, trauma e produtos bacterianos (LPS e endotoxinas) (FÖRSTERMANN; KLEINERT, 1995).

O IL-2R, que é o receptor de IL-2, é amplamente expresso entre células imunes e células tumorais (YANG et al., 2016). Os carcinomas humanos expressam espontaneamente abundante IL-2R na superfície celular, contêm mRNA para as cadeias IL-2R β e IL-2R α e podem ter crescimento inibido por IL-2 exógena (LIN et al., 1995). Além disso, a IL-2 interage no complexo IL-2R das células endoteliais do pulmão e cérebro, induzindo a desestabilização das junções aderentes através de um aumento na fosforilação e internalização da VE-caderina, acompanhado pela ativação do NF- κ B, resultando na liberação de mediadores pró-inflamatórios (MORTARA et al., 2018). Sugere-se que a diminuição da viabilidade de células HCT-8 em experimentos *in vitro* com IL-2, produzida por SL3261, tenha ocorrido de forma análoga a esses processos. Sendo a linhagem utilizada um adenocarcinoma colorretal, o receptor de IL-2 é expresso nessas células e foi capaz de proporcionar a indução de iNOS. As três fontes enzimáticas de NO, nNOS, eNOS e iNOS foram caracterizadas no trato gastrointestinal. De acordo com a literatura, existe expressão aumentada de iNOS e eNOS em cânceres colorretais humanos. Verificou-se também que o tecido do câncer do cólon apresenta RNAm da NOS (CHOUDHARI et al., 2013).

Quando a iNOS produz grandes quantidades de NO, há um princípio citotóxico importante nas células. Devido à sua afinidade pelo ferro ligado a proteínas, o NO pode inibir várias enzimas chave que contêm ferro em seus centros catalíticos. Estas incluem a redutase do ribonucleotídeo (limitação da taxa na replicação do DNA), enzimas dependentes do cluster ferro-enxofre envolvidas no transporte de elétrons mitocondriais, e cis-aconitase no ciclo do ácido cítrico. Além disso, maiores concentrações de NO podem diretamente interferir com o DNA das células-alvo e causar quebras de cadeia e fragmentação. Uma combinação destes efeitos forma provavelmente a base dos efeitos citostáticos e citotóxicos do NO nas células tumorais (CHOUDHARI et al., 2013; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003; FÖRSTERMANN et

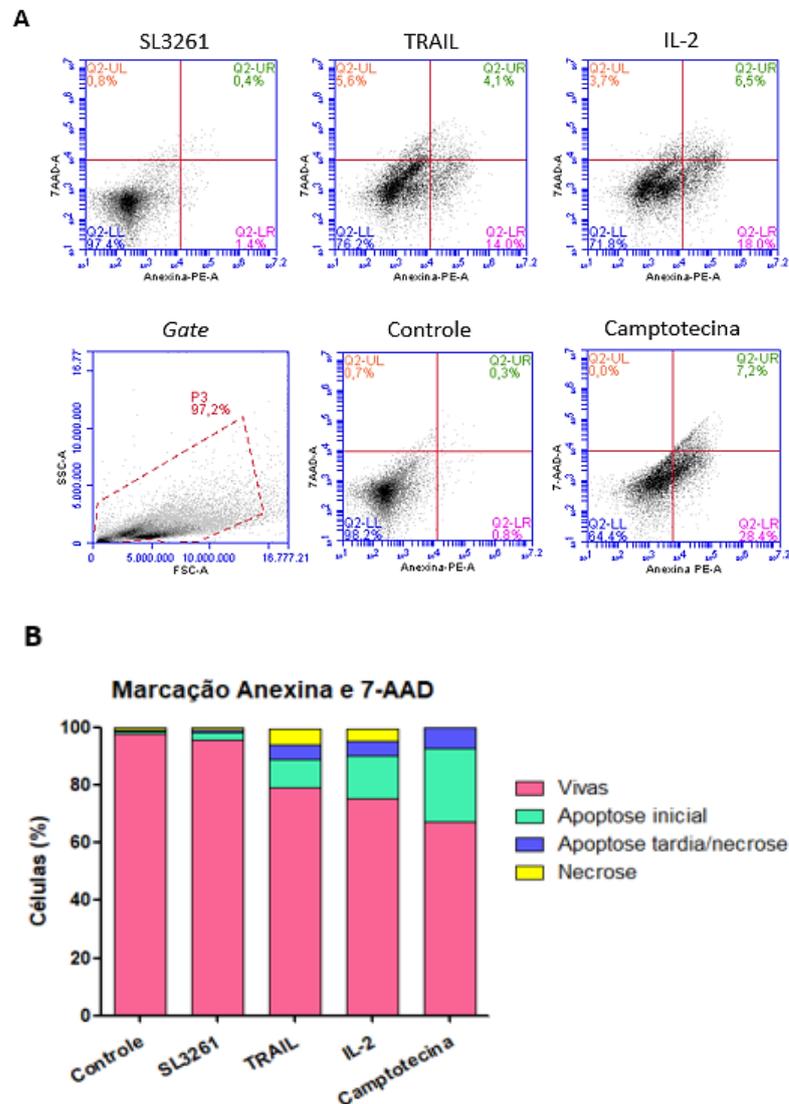
al., 1994; REZA; AKBARI EIDGAHI, 2014). Um alto nível de NO foi proposto para suprimir a metástase (CHOUDHARI et al., 2013).

Segundo estudos de Sakkoula et al. (1997), a IL-2 estimula a atividade da NO sintase induzível *in vitro* (SAKKOULA; PIPILI-SYNETOS; MARAGOUDAKIS, 1997). Além disso, uma vez que o NO pode estar associado ao efeito antiangiogênico da IL-2, a importância do NO como modulador da angiogênese sugere potencial alvo para o controle de doenças dependentes da angiogênese, como o câncer.

4.3.3 Detecção de Anexina V

A figura 21 mostra os resultados do ensaio de apoptose realizado para determinar se TRAIL e IL-2, produzidas de maneira heteróloga pela SL3261, são capazes de ativar mecanismos apoptóticos em células HCT-8, após 48 h de exposição à essas proteínas. Os resultados obtidos sugerem uma ativação das vias apoptóticas em células HCT-8 tanto pela TRAIL quanto pela IL-2, enquanto os grupos controle e SL3261 não apresentam o mesmo padrão acentuado de ativação. A figura 21A representa as porcentagens de marcações exibidas pelos diferentes grupos e diferentes marcadores, e a figura 21B compara essas porcentagens. Existe uma maior porcentagem de marcação tanto pela Anexina quanto pelo 7-AAD nos grupos tratados com linhagens que expressam as proteínas de interesse, o que sugere uma ação efetiva destas no contexto de ativação de inviabilidade e morte celular.

Figura 21 – Determinação da apoptose



A:gráficos representativos das marcações por Anexina V e 7-AAD nos grupos Controle, SL3261, SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2. **B:** porcentagens comparadas de células vivas, em apoptose inicial, em apoptose tardia/necrose e necrose, nos diferentes grupos. Os dados representam a média \pm EPM (n=4). **Fonte:** arquivo pessoal.

A apoptose é um evento fisiológico de morte celular que permite ao organismo multicelular a remoção eficiente de células velhas ou danificadas, em um processo que é distinto da necrose. A apoptose está envolvida em muitos processos celulares importantes, incluindo a renovação celular normal, o sistema imunológico, o desenvolvimento embrionário e a metamorfose. A apoptose também é evidente em células expostas a estímulos ou danos estressantes, impedindo assim a manutenção e a proliferação de células alteradas potencialmente perigosas. Quando as vias

apoptóticas não são ativadas nessas células alteradas, na grande maioria há o desenvolvimento do tumor (MACFARLANE, 2003).

Conforme analisado na figura 21, há morte celular resultante tanto de processo apoptótico quanto necrótico, induzida pelas proteínas. TRAIL é capaz de induzir apoptose em células tumorais, no entanto, segundo estudos de Voigt et al. (2014), há uma alternativa potencial de morte celular representada pela capacidade dos receptores TRAIL humanos e murinos de induzir necrose. Isso ocorre independentemente de suas capacidades apoptóticas, quando a indução da apoptose falha ou é ativamente inibida. Em consequência, a indução de necrose programada por TRAIL pode representar uma opção nova e adicional, mas ainda largamente inexplorada, para a eliminação de células tumorais, além das estratégias bem estabelecidas que visam a indução de apoptose (VOIGT et al., 2014). Uma inflamação provocada em células tumorais submetidas a necrose, induzida por TRAIL, poderia contribuir para um tratamento eficaz contra o câncer.

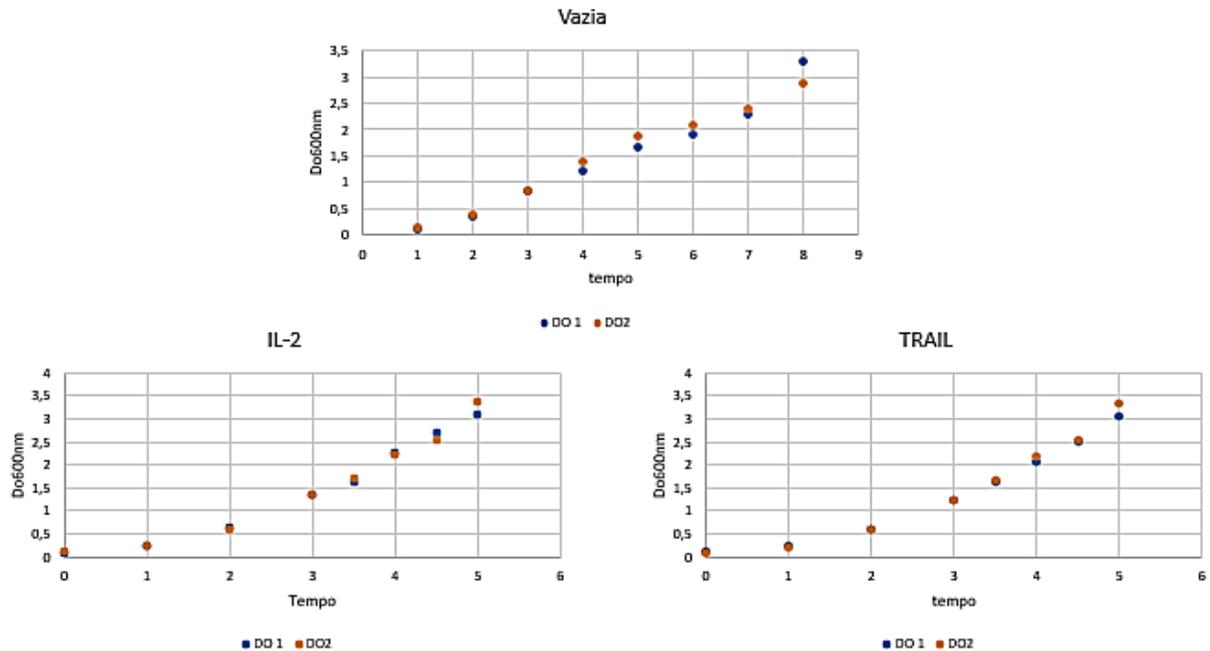
A IL-2 desempenha efeitos apoptóticos demonstrados devido à sua indução da produção de NO, que atua como um modulador pró-apoptótico, ativando proteases da família das caspases através da liberação do citocromo C mitocondrial no citosol. Esses eventos induzem aumento da expressão de p53 e alterações na expressão de proteínas associadas à apoptose incluindo a família Bcl-2 (CHOUDHARI et al., 2013). Além disso, respostas antitumorais induzidas pela *Salmonella* expressando IL-2 foram correlacionadas com a diminuição da angiogênese e aumento da necrose dentro do tecido tumoral (BARNETT et al., 2005). Isso sugere que, assim como a TRAIL, a IL-2 também pode ativar vias necróticas nas células tumorais e contribuir com o controle do crescimento do tecido tumoral e, de forma indireta, ambos poderiam contribuir com a diminuição de metástases nesse modelo.

4.4. DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE SL3261_IL-2 e SL3261_TRAIL

A figura 22 mostra a curva de calibração entre DO e tempo provenientes de cultivos celulares para estabelecer o crescimento da SL3261, SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2. Para os experimentos foram realizados cultivos de 2 horas, quando a quantidade de unidades formadoras de colônia é de cerca de 2×10^9 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 1,5.

Figura 22 - Curvas de crescimento celular de SL3261_IL-2, SL3261_TRAIL e SL3261 vazia



DO1 e DO2 representam medidas em espectrofotômetro de dois diferentes cultivos realizados nas mesmas condições. **Fonte:** arquivo pessoal.

4.5. ENSAIOS *in vivo/ex vivo*

4.5.1. Testes com as linhagens produzidas em camundongos BALB/c

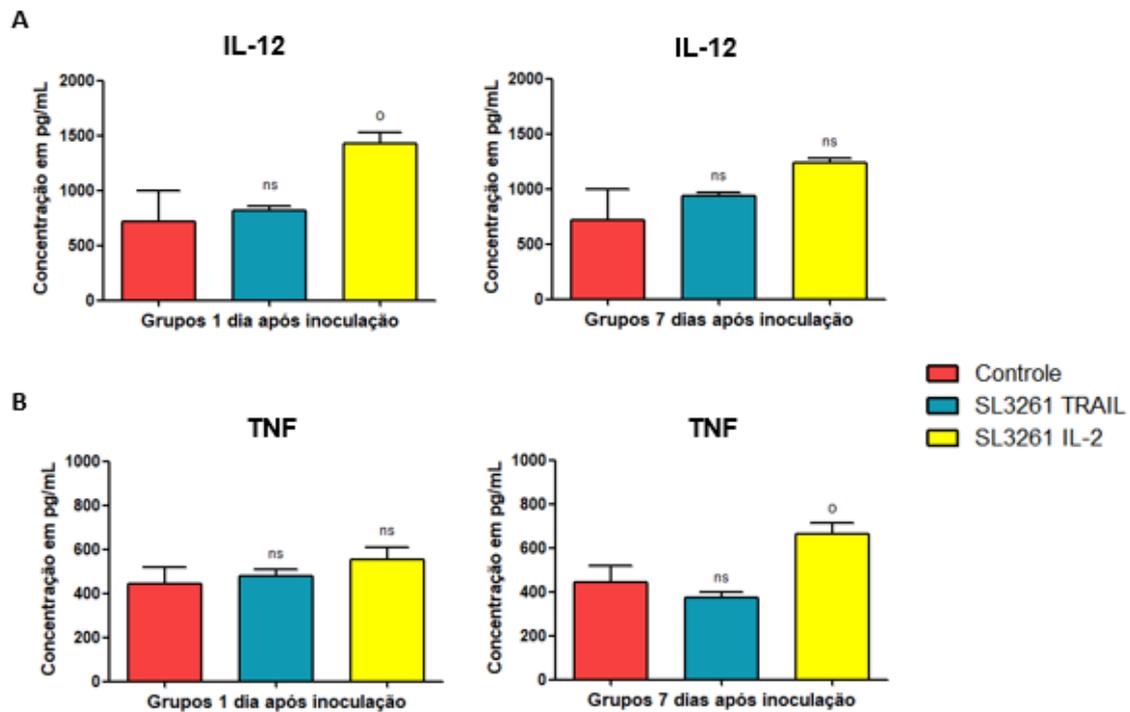
Previamente aos ensaios de implantação e tratamento do tumor, foram realizados testes de inoculação das linhagens produzidas em animais BALB/c para avaliação da segurança do uso dessas bactérias como vetor bacteriano vivo.

4.5.1.1 Avaliação da produção de TNF e IL-12 no plasma de camundongos BALB/c

A figura 23 mostra os níveis de TNF e IL-12 avaliados no plasma de camundongos que receberam uma dose de 5×10^5 UFC de SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2. Essa análise foi realizada para determinação de uma possível sepse no animal após receber a dose de bactéria, uma vez que essas são duas das principais citocinas envolvidas no processo inflamatório estimulado pelo LPS presente da membrana de bactérias Gram negativas (CAO et al., 2010). Os resultados sugerem

que não houve aumento expressivo dessas citocinas pró-inflamatórias nos animais que receberam a dose da bactéria quando comparados ao grupo Controle. Porém, no grupo da SL3261_IL-2 houve aumento de IL-12 após 1 dia da inoculação (figura 23A) e de TNF após 7 dias da inoculação (figura 23B).

Figura 23 - Dosagem de IL-12 e TNF no sangue de animais BALB/c inoculados com SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2.



A: níveis de IL-12 após 1 e 7 dias da inoculação. Os dados representam a média \pm EPM (n= 5). O símbolo $^{\circ}$ ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo SL3261_IL-2 quando comparado ao grupo Controle. ns representa que não há diferença estatística significativa quando comparado ao grupo Controle. **B: Níveis de TNF após 1 e 7 dias da inoculação.** Os dados representam a média \pm EPM (n= 5). O símbolo $^{\circ}$ ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo SL3261_IL-2 quando comparado ao grupo Controle. ns representa que não há diferença estatística significativa quando comparado ao grupo Controle. **Fonte:** arquivo pessoal.

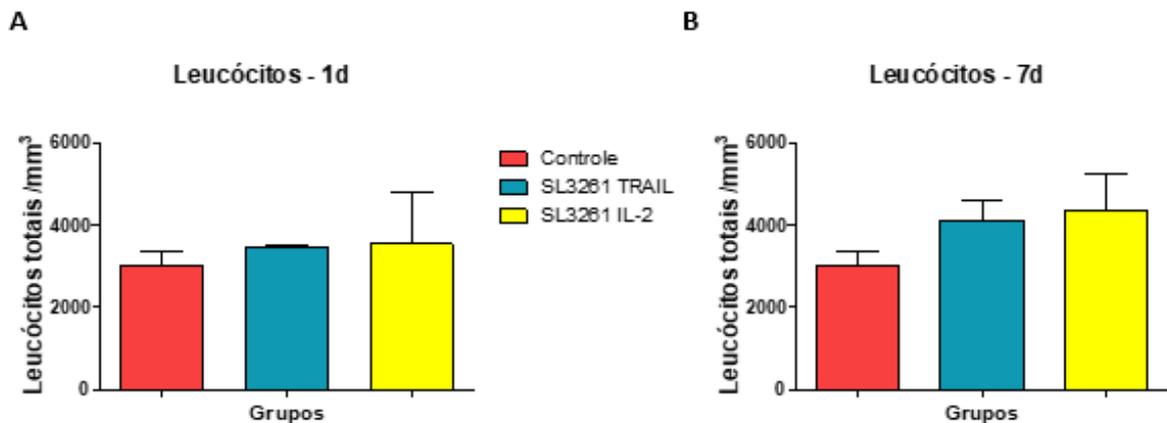
Sugere-se que o aumento de IL-12 no grupo da SL3261_IL-2, no primeiro dia após a inoculação (figura 23A), ocorre em resposta à ação imediata de macrófagos ativados pelo LPS da bactéria, uma vez que estes liberam IL-12 (WATFORD et al., 2003). A diminuição dos níveis de IL-12 sete dias após a inoculação está ligada à diminuição da ação inflamatória causada pelo LPS, descartando a possibilidade de choque séptico após a inoculação. As infecções bacterianas são a causa mais comum de sepse, sendo o TNF o principal indicador para diagnóstico. Foi avaliado que a inoculação das bactérias tem pouco efeito nos níveis sanguíneos de TNF (figura 23B),

o que torna seguro o uso das linhagens SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2. Estes fenômenos são, em grande parte, atribuíveis à falta de acumulação de *S. Typhimurium* geneticamente modificada em tecidos normais, incluindo sangue (YOON et al., 2017). No entanto, o pequeno aumento de TNF no grupo da SL3261_IL-2, observado sete dias após a inoculação, pode estar ligado à ação adjuvante e imunoestimuladora que a *Salmonella aroA* deficiente desempenha (FELGNER et al., 2016), como um efeito persistente da presença do LPS nesses animais. Esse aumento não foi suficiente para os animais apresentarem quadros de sepse e não compromete o uso dessa bactéria como vetor para expressão de proteínas reguladoras da resposta imune no tratamento do câncer colorretal. Porém, sugere que a resposta inflamatória foi ativada e isso aumenta as chances dessa imunoterapia diminuir e/ou controlar um crescimento tumoral.

4.5.1.2 Perfil celular em camundongos BALB/c inoculados com SL3261

A figura 24 mostra a análise do perfil celular realizada para detectar uma possível inflamação aguda desencadeada pela inoculação de *Salmonella*. Foram analisados os leucócitos totais no plasma dos camundongos, em 1 dia (figura 24A) e 7 dias (figura 24B) após a inoculação com SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2. Os resultados mostram que não há aumento expressivo das quantidades celulares nos grupos SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2 quando comparados ao grupo Controle, que não recebeu *Salmonella*. De modo análogo à análise feita com TNF e IL-12, esse resultado sugere segurança no uso das linhagens desenvolvidas em animais BALB/c.

Figura 24 – Perfil celular



Contagem global de células no sangue de animais BALB/c inoculados com SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2. Os dados representam a média \pm EPM (n= 5). **Fonte:** arquivo pessoal.

A atenuação *aroA*, presente em SL3261, descrita por Hoiseth e Stocker em 1981, tem sido considerada segura e universalmente utilizada para atenuar as cepas bacterianas (FELGNER et al., 2016). O mutante *aroA* auxotrófico de *Salmonella* é incapaz de produzir os compostos aromáticos da via do chiquimato, tal como o ácido p-aminobenzóico e os aminoácidos aromáticos. Alguns destes compostos aromáticos não podem ser obtidos a partir de tecido de mamíferos e, como resultado, esta cepa é avirulenta em camundongos. A deleção do gene *aroA* é uma das mutações metabólicas mais comumente usadas para atenuar *Salmonella* e outras bactérias, os quais são considerados sistemas de vetores adequados (RUBY et al., 2012).

Em seus estudos, Felgner et al. (2016) ressaltaram que, além da atenuação metabólica, há um aumento da capacidade imunoestimuladora dessas linhagens de *aroA* ausente e, portanto, a *Salmonella* pode apresentar um efeito adjuvante quando inoculada. Assim, concluíram que, por essas cepas serem eficientes em abordagens terapêuticas de tumores, podem de fato se tornar sistemas vetoriais ótimos para vacinação e imunoterapia de câncer.

4.5.2 Modelo murino em BALB/c NUDE de câncer colorretal

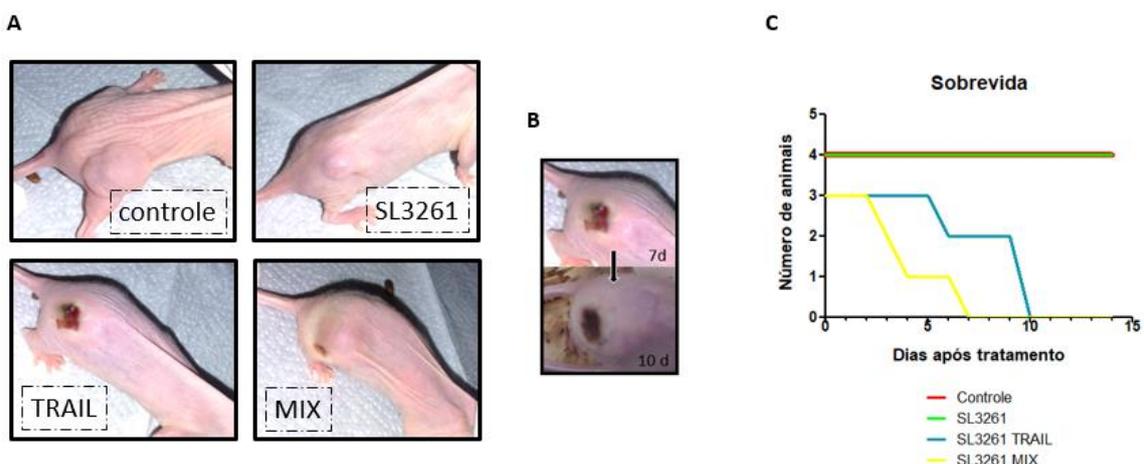
4.5.2.1 Progressão tumoral pós tratamento com as diferentes linhagens de SL3261 e dose de 5×10^7 UFC/mL.

Devido ao fato de animais NUDE não possuírem timo, um grupo tratado apenas com SL3261 expressando IL-2 (SL3261_IL-2) foi suprimido, visto que nesses animais os efeitos causados pela IL-2 possuiriam limitações em uma avaliação global e foi decidido não os elucidar de forma aprofundada nesse trabalho. Nesses animais, as

células T não se diferenciam e também não se maturam, o que deixaria uma das funções dessa citocina ociosa. Assim, os resultados a seguir demonstram o efeito do TRAIL de forma individual e combinado com a IL-2, representado pelo grupo MIX (SL3261_TRAIL e SL3261_MIX, respectivamente). O grupo MIX foi avaliado considerando uma possível resposta amplificada na ativação imune mediada pela IL-2 nesse modelo.

Os resultados de desenvolvimento tumoral 7 dias após a inoculação dos tratamentos com dose de 5×10^7 UFC/mL estão representados pela figura 25. Animais do grupo Controle, que não receberam tratamento com *Salmonella*, possuem o tumor aumentado em relação aos grupos tratados (figura 25A). Não foram observadas lesões histopatológicas nos tumores desse grupo em nenhum momento do experimento. Já no grupo inoculado com SL3261 houve aparecimento de discretas lesões em metade dos animais avaliados. No caso dos grupos inoculados com SL3261_TRAIL e SL3261_MIX, lesões foram observadas e progrediram ao longo dos dias. Em detalhe na figura 25B, pode-se analisar lesão tecidual no tumor de um animal do grupo TRAIL nos dias 7 e 10 pós inoculação intratumoral do tratamento, em que se pode observar o encolhimento do tumor associado a um processo inflamatório. O potencial desaparecimento do tumor não foi observado nesses testes pois os camundongos tratados com SL3261_TRAIL e SL3261_MIX vieram a óbito (ou foram eutanasiados devido ao estado debilitado) antes do tempo proposto pelo delineamento experimental (figura 25C).

Figura 25 - Imagens representativas de animais BALB/c NUDE de cada grupo e sobrevida



A: progressão tumoral dos diferentes grupos 7 dias após inoculação de SL3261, SL3261_TRAIL e SL3261_MIX. **B:** progressão tumoral de um animal do grupo SL3261_TRAIL com 7 e 10 dias após

inoculação do tratamento. **C:** Sobrevida dos animais dos grupos Controle, SL3261, SL3261_TRAIL e SL3261_MIX após inoculação intratumoral dos tratamentos. **Fonte:** arquivo pessoal.

Resultados parecidos foram reportados por Zhao et al. (2005), em que testes foram realizados com a linhagem *S. Typhimurium* A1-R. A inoculação bacteriana resultou em direcionamento tumoral altamente eficaz e levou a um encolhimento tumoral significativo em camundongos BALB/c NUDE implantados com câncer de mama humano. As lesões na região tumoral tenderam a desaparecer conforme ocorria um processo de eliminação do tumor e regeneração tecidual (ZHAO et al., 2005).

Sugere-se que os camundongos se encontraram debilitados devido ao alto processo inflamatório induzido pela dose de 5×10^7 UFC/mL de SL3261_TRAIL e SL3261_MIX. Em contrapartida, nenhum dos camundongos tratados com a SL3261 apresentaram alterações fisiológicas e comportamentais que sugerissem um quadro debilitante. Potencialmente, as proteínas TRAIL e IL-2 levaram a uma forte inflamação tecidual que evoluiu para resposta sistêmica, o que resultou na não efetividade do tratamento e constatação que essa dose não é adequada para uso terapêutico em camundongos BALB/c NUDE. Embora, os tumores estivessem seguindo a tendência de involução, o tratamento com essa dose é inviável devido à falta de segurança, uma vez que pode resultar em um processo inflamatório robusto a ponto de levar os animais a óbito.

Nos testes com BALB/c, a dose inoculada foi ainda maior que a utilizada nos BALB/c NUDE (5 vezes maior), porém os animais não ficaram debilitados e não houve uma inflamação importante, conforme mostrado no perfil celular e na análise de produção de citocinas (figuras 23 e 24). Sugerimos que a falta de acumulação de *S. Typhimurium* geneticamente modificada em tecidos normais (YOON et al., 2017) não é capaz de ativar uma inflamação consistente assim como ocorre quando há acumulação no tumor. Isso acontece porque essas linhagens foram projetadas para produzir localmente as proteínas de interesse no microambiente tumoral, uma vez que o promotor é ativado pela hipóxia (OXER et al., 1991) e a partir daí iniciar uma resposta inflamatória efetiva.

É possível observar que os animais do grupo MIX vieram a óbito com menos dias pós inoculação que os animais do grupo TRAIL. Isso deve ocorrer devido à ação da IL-2. Essa citocina pode induzir a morte de células tumorais, promovendo a ativação, proliferação e migração de células imunes. O tratamento que possui a ação

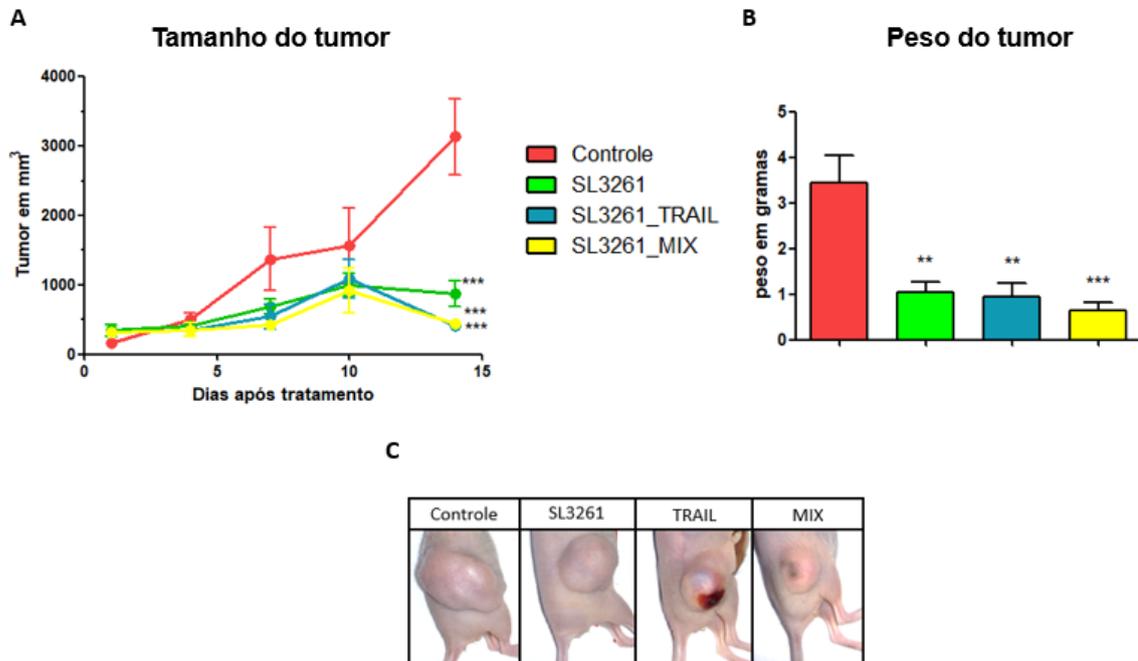
da IL-2 (MIX) pode ter exibido um processo inflamatório mais acentuado que o tratamento com a ação apenas da TRAIL. Sendo assim, os animais sentiram os efeitos da inflamação acentuada pela IL-2, que culminou em óbito, previamente aos animais do outro grupo.

Uma das ações que podem ter influenciado essa resposta é o fato da IL-2 se apresentar como uma potente indutora de óxido nítrico sintase (iNOS) e, portanto, da síntese de NO, que pode contribuir para as respostas antitumorais e inflamatórias (SAKKOULA; PIPILI-SYNETOS; MARAGOUDAKIS, 1997). Outro fator que pode ser determinante é a alta produção de células NK induzidas pela IL-2 e o consequente aumento da inflamação, uma vez que são células citotóxicas da imunidade inata. *Salmonella* atenuada expressando IL-2 pode efetivamente induzir a proliferação de células NK de forma local e sistêmica (BARNETT et al., 2005). Juntos, esses fatores podem contribuir para a morte dos animais, assim como observado nesse estudo.

4.5.2.2 Progressão tumoral pós tratamento com SL3261_TRAIL e SL3261_MIX com a dose de 1×10^7 UFC/mL

Em vista dos resultados obtidos pela inoculação da dose de 5×10^7 UFC/mL, novos experimentos foram realizados com uma dose menor de bactérias para grupos TRAIL e MIX. Os animais receberam 1×10^7 UFC/mL via intratumoral. Nessa abordagem, os animais tratados com SL3261_TRAIL e SL3261_MIX não vieram a óbito e apresentaram um aumento tardio dos tumores em relação ao grupo Controle, que não recebeu tratamento, a partir do quarto dia pós inoculação do tratamento (figura 26A), sugerindo um efeito antitumoral exercido pelas proteínas produzidas pela *Salmonella*. Além disso, ao final dos 14 dias de acompanhamento da progressão tumoral, foi possível observar uma diminuição significativa dos tumores dos grupos tratados com SL3261_TRAIL e SL3261_MIX em relação ao Controle não tratado, que ocorreu a partir do décimo dia pós inoculação. A ação dos tratamentos é demonstrada tanto pela diminuição do volume quanto do peso tumoral em relação ao grupo Controle (figura 26A e 26B). Da mesma forma que ocorreu nos testes com a dose maior, houve aparecimento de lesões no tecido tumoral nos grupos que receberam a dose menor de tratamento, sugerindo que essa dose também induz inflamação efetiva no tumor (figura 26C), porém não culminou em debilidade e letalidade.

Figura 26 – Desenvolvimento tumoral



A: progressão tumoral dos diferentes grupos acompanhada por medidas em volume. Os dados representam a média \pm EPM ($n=4$). O símbolo ***($p<0,001$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos SL3261, SL3261_TRAIL e SL3261_MIX quando comparados ao grupo Controle. **B: peso do tumor 14 dias após a inoculação intratumoral dos tratamentos.** O símbolos ***($p<0,001$) e **($p<0,01$) representam a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos SL3261, SL3261_TRAIL e SL3261_MIX quando comparados ao grupo Controle. **C:** imagens representativas do tumor de animais 14 dias após a inoculação intratumoral dos tratamentos. **Fonte:** arquivo pessoal.

É possível analisar que há uma progressão tumoral parecida entre os grupos que receberam as diferentes linhagens de *Salmonella*. No entanto, a dose inoculada de SL3261 foi cinco vezes maior que a dose de SL3261_TRAIL e SL3261_MIX. Sugere-se que grande parte da diminuição tumoral desses grupos em relação ao grupo Controle é desempenhada pela ação das proteínas funcionando como agentes terapêuticos, uma vez que uma dose muito maior foi necessária no grupo da SL3261 para exibir um padrão tumoral parecido com os grupos TRAIL e MIX (figura 26).

A regressão tumoral induzida por TRAIL foi documentada em camundongos imunodeficientes portadores de tumores humanos, tais como carcinomas de cólon e mama, mieloma, glioma e adenocarcinoma pancreático (JOHNSTONE; FREW; SMYTH, 2008).

O TRAIL recombinante é bastante estudado por atingir uma gama ampla de células tumorais que expressam seus receptores, permitindo o desencadeamento do

mecanismo apoptótico (MÉRINO et al., 2007). Ele é capaz de matar células tumorais sem causar os efeitos adversos letais, como os encontrados com o TNF (VON KARSTEDT; MONTINARO; WALCZAK, 2017). Além de induzir a apoptose através da interação com seus receptores, o TRAIL está envolvido na apoptose mediada pela p53, que é um gene supressor de tumor (WU, 2009). Portanto, o TRAIL se mostra como um agente terapêutico para a terapia do câncer muito promissor. Além disso, lesões genéticas em vários componentes da via TRAIL foram encontradas em amostras de tumores humanos, sugerindo que a inativação da via TRAIL e/ou escape da imunovigilância mediada por TRAIL pode ter um papel importante no início e progressão tumoral (JOHNSTONE; FREW; SMYTH, 2008).

Grande parte do retardo na progressão tumoral ou até a diminuição do tumor nos três grupos tratados, quando comparados ao Controle, pode ser atribuída à SL3261. Em seus estudos Zheng et al. (2017) realizaram imunoterapia contra o câncer com *Salmonella* Typhimurium modificada que secreta flagelina heteróloga. Seus resultados mostraram uma regressão tumoral e de lesão em camundongos que receberam a linhagem bacteriana expressando a proteína de interesse (FlaB). Porém, similar ao resultado de tratamento com PBS, a injeção intratumoral de FlaB purificada não suprimiu o crescimento do tumor em camundongos. A linhagem sem expressar a proteína de interesse demonstrou regressão tumoral discreta em relação ao controle. Isso sugere que a FlaB dentro do tumor possui atividade antitumoral apenas na presença da bactéria, sendo a colonização por *S. Typhimurium* a responsável pela supressão aumentada do tumor. Esse estudo constata a importância da presença da *Salmonella* para uma resposta antitumoral eficaz, em que a presença de mecanismos de inibição associadas à bactéria são essenciais (ZHENG et al., 2017).

Em consistente revisão, Hernández-Luna e Luria-Pérez (2018) destacaram os mecanismos pelos quais a *Salmonella enterica* exerce uma ação antitumoral. Esses mecanismos são ativados pela incorporação bacteriana no microambiente tumoral e são representados por: competição por nutrientes de células tumorais; liberação de componentes bacterianos antitumorais devido à lise das bactérias aderidas à célula tumoral; diminuição da angiogênese; ativação de autofagia; e aumento de expressão de proteínas associada à morte celular. A *Salmonella* é capaz de aumentar a expressão de mediadores como a óxido nítrico sintase induzível e o IFN- γ , bem como inibir a expressão de fatores imunossupressores. Além disso, também pode diminuir a atividade de células supressoras derivadas de células mieloides dentro do

microambiente tumoral, promovendo o recrutamento de células NK, neutrófilos, macrófagos, linfócitos T e B, que tem sido descrito como um dos principais mecanismos de eliminação de células tumorais. E também aumenta os níveis de citocinas pró-inflamatórias enquanto diminui os níveis de citocinas anti-inflamatórias no microambiente tumoral (HERNÁNDEZ-LUNA; LURIA-PÉREZ, 2018).

Embora, a linhagem no modelo proposto antitumoral seja imunodeficiente (NUDE, deficiente de células T maduras), muitos trabalhos têm mostrado a importância do uso desses animais para a elucidação de mecanismos que combatem as células tumorais. Em estudos realizados por Wen et al. (2016), foram avaliados efeitos de IL-2 *in vivo* em duas linhagens de camundongos. Nos camundongos imunocompetentes os efeitos mostraram as atividades de todas as células citotóxicas, principalmente os linfócitos T. Em contraste, em camundongos NUDE, as principais células citotóxicas foram células NK, que expressam o receptor de IL-2 e exercem grande importância no controle de crescimento de tumores. Assim, os resultados de camundongos NUDE realmente mostram a relevância dos efeitos antitumorais das células NK (WEN et al., 2016).

Em uma abordagem semelhante ao uso de *Salmonella* como vetor bacteriano vivo, Zhang et al. (2018) utilizaram um vírus oncolítico (TANV) expressando a IL-2 murina em um modelo experimental com animais NUDE portadores de melanoma humano. O estudo foi focado na ação da IL-2 na potencialização da imunidade inata e foi demonstrado que o vírus que expressa IL-2 foi terapeuticamente eficaz na regressão do melanoma, mesmo sem o envolvimento das respostas imunes adaptativas. Estes dados fornecem evidências de que a IL-2 induz uma resposta imune antitumoral, regredindo o tumor na ausência de células T maduras. Foi proposto que esse tipo de abordagem poderia representar uma opção de tratamento para pacientes com melanoma que possuam supressão/deficiência de células T, como aqueles com positividade para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ZHANG et al., 2018).

De acordo com estudos de Hong et al. (2016), a IL-2 pode aumentar a atividade antitumoral das células NK e, assim, inibir as metástases do carcinoma hepatocelular em camundongos. Foi demonstrado que as células NK inibiram a proliferação, migração e invasão das células tumorais *in vitro*, e que as células NK sobreviveram nos fígados dos camundongos NUDE. Além disso, as células NK inibiram a metástase pulmonar do carcinoma hepatocelular *in vivo* (HONG et al., 2016).

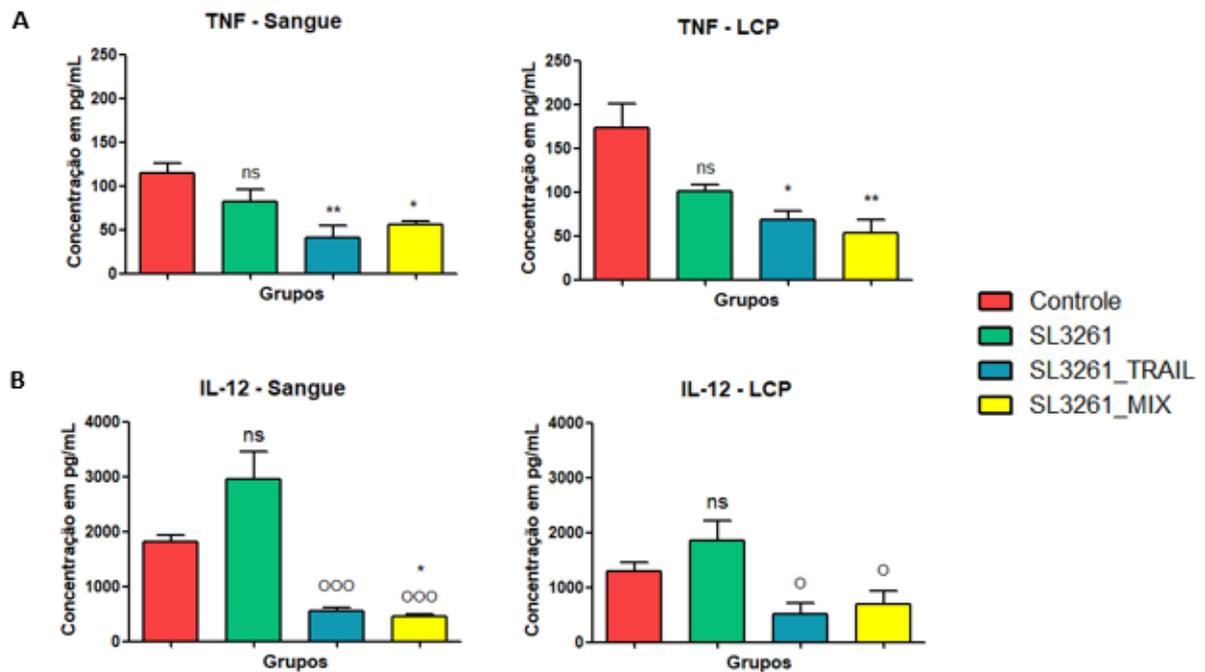
No modelo experimental proposto por Di Carlo et al. (2000), a ação antitumoral mais robusta, no modelo de câncer de pulmão em camundongos NUDE, parece estar relacionada a um efeito rápido e destrutivo contra os vasos sanguíneos peritumorais e intratumorais. Esse comportamento pode ser devido a integridade e desenvolvimento que estavam fortemente comprometidos em tumores em que a IL-2 esteve presente. Este efeito pode estar relacionado a uma ação indireta da IL-2, mediada pela indução de citocinas secundárias, a mecanismos citotóxicos de dano, e/ou à ação direta da IL-2 no endotélio capilar do tumor (DI CARLO et al., 2000).

Em vista disso, é possível sugerir que a diminuição tumoral do grupo MIX em relação ao grupo Controle pode ter sido exercida pela ação antiangiogênica e citotóxica da IL-2 em adição à citotoxicidade exercida pelo TRAIL diretamente nas células tumorais. Sugere-se que a administração de terapias baseadas na combinação das proteínas TRAIL e IL-2 potencialmente constitui uma eficaz ferramenta antitumoral.

4.5.2.3 Avaliação da produção de TNF, IL-12 e IFN- γ no plasma e LCP

Os níveis de TNF e de IL-12 se encontram aumentados nos grupos Controle e SL3261 quando comparados aos grupos tratados com as proteínas terapêuticas, tanto no sangue quanto no LCP (figura 27). Sugere-se que esse aumento esteja relacionado à tentativa de eliminação do tumor exercida pelas células da imunidade inata desses grupos, principalmente dos macrófagos. Os macrófagos ativados liberam TNF e IL-12 (WATFORD et al., 2003), o que explica os níveis encontrados nos grupos Controle e SL3261. Em contrapartida, níveis mais baixos são encontrados nos grupos TRAIL e MIX pois os mecanismos de eliminação do tumor que estão sendo exercidos nesses grupos devem estar associados à resposta induzida por TRAIL e IL-2 aumentadas, o que não acontece nos grupos Controle e SL3261.

Figura 27 – Análise da produção de TNF e IL-12 no sangue e no LCP



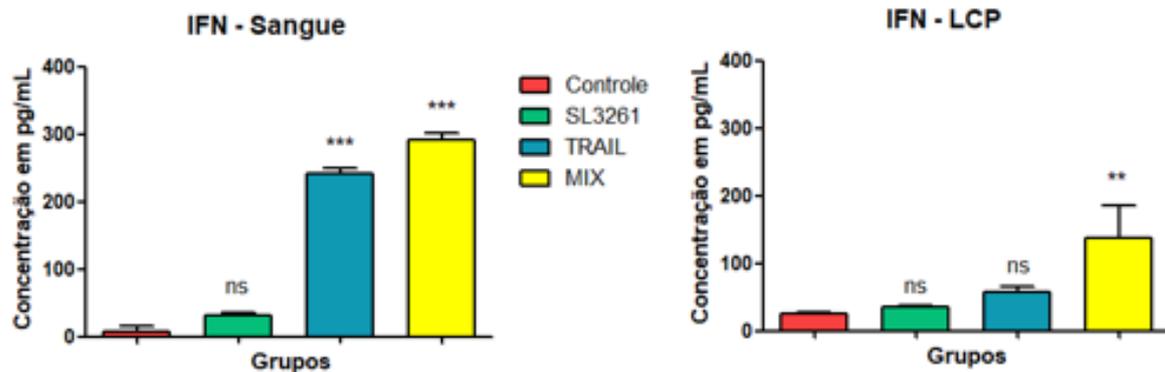
A: TNF no sangue e no LCP. Os dados representam a média \pm EPM de um *pool* de amostras do plasma em quadruplicata e $n=4$ para o LCP. Os símbolos ** ($p<0,01$) e * ($p<0,05$) representam a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos SL3261, SL3261_TRAIL e SL3261_MIX quando comparados ao grupo Controle. *ns* representa que não há diferença estatística significativa do grupo SL3261 quando comparado ao grupo Controle. **B: IL-12 no sangue e no LCP.** O símbolo * ($p<0,05$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo SL3261_MIX quando comparado ao grupo Controle. *ns* representa que não há diferença estatística significativa do grupo SL3261 quando comparado ao grupo Controle. Os símbolos °°° ($p<0,001$) e ° ($p<0,05$) representam a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos SL3261_TRAIL e SL3261_MIX quando comparados ao grupo SL3261. **Fonte:** arquivo pessoal.

Nos testes realizados com camundongos BALB/c para avaliação da segurança do uso das linhagens bacterianas desenvolvidas, não houve diferença significativa dos níveis de TNF no sangue dos diferentes grupos. Nesse caso, não havia presença de tumor e, portanto, não havia uma resposta antitumoral consistente como nos grupos Controle e SL3261 do ensaio com BALB/c NUDE, que possuíam tumores em desenvolvimento e, portanto, tentativa de eliminação de células tumorais pelo sistema imune. A principal atividade biológica do TNF é um acentuado combate a diferentes linhagens neoplásicas, tendo ação antitumoral importante (SEDDER; MCDERMOTT, 2014).

O grupo MIX possui concentrações aumentadas de IFN- γ tanto no sangue quanto no lavado da cavidade peritoneal, enquanto grupo TRAIL possui, significativamente, no sangue (figura 28). Sugere-se que os níveis elevados de IFN- γ do grupo MIX acontecem pois a IL-2 é responsável por induzir proliferação e ativação

de células NK. Uma vez ativadas, as células NK induzem ativação, proliferação e recrutamento de outras células inflamatórias e citotóxicas para o local do tumor. Isto é resultante da liberação de citocinas como o IFN- γ (GAFFEN; LIU, 2004), o que poderia explicar os achados nesse estudo.

Figura 28 – Análise da produção de IFN- γ no sangue e no LCP



Os dados representam a média \pm EPM de um *pool* de amostras do plasma em quadruplicata e $n=4$ para o LCP. Os símbolos ** ($p<0,01$) e *** ($p<0,001$) representam a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos SL3261_TRAIL e SL3261_MIX quando comparados ao grupo Controle. ns representa que não há diferença estatística significativa dos grupos SL3261 e SL3261_TRAIL quando comparados ao grupo Controle. **Fonte:** arquivo pessoal.

A aumentada concentração de IFN- γ no sangue, devido ao processo inflamatório, no grupo da TRAIL influencia na resposta antitumoral por ele apresentado. Foi demonstrado que o IFN- γ é capaz de induzir diretamente TRAIL em células Jurkat de leucemia humana e em células de câncer de cólon HT29. Acredita-se que a indução do TRAIL seja através da ligação do IFN- γ a um elemento de resposta estimulada por IFN- γ , levando à indução de TRAIL e consequente apoptose (WU, 2009).

Nos grupos em que não há uma inflamação robusta mediada pela produção local dos agentes terapêuticos (Controle e SL3261), a concentração de IFN- γ não se mostra aumentada, resultando em menor efeito antitumoral exercido por essa citocina nesses grupos, quando comparados aos grupos que receberam tratamento com TRAIL e IL-2. O IFN- γ exerce funções importantes, como inibição direta do crescimento do tumor, ativação de macrófagos e aumento da imunidade celular. Isto representa o seu papel principal na modulação da resposta celular contra tumores (TORRES, 2018).

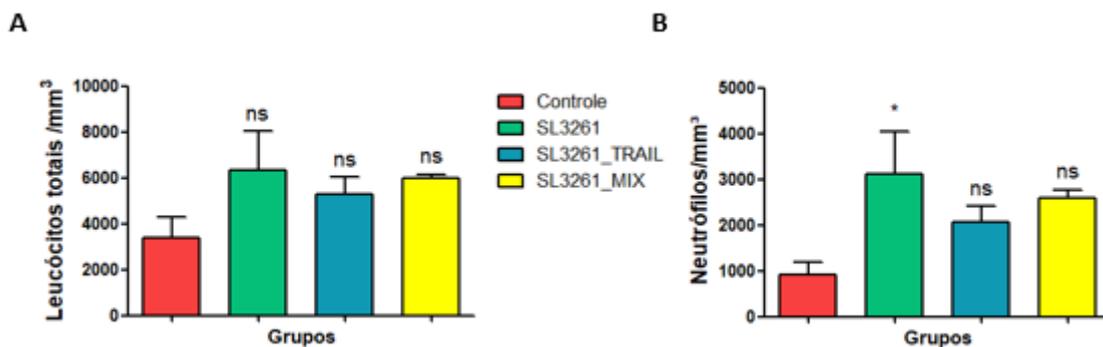
Pode-se sugerir que há diferentes padrões de respostas de citocinas nos diferentes grupos, que resultam da ativação ou não de diversos mecanismos de

combate às células tumorais segundo a indução mediada pelo tratamento proposto nesse modelo experimental.

4.5.2.4 Perfil celular global e diferencial no sangue

Pela análise do perfil celular dos animais tratados ou não com as diferentes linhagens de SL3261, pode-se observar que há um aumento dos leucócitos totais nos grupos que receberam tratamento em relação ao grupo controle, embora não haja diferença estatística (figura 29A). Esse aumento de leucócitos deve estar relacionado à inflamação e combate ao tecido tumoral exercido pela *Salmonella*, bem como pelas proteínas terapêuticas utilizadas nesse modelo.

Figura 29 – Perfil celular



A: leucócitos totais. B: neutrófilos. Os dados representam a média \pm EPM de um *pool* de amostras do plasma em quadruplicata. O símbolo * ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo SL3261 quando comparado ao grupo Controle. *ns* representa que não há diferença estatística significativa dos diferentes grupos quando comparados ao grupo Controle. **Fonte:** arquivo pessoal.

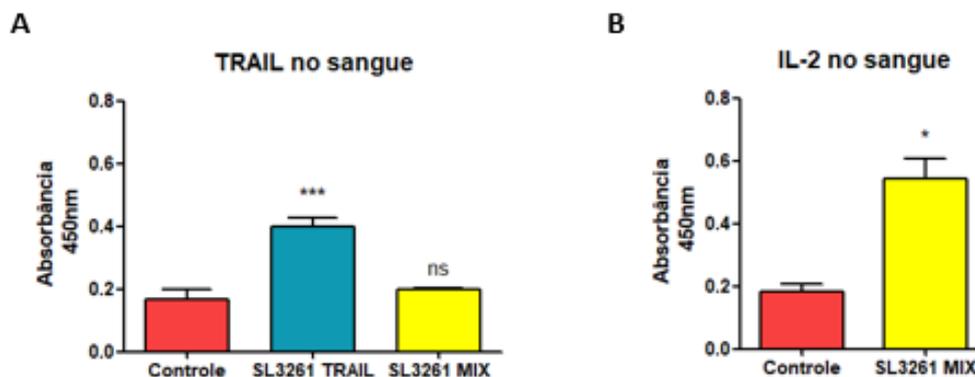
Em relação à contagem diferencial, pode-se analisar que há um aumento significativo de neutrófilos no grupo SL3261 quando comparado aos demais grupos, embora os grupos TRAIL e MIX também apresentem níveis aumentados (figura 29B). Os resultados encontrados na contagem global e de neutrófilos podem estar associados ao fato da *Salmonella* possuir importante participação no recrutamento de neutrófilos e macrófagos, resultando em mecanismos de eliminação de células tumorais (HERNÁNDEZ-LUNA; LURIA-PÉREZ, 2018). Após a penetração do tumor, a infecção bacteriana leva a uma 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).

Os maiores níveis celulares são encontrados no grupo da SL3261. Isso pode ser atribuído à maior dose que esse grupo recebeu em relação aos grupos da TRAIL e MIX, levando a um maior recrutamento de neutrófilos e outros leucócitos em resposta a presença de um maior número de bactérias. Juntos, esses dados sugerem que há indução da resposta imune inata que poderia contribuir com a resposta inicial contra o tumor nesse modelo.

4.5.2.5 Análise da presença de TRAIL e IL-2 circulantes

A análise da quantidade de TRAIL no sangue dos grupos SL3261_TRAIL e SL3261_MIX mostram que há um aumento significativo de TRAIL em relação ao grupo Controle, mas não no grupo MIX (figura 30A). Sugere-se que níveis maiores de TRAIL são encontrados nesse grupo devido à quantidade maior da linhagem que expressa TRAIL recebida por esse grupo em relação ao grupo MIX. Embora as bactérias produzam o TRAIL localmente no microambiente tumoral, é possível observar que parte dessas proteínas atingem a circulação, porém em níveis insuficientes para exercer efetiva ação citotóxica em células normais.

Figura 30 – Análise de TRAIL e IL-2 no sangue



A: presença de TRAIL no sangue. Os dados representam a média \pm EPM de um *pool* de amostras do plasma em quadruplicata. O símbolo *** ($p < 0,001$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo SL3261_TRAIL quando comparado ao grupo Controle. ^{ns} representa que não há diferença estatística significativa do grupo SL3261_MIX quando comparados ao grupo Controle. **B: presença de IL-2 no sangue.** O símbolo * ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo SL3261_MIX quando comparado ao grupo Controle. **Fonte:** arquivo pessoal.

Além disso, o TRAIL solúvel está presente no plasma de um adulto saudável em aproximadamente 100 pg/mL, concentração na qual o TRAIL falha em induzir a apoptose na maioria das linhagens celulares *in vitro* (VON KARSTEDT; MONTINARO;

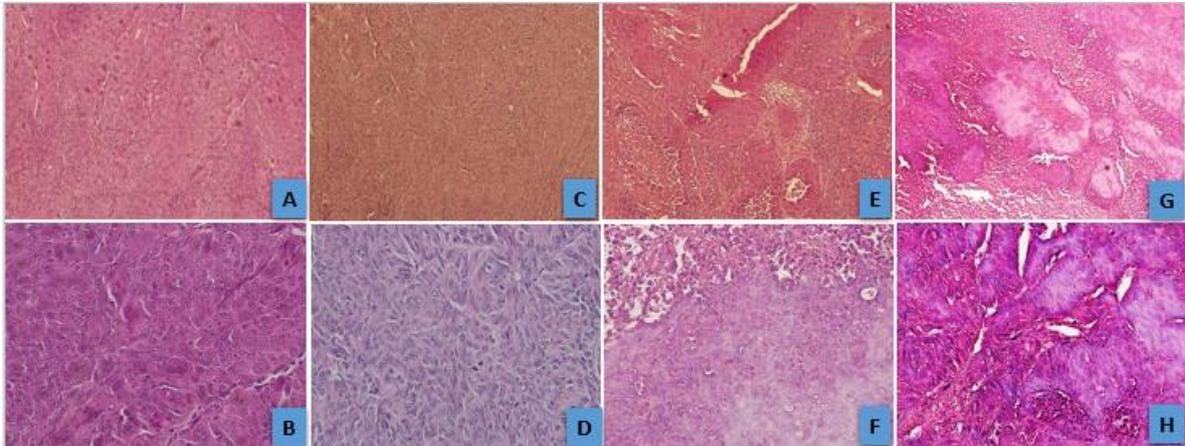
WALCZAK, 2017). Sendo assim, uma quantidade baixa de TRAIL circulante não leva a citotoxicidade e, portanto, mesmo que haja detecção sanguínea, não há efeitos indesejados.

Em relação à presença de IL-2 no sangue, é possível observar que o grupo MIX possui níveis significativamente aumentados dessa citocina em relação ao grupo Controle (figura 30B). Isso se dá pela inoculação da SL3261 expressando IL-2, bem como pela ativação do sistema imune, principalmente de células NK. *Salmonella* atenuada expressando IL-2 pode efetivamente induzir a proliferação de células NK de forma local e sistêmica (BARNETT et al., 2005), o que resulta em aumento de IL-2 induzido pela presença de alta quantidade de células NK.

4.5.2.6 Análise histológica do tumor

As fotomicrografias do tumor retirado dos camundongos dos grupos Controle, SL3261, TRAIL e MIX estão mostradas na figura 31 e os cortes estão corados com hematoxilina e eosina (HE). Em todos os cortes histológicos é possível observar células epiteliais neoplásicas, características do adenocarcinoma (HCT-8). Estas apresentam tamanho maior que as células epiteliais normais e distribuição irregular, com núcleos duplos, aumentados, de diferentes tamanhos, ovalados, com coloração mais clara e presença de mais de um nucléolo arredondado. Há mitoses atípicas, o que configura neoplasia, no caso, bem diferenciada e agressiva.

Figura 31 - Fotomicrografias de cortes de tumor



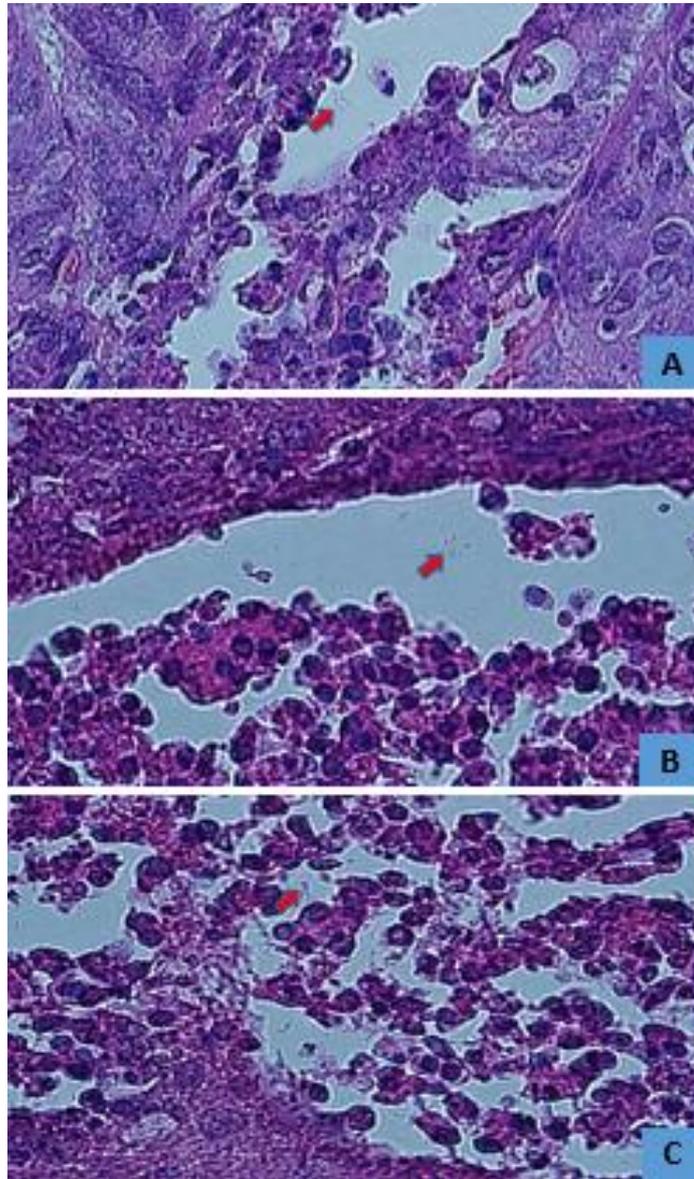
Imagens representativas da análise morfológica de cortes histológicos de tumor dos animais de cada grupo experimental 14 dias pós inoculação: Controle (31 A e B), SL3261 (31 C e D), TRAIL (31 E e F), MIX (31 G e H). Coloração: HE. Aumento 1000X (200 µm) figuras A, C, E e G e 4000X (50 µm) figuras B, D, F e H. **Fonte:** arquivo pessoal.

Os grupos Controle (figuras 31A e 31B) e SL3261 (figuras 31C e 31D) apresentam morfologia parecida, com poucos focos de necrose, caracterizada por região irregular com células que apresentam núcleo grosseiro e granuloso com coloração rosada. Os grupos TRAIL (figuras 31E e 31F) e MIX (figuras 31G e 31H) apresentam células degeneradas e sem núcleo, com regiões de necrose bem acentuadas, maiores e bem distribuídas.

Esse resultado sugere que os tratamentos com SL3261_TRAIL e SL3261_MIX resultaram em número aumentado de necrose tecidual em relação à SL3261 e ao grupo Controle. Esse padrão de focos necróticos maiores e mais numerosos pode estar associado à ação que as proteínas TRAIL e IL-2 exercem dentro do tumor e que, como consequência, impedem a progressão dos tumores. Outros autores também evidenciam o desenvolvimento aumentado de necrose nos tecidos tumorais infiltrados por *S. Typhimurium* em seus tratamentos propostos (AL-RAMADI et al., 2009; FELGNER et al., 2018; KOCIJANCIC et al., 2017).

A figura 32 mostra cortes histológicos do tumor dos animais dos grupos SL3261, TRAIL e MIX ressaltando a presença de *Salmonella* no microambiente tumoral. Uma vez que essas bactérias possuem tropismo pelo ambiente tumoral, foi possível avaliá-las de forma distribuída dentro do tumor.

Figura 32 - Fotomicrografias de cortes de tumor com *Salmonella*



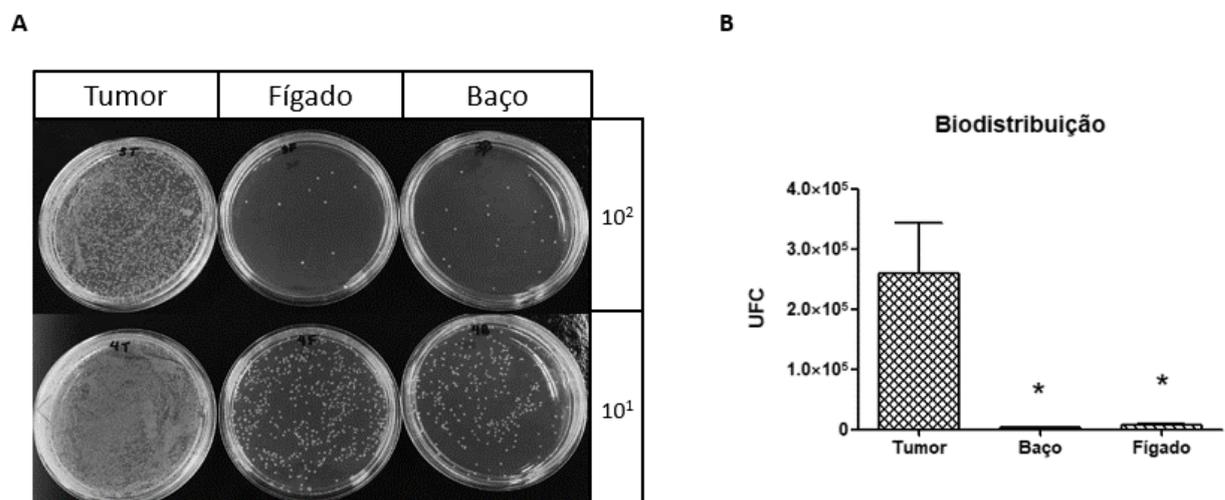
Imagens representativas da análise morfológica de cortes histológicos de tumor dos animais de cada grupo experimental: SL3261 (32A), TRAIL (32B), MIX (32C). Coloração: HE. Aumento 1000X. A seta indica a presença de *Salmonella*. **Fonte:** arquivo pessoal.

A presença de *Salmonella* no microambiente tumoral garante a produção local das proteínas TRAIL e IL-2 que podem exercer efeitos antitumorais e assim causar diminuição do tumor, expondo o resto do organismo a menores quantidades tanto de bactérias quanto das proteínas recombinantes, de forma a evitar efeitos indesejados em tecidos normais.

4.5.3 Biodistribuição de *S. Typhimurium* - SL3261

A acumulação da *S. Typhimurium* no microambiente tumoral foi analisada por meio da contagem de unidades formadoras de colônias no tumor, baço e fígado dos animais. A contagem foi realizada em placas de LB ágar (figura 33A), 14 dias após a inoculação da bactéria, que é um período bem além do tempo esperado de bacteremia, e representam um estado de colonização (BARNETT et al., 2005). A presença preferencial prolongada dessas bactérias permite a expressão sustentada dos agentes terapêuticos de interesse, exercendo assim seus efeitos tumoricidas ou inibitórios tumorais (CHEN et al., 2012).

Figura 33 – Biodistribuição no tumor, baço e fígado



A: foto representativa de placas de LB ágar com as UFC de SL3261 retiradas dos diferentes órgãos. **B:** Contagem de unidades formadoras de colônias em tumor, baço e fígado de animais inoculados com 1×10^7 UFC/mL de SL3261. Os dados representam a média \pm EPM (n= 4). O símbolo * ($p < 0,05$) representa a diferença significativa entre o número de UFC encontrado no baço e no fígado quando comparados à quantidade encontrada no tumor. **Fonte:** arquivo pessoal.

Estudos demonstraram que a *Salmonella* pode acumular-se preferencialmente em tumores numa proporção superior a 1000:1 em comparação com tecidos saudáveis, como o fígado e o baço (LIANG et al., 2019). A figura 33B evidencia a preferência da linhagem SL3261, utilizada nesse trabalho, por colonizar o tecido tumoral em detrimento do baço e do fígado.

Embora *S. Typhimurium* se replique preferencialmente em tumores, pequeno número delas pode se replicar em tecidos normais, apresentando potencial toxicidade para esses tecidos. Os produtos gênicos secretados por *S. Typhimurium* modificadas também podem causar efeitos indesejáveis em tecidos normais como resultado de crescimento extra tumoral das bactérias (CHEN et al., 2012). Em vista disso, o uso da

SL3261 atenuada e com o promotor nirB, que permite a expressão específica de genes de interesse de forma localizada no ambiente de hipóxia do tumor, tende a ser seguro e evitar toxicidades indesejáveis aos tecidos normais.

Em seus estudos, Kocijancic et al. (2017) realizaram a comparação entre efeitos de inoculação da bactéria via intratumoral e intravenosa. Foram levados em consideração aspectos de segurança, incluindo a capacidade de limitar a disseminação bacteriana e eficácia na propagação de efeitos terapêuticos em tumores primários e secundários. Foi concluído que a via de inoculação intratumoral pode ser efetivamente utilizada para aumentar a segurança de terapia tumoral mediada por bactérias, minimizando a disseminação e reduzindo o tamanho do inóculo sem comprometer a eficácia terapêutica (KOCIJANCIC et al., 2017). Nesse sentido, a via intratumoral foi utilizada nesse trabalho e houve a biodistribuição esperada com o uso de SL3261.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO

O uso da linhagem de *S. Typhimurium* SL3261 como vetor bacteriano vivo expressando os agentes terapêuticos TRAIL e IL-2 parece exibir um potencial antitumoral em modelo de câncer colorretal implantado em camundongos. As proteínas produzidas de forma recombinante pelas linhagens desenvolvidas apresentaram potencial citotóxico em células HCT-8 *in vitro*.

- As linhagem SL3261 transformadas com os plasmídeos pAE_TRAIL e pAE_IL-2 se mostraram sistemas de expressão heteróloga efetivos das proteínas TRAIL e IL-2, sob regulação do promotor nirB.
- TRAIL e IL-2 produzidas de forma recombinante pelas linhagens SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2 possuem efeito citotóxico em células HCT-8 tumorais.
- TRAIL e IL-2 produzidas de forma recombinante pelas linhagens SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2 induzem a apoptose em células HCT-8, evidenciado pela marcação com Anexina V. Além disso, induzem a produção aumentada de NO que resulta em morte celular, principalmente os grupos expostos à IL-2 (IL-2 e MIX).
- Os tratamentos *in vivo* propostos com SL3261, SL3261_TRAIL e SL3261_MIX levaram a uma progressão tumoral diminuída nos animais desses grupos em comparação com o grupo controle sem tratamento. Isso sugere um efeito antitumoral induzido pela SL3261 e pelas linhagens transformadas com os plasmídeos desenvolvidos carregando os genes que codificam a TRAIL e a IL-2.
- O resultado do grupo MIX sugere que, embora os animais BALB/c NUDE sejam imunocomprometidos pela ausência de células T maduras e, portanto, sem imunidade adaptativa, a IL-2 pode ter exercido efeitos antitumorais quando utilizada de forma combinada com a TRAIL.

- As inoculações intratumorais de SL3261, SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2 modularam efetivamente o perfil celular e de citocinas de forma a combater o tumor.
- SL3261 mostrou efetiva afinidade pelo microambiente tumoral em detrimento de órgãos como baço e fígado.

Sugere-se, para pesquisas posteriores, novas abordagens utilizando as linhagens desenvolvidas nesse trabalho. É preciso que mais testes sejam realizados para ser efetivamente possível a proposta de um novo tratamento contra tumores mediada pelo uso de SL3261_TRAIL e SL3261_IL-2.

É necessário explorar outras linhagens tumorais, tanto humanas quanto murinas, e testar outras doses/esquemas de doses, maiores e menores, a fim de analisar possíveis diferenças na progressão tumoral. Sobretudo, outros modelos experimentais devem ser considerados, principalmente com o uso de camundongos imunocompetentes para elucidação de respostas de TRAIL e IL-2 quando há a resposta de células T.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-RAMADI, B. K. et al. Induction of innate immunity by IL-2-expressing *Salmonella* confers protection against lethal infection. **Molecular Immunology**, v. 39, n. 13, p. 763–770, 2003.

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.

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.

ARNOLD, M. et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, v. 66, n. 4, p. 683–691, 2016.

ASCHELE, C.; BERGAMO, F.; LONARDI, S. Chemotherapy for operable and advanced colorectal cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 35, n. 6, p. 509–516, 2009.

BANDALETTOVA, T. et al. Immunohistochemical localization of an inducible form of nitric oxide synthase in various organs of rats treated with *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide. **Apmis**, v. 101, n. 1–6, p. 330–336, 1993.

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.

BENTLEY, R. The Shikimate Pathway - A Metabolic Tree with Many Branches. **Methods**, v. 25, p. 307–383, 1990.

BISHEHSARI, F. et al. Epidemiological transition of colorectal cancer in developing countries: Environmental factors, molecular pathways, and opportunities for prevention. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 20, p. 6055–6072, 2014.

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 (activated macrophage) Zymosan (from *Saccharomyces cerevisiae*) from Nutritional Biochemical Corporation; endotoxin (lipopolysaccharide W). **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 72, n. 9, p. 3666–3670, 1975.

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.

CHOROBİK, 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.

CHOUDHARI, S. K. et al. Nitric oxide and cancer: A review. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 11, p. 118, 2013.

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

CONMY, S.; NASHEUER, H. The Use of Transgenic Mice in Cancer and Genome Stability Research. **Biochemistry**, v. 50, p. 325–336, 2010.

CRONIN, M. et al. Bacterial vectors for imaging and cancer gene therapy: A review. **Cancer Gene Therapy**, v. 19, n. 11, p. 731–740, 2012.

DA SILVA, A. J. et al. Live bacterial vaccine vectors: An overview. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1117–1129, 2014.

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

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

DI CARLO, E. et al. Dissimilar anti-tumour reactions induced by tumour cells engineered with the interleukin-2 or interleukin-15 gene in nude mice. **Journal of Pathology**, v. 191, n. 2, p. 193–201, 2000.

DUNSTAN, S. J.; SIMMONS, C. P.; STRUGNELL, R. A. Use of in vivo-regulated promoters to deliver antigens from attenuated *Salmonella enterica* var. typhimurium. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5133–5141, 1999.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. DAS G. Revisão sobre óxido nítrico Nitric oxide revision. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343–350, 2003.

FALSCHLEHNER, C. et al. TRAIL signalling: Decisions between life and death. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, n. 7–8, p. 1462–1475, 2007.

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.

FELGNER, S. et al. Engineered *Salmonella enterica* serovar Typhimurium overcomes limitations of anti-bacterial immunity in bacteria-mediated tumor therapy. **Oncolmunology**, v. 7, n. 2, p. 1–12, 2018.

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.

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

FÖRSTERMANN, U. et al. Nitric oxide synthase isozymes. **Hypertension**, v. 23, p. 1121–1131, 1994.

FÖRSTERMANN, U.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 352, n. 4, p. 351–364, 1995.

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.

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.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 57, n. 1, p. E41–E46, 2011.

HANN, B.; BALMAIN, A. Building ‘ validated ’ mouse models of human cancer. **Current Opinion in Cell Biology**, n. 13, p. 778–784, 2001.

HECTOR, S.; PREHN, J. H. M. Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: A review. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1795, n. 2, p. 117–129, 2009.

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.

HINOI, T. et al. Mouse model of colonic adenoma-carcinoma progression based on somatic Apc inactivation. **Cancer Research**, v. 67, n. 20, p. 9721–9730, 2007.

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

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.

HUANG, Y.; HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, S. M. Construction and characterization of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium clone expressing a salivary adhesin of *Streptococcus mutans* under control of the anaerobically inducible nirB promoter. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1549–1556, 2000.

INCA, **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2017.

ITOH, N. et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. **Cell**, v. 66, n. 2, p. 233–243, 1991.

JACKAMAN, C. et al. IL-2 Intratumoral Immunotherapy Enhances CD8+ T Cells That Mediate Destruction of Tumor Cells and Tumor-Associated Vasculature: A Novel Mechanism for IL-2. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 10, p. 5051–5063, 2003.

JIANG, H. et al. Enhanced immune response to a dual-promoter anti-carries DNA vaccine orally delivered by attenuated *Salmonella typhimurium*. **Immunobiology**, v. 222, n. 5, p. 730–737, 2017.

JIANXIN, 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.

JOHNSON, R. L.; FLEET, J. C. Animal Models of Colorectal Cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 32, n. 0, p. 39–61, 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.

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

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, 2006.

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, K. et al. L-Asparaginase delivered by *Salmonella typhimurium* suppresses solid tumors. **Molecular Therapy - Oncolytics**, v. 2, n. March, p. 15007, 2015.

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.

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.

LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 228, n. October 17th, p. 227–231, 1970.

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.

LALSIAMTHARA, J.; KIM, J. H.; LEE, J. H. Engineering of a rough auxotrophic mutant *Salmonella Typhimurium* for effective delivery. **Oncotarget**, v. 9, n. 39, p. 25441–25457, 2018.

LEBLANC, H. N.; ASHKENAZI, A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, n. 1, p. 66–75, 2003.

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

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.

LIN, W. C. et al. Constitutive production of IL-2 by human carcinoma cells,

expression of IL-2 receptor, and tumor cell growth. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 155, n. 10, p. 4805–4816, 1995.

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

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.

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

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.

MOHITE, P. A.; SURVE, D. H.; KARPE, M. BACTERIAL THERAPY : A NOVEL APPROACH FOR CANCER. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 4, n. 03, p. 1386–1397, 2015.

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

MORTARA, L. et al. Anti-cancer Therapies Employing IL-2 Cytokine Tumor Targeting: Contribution of Innate, Adaptive and Immunosuppressive Cells in the Anti-tumor Efficacy. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. December, p. 2905, 2018.

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). **The Journal of Immunology**, v. 138, n. 6, p. 1813–1816, 1987.

OGASAWARA, J. et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. **Nature**, v. 364, n. 6440, p. 806–809, 1993.

ONUICHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral Cancer. **Rev Med (São Paulo)**, 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.

PADMA, V. V. An overview of targeted cancer therapy. **BioMedicine**, v. 5, n. 4, p. 1–6, 2015.

PANTALEÃO, C.; LUCHS, A. Câncer e modelos experimentais de tumores murinos Cancer and experimental models of mouse tumor. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 439–445, 2010.

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

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. *Salmonella*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1–79, 2005.

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., ABREU P.A., NASCIMENTO A. L. H. P. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz J Med Biol Res.**, v. 37, n. 2004 Aug;37(8):1103–9. Jul 20., p. 1103–1109, 2004.

REZA, N.; AKBARI EIDGAHI, M. R. Construction of a Synthetically Engineered nirB Promoter for Expression of Recombinant Protein in *Escherichia coli*. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 7, 2014.

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

ROSENTHAL, K. L. et al. Variants of a Human Colon Adenocarcinoma Cell Line Which Differ in Morphology and Carcinoembryonic Antigen Production. **Cancer Research**, v. 37, n. 11, p. 4024–4030, 1977.

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.

SCHLÖSSER, H. A. et al. Overcoming tumor-mediated immunosuppression. **Immunotherapy**, v. 6, n. 9, p. 973–988, 2014.

SEDGER, L. M.; MCDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 25, n. 4, p. 453–472, 2014.

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.

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.

SNAPP, E. GFP Fusion Protein. **Current Protocols in Cell Biology**, 2005.

STOCKERT, J. C. et al. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, n. 8, p. 785–796, 2012.

THRUMURTHY, S. G. et al. Colorectal adenocarcinoma: Risks, prevention and diagnosis. **BMJ (Online)**, v. 354, n. July, p. 1–12, 2016.

TOMPKINS, W. A. F. et al. Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 52, n. 4, p. 1101–1110, 1974.

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

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.

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

WATFORD, W. T. et al. The biology of IL-12: Coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 14, n. 5, p. 361–368, 2003.

WEN, Q. et al. Fusion cytokine IL-2-GM-CSF enhances anticancer immune responses through promoting cell-cell interactions. **Journal of Translational Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–13, 2016.

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.

YANG, Y. W. et al. Tumor-targeted delivery of a C-terminally truncated FADD (N-FADD) significantly suppresses the B16F10 melanoma via enhancing apoptosis. **Scientific Reports**, v. 6, n. October, p. 1–12, 2016.

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.

ZHANG, T. et al. Oncolytic Tanapoxvirus Expressing Interleukin-2 is Capable of Inducing the Regression of Human Melanoma Tumors in the Absence of T Cells. **Current Cancer Drug Targets**, v. 18, n. 6, p. 577–591, 2018.

ZHAO, M. et al. SYSTEM FOR MONITORING BACTERIAL TUMOR TREATMENT. **United States Patent Application Publication**, 2003.

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, X. et al. Telomerase reverse transcriptase interference synergistically promotes tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced oral squamous cell carcinoma apoptosis and suppresses proliferation *in vitro* and *in vivo*. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 42, n. 3, p. 1283–1294, 2018.

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.

ZHENG, S. J. et al. Critical roles of TRAIL in hepatic cell death and hepatic inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 1, p. 58–64, 2004.

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.

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Pró Reitoria
Pesquisa

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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Potencial anti-tumoral das proteínas TRAIL e IL-2 expressas e veiculadas por Salmonella atenuada", protocolada sob o CEUA nº 9970220817, sob a responsabilidade de **Luciana Camillo** - 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 02/10/2017.

We certify that the proposal "Antitumor potential of TRAIL and IL-2 proteins expressed and delivered by attenuated Salmonella", utilizing 48 isogenics mice (48 females), protocol number CEUA 9970220817, under the responsibility of **Luciana Camillo** - 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 10/02/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [10/2017](#) a [12/2019](#)

Área: [Centro de Ciências Biológicas E da Saúde](#)

Origem: [Biotério Externo](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [4 a 6 semanas](#)

N: [48](#)

Linhagem: [BALB/C](#)

Peso: [15 a 20 g](#)

Resumo: O câncer é uma doença que surge a partir de células que sofrem mutações que favorecem seu crescimento indiferenciado e descontrolado. O câncer colorretal abrange tumores que acometem um segmento do intestino grosso (o cólon) e o reto, e geralmente se inicia a partir de lesões benignas na parede interna do intestino grosso. Atualmente, os tratamentos do câncer não se mostram totalmente eficazes, e metástases continuam aparecendo como a principal causa de morte. Diante deste cenário, novas estratégias terapêuticas têm sido propostas, entre as quais está o uso de bactérias para veiculação in vivo de moléculas imunostimulatórias. Para isso, linhagens atenuadas de Salmonella estão entre os veículos mais estudados por apresentarem preferência por invadir células tumorais. Neste trabalho serão desenvolvidas linhagens recombinantes de Salmonella typhimurium para expressão dos genes que codificam o ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) e a interleucina 2 (IL-2). O TRAIL é promissor na terapia contra o câncer, pois apresenta uma indução seletiva de apoptose em células cancerosas em comparação com o tecido normal. A IL-2 potencializa a ação do sistema imune e acentua atividade anti-tumoral, que está correlacionada a uma resposta intratumoral anti-angiogênica e pró-apoptótica forte.

Local do experimento: Os experimentos utilizando os camundongos serão realizados na sala de experimentação animal do Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas, situado no Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar.

São Carlos, 02 de outubro de 2017

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

10 20 30 40 50 60
 METHGSHMET VSKGEELFTG VVPILVELDG DVNGHKFSVS GEGEDATYG KLTCLKICTT

70 80 90 100 110 120
 GKLPVPWPTL VTTFGYGVQC FARYPDHMET RQHDFFKSAM ETPEGYVQER TIFFKDDGNY

130 140 150 160 170 180
 KTRAEVKFEG DTLVNRIELK GIDFKEDGNI LGHKLEYNYN SHNVYIMETA DKQKNGIKVN

190 200 210 220 230 240
 FKIRHNIEDG SVQLADHYQQ NTPIGDGPVL LPDNHYLSYQ SALSKDPNEK RDHMETVLLLE

250 260 270 280 290 300
 FVTAAGITLG METDELYKME TYSMETQLAS CVTLTLVLLV NSAPTSSPTS SPTSSSTAEA

310 320 330 340 350 360
 QQQQQQQOHL EQLLMETDLQ ELLSRMETEN YRNKLPKPRME TLTFKLYLPK QATELKDQLQC

370 380 390 400 410 420
 LEDELGPLRH VLDLTQSKSF QLEDAENFIS NIRVTVVKLK GSDNTFECQF DDESATVWDF

430
 LRRWIAFCQS IISTSPQ

Número de aminoácidos: 437

Peso Molecular: 49569.69 Da

ANEXO 3 – Sequência de EmGFP + TRAIL e tradução da proteína

5'-sequência: **ATGCATGGATCCCAT**

ATGGTTTCTAAAGGTGAAGAACTGTTTACTGGTGTTGTTCCGATCCTGGTTGAAC
TGGATGGTGATGTTAACGGTCATAAATTTTCTGTTTCCGGTGAAGGTGAAGGTG
ATGCTACCTATGGTAAACTGACCCTGAAATTTATCTGCACCACCGGTAAACTGCC
GGTCCGTGGCCGACTCTGGTTACCACTCTGACCTATGGTGTTCAGTGTTTTGC
TCGTTATCCGGATCACATGAAACAGCATGATTTTTTTAAATCCGCGATGCCGGAA
GGTTATGTTCAGGAACGTACTATTTTTTTTAAAGACGATGGTAACTACAAAACCC
GTGCTGAAGTTAAATTTGAAGGTGATACTCTGGTTAACCGTATCGAACTGAAAG
GTATTGATTTTTAAAGAGGATGGTAACATTCTGGGTCATAAACTGGAATATACTA
TAACTCTCACAAAGTTTACATCACTGCGGATAAACAGAAAACGGTATTAAGTT
AACTTCAAACCCGTCATAACATTGAAGATGGTTCCGTTCAGCTGGCTGATCATT
ATCAGCAGAACACTCCGATTGGTGATGGTCCGTTCTGCTGCCGGATAACCATT
ATCTGTCCACTCAGTCTGCTCTGTCTAAAGATCCGAACGAAAACGTGATCACAT
GGTCTGCTGGAATTTGTTACCGCTGCGGGTATTACTCTGGGTATGGATGAACT
GTATAAAATGGCTCCGTCCTCTGGTGCGCTGAAAGATCTGTCTTTTTCTCAGCAT
TTTCGTATGATGGTTATCTGTATCGTTCTGCTGCAGGTTCTGCTGCAGGCTGTTT
CTGTTGCGGTTACCTATATGTATTTTACTAACGAAATGAAACAGCTGCAGGATAA
CTATTCTAAAATCGGTCTGGCTTGCTTTTCCAAAACCGATGAAGATTTTTGGGAT
TCCACTGATGGTGAAATCCTGAACCGTCCGTGCCTGCAGGTTAAACGTCAGCTG
TATCAGCTGATCGAAGAAGTTACTCTGCGTACTTTTCAGGATACCATTTCCACTG
TTCCGGAAAACAGCTGTCTACTCCGCCGCTGCCGCGTGGTGGTCGTCCACAG
AAAGTTGCTGCGCATATCACTGGTATCACTCGTCTGTTCCAACCTCCGCTCTGATTC
CGATTTCCAAGATGGTAAAACCTCTGGGTCAGAAAATCGAATCCTGGGAATCTT
CCCGTAAAGGTCATTCTTTTTCTGAACCATGTTCTGTTTCGTAACGGTGAACTGGT
TATCGAACAGGAAGGTCTGTATTATATCTATTCCAGACCTATTTTCGTTTTCAG
GAAGCGAAGATGCGTCCAAAATGGTTTCCAAAGATAAAGTTCGTACTAACAG
CTGGTTCAGTATATTTATAAATACACTTCTACCCGGACCCTATCGTTCTGATGA
AATCCGCTCGTAACTCTTGTTGGTCCCGTGATGCGGAATATGGTCTGTATTCTAT
CTATCAGGGTGGTCTGTTTGAACTGAAAAAACGATCGTATCTTCGTTTCTGTT
ACTAACGAACATCTGATGGATCTGGATCAGGAAGCGTCTTTTTTTGGTGCGTTTC
TGATCAACTAA

3'-sequência: **AAGCTT**

Itálico: sequência de TRAIL

Sublinhado: sequência de EmGFP

Negrito: sítios de restrição

Tamanho do fragmento: 1617 pb

Tradução (sequência de aminoácidos):

10 20 30 40 50 60
 METHGSHMET VSKGEELFTG VVPILVELDG DVNGHKFSVS GEGEGDATYG KLTLKFICTT

70 80 90 100 110 120
 GKLPVPWPTL VTTLTYGVC FARYPDHMET KQHDFFKSAM ETPEGYVQER TIFFKDDGNY

130 140 150 160 170 180
 KTRAEVKFEG DTLVNRIELK GIDFKEDGNI LGHKLEYNYN SHKVYITADK QKNGIKVNFK

190 200 210 220 230 240
 TRHNIEDGSV QLADHYQQNT PIGDGPVLLP DNHYLSTQSA LSKDPNEKRD HMETVLLLEFV

250 260 270 280 290 300
 TAAGITLGME TDELYKMETP PSSGALKDLS FSQHFRMETM ETVICIVLLQ VLLQAVSVAV

310 320 330 340 350 360
 TYMETYFTNE METKQLQDNY SKIGLACFSK TDEDFWDSTD GEILNRPCLQ VKRQLYQLIE

370 380 390 400 410 420
 EVTLRTFQDT ISTVPEKQLS TPPLPRGGRP QKVAAHITGI TRRSNSALIP ISKDGKTLGQ

430 440 450 460 470 480
 KIESWESSRK GHSFLNHVLF RNgELVIEQE GLYYIYSQTY FRFQEAEDAS KMETVSKDKV

490 500 510 520 530 540
 RTKQLVQYIY KYTSYDPPIV LMETKSARNS CWSRDAEYGL YSIYQGGLFE LKKNDRIFVS

550 560
 VTNEHLMETD LDQEASFFGA FLIN

Número de aminoácidos: 564

Peso Molecular: 64200.49 Da

