

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

D184e Damiani, Igor Alexandre Campos, 1988-
Estudo do efeito terapêutico de linhagens atenuadas de *Salmonella enterica* Typhimurium em modelos murinos de câncer / Igor Alexandre Campos Damiani. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Marcelo Brocchi.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Salmonella* Typhimurium. 2. *Salmonella* Typhimurium – Uso terapêutico. 3. Câncer - Tratamento. I. Brocchi, Marcelo, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Study of the therapeutic effect of *Salmonella enterica* Typhimurium attenuated strains in murine models of cancer

Palavras-chave em Inglês:

Salmonella Typhimurium

Salmonella Typhimurium – Therapeutic use

Cancer - Treatment

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Brocchi [Orientador]

Sueli Fumie Yamada Ogatta

José Andres Yunes

Data da defesa: 16-12-2011

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 16 de dezembro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Brocchi (Orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta


Assinatura

Prof. Dr. José Andrès Yunes


Assinatura

Dra . Fernanda Caroline de Carvalho

Assinatura

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Assinatura



UNICAMP



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

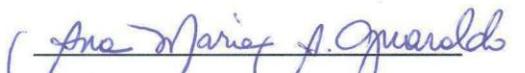
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **2063-1**, sobre "**Estudo do efeito terapêutico de linhagens atenuadas de *Salmonella enterica* Typhimurium isoladamente e em associação com a violaceína em diferentes modelos murinos**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marcelo Brocchi / Igor Alexandre Campos Damiani**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em **08 de fevereiro 2010**.

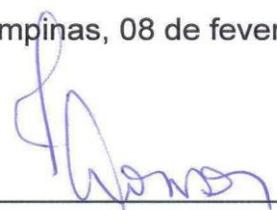
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **2063-1**, entitled "**Study of the therapeutic effect of attenuated strains of *Salmonella enterica* Typhimurium alone and in association with violacein in different murine models**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **February 8, 2010**.

Campinas, 08 de fevereiro 2010.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Estudo do efeito terapêutico de linhagens atenuadas de *Salmonella enterica Typhimurium* isoladamente e em associação com a violaceína em diferentes modelos murinos" (protocolo nº 2487-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcelo Brocchi / Igor Alexandre Campos Damiani, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 04 de julho de 2011.

Campinas, 04 de julho de 2011.

Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Este trabalho foi realizado no laboratório de Genômica e Biologia Molecular Bacteriana, no Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp).

“Busquem, pois, em primeiro lugar o Reino de Deus e a sua justiça, e todas essas coisas lhes serão acrescentadas. Portanto, não se preocupem com o amanhã, pois o amanhã se preocupará consigo mesmo. Basta a cada dia o seu próprio mal”.

Mateus 6: 33-34

Agradecimentos

Agradeço à Trindade Deus, Jesus Cristo e Espírito Santo pela Vida, saúde, paz, alegria e disposição.

Agradeço à minha mãe, Marisa Damiani, o maior exemplo da minha vida, por tudo o que tenho e sou hoje.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Brocchi, pelo apoio, compreensão e amizade.

Agradeço à Profa. Dra. Leonilda Santos, ao Alessandro, à Rose, ao Adriel e à Dra. Luciana Maria de Hollanda por todo o suporte que deram para a realização deste projeto.

Agradeço aos amigos do laboratório Marcos Moraes e Guilherme Milanez pelo companheirismo e grande amizade.

Agradeço à Bruna Lima, pela amizade e por todo o apoio que me deu no começo e durante todo o mestrado.

Agradeço ao Dããã, Luciane Pivetta e Gerson Nakazato por todo o suporte e conselhos que me deram quando comecei a trabalhar no laboratório.

Agradeço aos amigos da república “Ô lá em casa” Caio Reis, Luiz Tovo, Gustavo Alkmim e Luiz Bosso por me acolherem quando vim morar em Barão Geraldo e pela grande amizade e companheirismo que surgiram ao longo dos anos.

Agradeço à Carol, futura mãe da Alice, pela amizade, grande apoio e por todas as divertidas conversas que tivemos.

Agradeço a todos os grandes amigos que fiz durante minha passagem por Barão Geraldo e pela Unicamp pelos ótimos momentos juntos: Felipe Eltermann, Sidão, Priscila Gomes, Sabrina, Milene, Pri Akemi, Ellie, Naara, Thaísa, Bia, Juliana Leite, Stef, Marcelle, Carol Lambertini e Marcela Medici.

Índice

Resumo	xiv
Abstract	xvii
1. Introdução	2
1.1 O Câncer	2
1.2 Salmonella enterica e mecanismos de infecção	5
1.3 Salmonella no tratamento do câncer	8
1.4 Nucleoid-associated proteins (Naps)	16
2. Objetivos	20
3. Materiais e métodos	22
3.1 Meios de cultura, condições de cultivo e estocagem das linhagens bacterianas	22
3.2 Salmonella enterica Typhimurium ST662	22
3.3 Cultivo das células tumorais	23
3.4 Modelos animais de tumor	24
3.5 Construção dos mutantes $\Delta ihfA$, $\Delta ihfB$ e $\Delta msbB$	25
3.5.1 Introdução do plasmídio pKD46 em <i>S. enterica</i> Typhimurium	25
3.5.2 Amplificação do cassete de recombinação por PCR	27
3.5.3 Substituição dos genes <i>ihfA</i> , <i>ihfB</i> e <i>msbB</i> pelo cassete de recombinação linear	28
3.5.4 Confirmação das mutações utilizando os iniciadores de detecção	28
3.5.5 Etapa de transdução com o bacteriófago P22	30
3.6 Construção do duplo mutante ST662 Δ asd Δ ihfA	31
3.7 O mutante ST662 Δ fis	32
3.8 Teste de persistência dos mutantes ST662 Δ ihfA nos camundongos e análise da sobrevida	32
3.9 Injeção subcutânea da linhagem ST662 Δ ihfA	33
3.10 Tratamento	33
3.11 Avaliação da atividade antitumoral	34

3.12 Análises histológicas	35
3.12.1 Processamento do material	35
3.12.2 Coloração	35
3.13 Dosagem de transcritos para IL-12 e INF- γ	36
3.13.1 Extração de RNA total	36
3.13.2 Síntese do cDNA	36
3.13.3 PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR)	37
4. Resultados	39
4.1 Construção dos mutantes ST662 Δ ihfA e ST662 Δ ihfB	39
4.2 Teste de persistência do mutante ST662 Δ ihfA nos camundongos e análise da sobrevida	39
4.3 Avaliação da atividade antitumoral da linhagem ST662 Δ ihfA	41
4.4 Injeção subcutânea da linhagem ST662 Δ ihfA	45
4.5 Microscopia de luz	45
4.6 PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR)	47
4.7 Avaliação da atividade antitumoral da linhagem ST662 Δ ihfB	47
4.8 Construção e avaliação da atividade antitumoral do duplo mutante ST662 Δ asd Δ ihfA	49
4.9 Construção e avaliação da atividade antitumoral do mutante ST662 Δ msbB	51
4.10 Avaliação da atividade antitumoral da linhagem ST662 Δ fis	53
5. Discussão	56
6. Referências Bibliográficas	63
7. Anexo	75
7.1 Testes com a violaceína	75

Lista de abreviações

<i>asd</i>	Gene que codifica a enzima aspartato semialdeído desidrogenase
cDNA	DNA complementar
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleosídeos fosfatados
Fis	“Factor for inversion simulation”
<i>fis</i>	Gene que codifica a proteína Fis
H-NS	“Histone-like Nucleoid Structuring”
IFN- γ	Interferon gama
Ihf	“Integration Host Factor”
<i>ihfA</i>	Gene que codifica a subunidade α da proteína Ihf
<i>ihfB</i>	Gene que codifica a subunidade β da proteína Ihf
IL-12	Interleucina 12
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LD ₅₀	Dose letal média
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
<i>msbB</i>	Gene envolvido na síntese do lipídio A
PBS	Tampão salina fostato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
rpm	Rotações por minuto
SOC	Meio de cultura “Super Optimal broth with Catabolite repression”
SS	Meio de cultura “Salmonella-Shigella Agar”
U.F.C.	Unidade Formadora de Colônia
U.F.P.	Unidade Formadora de Placa
WHO	Organização Mundial da Saúde
Δ	Deleção
μg	Micrograma
μL	Microlitro

Resumo

Resumo

Salmonella enterica Typhimurium é uma bactéria anaeróbica facultativa que apresenta tropismo por áreas tumorais. Esta interessante propriedade abre novas perspectivas em relação à pesquisa contra o câncer, pois há muito tempo buscam-se veículos seletivos para a eliminação de neoplasias. A inibição do crescimento tumoral e até mesmo seu total retrocesso foram observados em modelos murinos de câncer tratados com linhagens atenuadas de *S. enterica*. Além disso, seu potencial como veículo de moléculas antitumorais exógenas (vacina de DNA, RNAi, citocinas e enzimas, por exemplo) também foi descrito. No entanto, as linhagens testadas em humanos até o presente não induziram os mesmos efeitos observados nos modelos animais. Isto indica que estudos adicionais são necessários para otimização desta terapia, incluindo o teste de novas linhagens mutantes atenuadas de *S. enterica*. No presente trabalho, foi avaliado o efeito terapêutico das linhagens mutantes atenuadas de *S. enterica* Typhimurium ST662 Δ *ihfA*, ST662 Δ *ihfB*, ST662 Δ *ihfA* Δ *asd*, ST662 Δ *msbB* e ST662 Δ *fis*, construídas por nosso grupo, em modelos murinos de câncer. O uso destas linhagens para o tratamento de tumores ainda não tinha sido descrito. Os mutantes ST662 Δ *ihfA* e ST662 Δ *ihfB* apresentaram potencial eficácia no tratamento de tumores, uma vez que sua administração intratumoral foi capaz de eliminar totalmente a massa tumoral em 30% dos animais tratados com uma dose de 10⁵ u.f.c. A linhagem ST662 Δ *fis* apresentou certo efeito antitumoral, mas o tratamento com este mutante levou todos os camundongos do grupo à morte. Já o duplo mutante ST662 Δ *ihfA* Δ *asd* mostrou-se promissor como uma possível linhagem carreadora de moléculas exógenas, pois a deleção conjunta destes genes gerou uma atenuação muito

eficaz e segura, já que mesmo quando administrada em altas doses os camundongos sobreviveram. O resultado menos satisfatório foi observado com a linhagem ST662 Δ *msbB* que, além de não apresentar nenhum efeito antitumoral aparente, levou os camundongos à morte. A discussão do efeito biológico de cada uma destas linhagens permite acrescentar novas informações a esta linha de pesquisa, abrindo novas perspectivas para a elucidação dos mecanismos de ação e viabilidade do uso de *S. enterica* no tratamento de tumores.

Abstract

Abstract

Salmonella enterica Typhimurium, a facultative anaerobic bacterium, presents tropism for tumor areas. This interesting property creates new perspectives in cancer research, in which great efforts have been done to seek a drug carrier that could selectively target and destroy malignant cells. Inhibition of tumor growth and even its total elimination were observed in murine cancer models infected by attenuated strains of *S. enterica*. Besides, its potential as a carrier of exogenous antitumor molecules (DNA vaccine, iRNA, cytokines and enzymes, for example) is also described. Nevertheless, when these strains were tested in humans, they did not induce the same effects observed in murine models. Thus, additional studies are needed to optimize this therapy, including the test of novel *S. enterica* attenuated strains. In this project, the therapeutic effect of the attenuated strains ST662 Δ *ihfA*, ST662 Δ *ihfB*, ST662 Δ *ihfA* Δ *asd*, ST662 Δ *msbB* and ST662 Δ *fis* of *S. enterica* Typhimurium, constructed by our group, were analyzed in murine models of cancer. The therapeutic potential of such strains has not yet been described. When administrated by the intratumoral route, the ST662 Δ *ihfA* and ST662 Δ *ihfB* strains presented potential antitumor efficacy, since tumor elimination was observed in 30% of the animals treated with 10^5 c.f.u. of such strains. When treated with the ST662 Δ *fis* mutant some antitumor effect was observed, but all mice in the group died after a few days. The double mutant ST662 Δ *ihfA* Δ *asd* is a promising exogenous antitumor molecules carrier, since the deletion of both genes generated an efficient attenuated strain that can be safely administrated in mice even in high doses. Less promising was the antitumor effect of the ST662 Δ *msbB* mutant, which did not induce any significant tumor shrinkage and, besides, all treated

animals died. The discussion of the biologic effect of each of these new strains allows adding novel information to this research field, creating new perspectives in the elucidation of the mechanisms of action and the viability of *S. enterica* use in cancer treatment.

Introdução

1. Introdução

1.1 O Câncer

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011), estima que 84 milhões de pessoas morrerão de câncer entre 2005 e 2015 sem nenhuma intervenção, seja por não terem acesso ao tratamento ou por desenvolverem tipos incuráveis da doença. Além disso, a mortalidade por câncer tende a aumentar 45% entre 2007 e 2030 (WHO, 2011), devido ao aumento da longevidade da população mundial. Tabaco, uso abusivo de álcool, inatividade física, exposição a agentes carcinogênicos e radiação e infecções pelos vírus da hepatite B e C e papiloma vírus, são fatores que predisõem o surgimento de cânceres (WHO, 2011).

Câncer é uma doença genética causada pelo acúmulo de várias mutações em células somáticas ao longo do tempo. A doença surge na maioria dos casos por mutações ou ativação anormal de genes responsáveis pelo controle do crescimento e pela divisão celular. Estes genes recebem o nome de oncogenes e mais de 100 deles já foram descritos (Guyton & Hall, 2006). A proliferação descontrolada de clones de uma única célula que sofreu mutações origina tumores (ou neoplasmas). Tumores que crescem localizados, sem invadir tecidos adjacentes, são classificados como benignos, enquanto os que alcançam a corrente sanguínea e/ou os vasos linfáticos e colonizam outros tecidos do organismo, originando tumores secundários (metástases), são chamados de malignos. O termo 'câncer' é usado somente quando o tumor é maligno. Estes são responsáveis por cerca de 90% dos casos de óbito pela doença (Alberts *et al*, 2002).

Normalmente, tumores benignos são inofensivos ao seu hospedeiro e podem ser removidos cirurgicamente sem maiores problemas. No entanto, há casos raros em que a

expansão de tumores benignos gera pressão em um tecido ou órgão vital e, no caso de adenomas de tireóide, podem causar liberação excessiva dos hormônios T3 (tiidotironina) e T4 (tiroxina), levando ao hipertiroidismo. Adenomas pituitários podem liberar hormônios de crescimento na circulação, levando ao desenvolvimento excessivo de alguns órgãos (acromegalia) (Appel *et al*, 2011).

Os inúmeros tipos de tumores são classificados de acordo com o tecido e o tipo celular do qual se originam. Os que surgem a partir de células epiteliais, por exemplo, são chamados de carcinomas, enquanto os que se originam do tecido conectivo ou de células musculares são classificados como sarcomas. Há ainda os que se originam de células hematopoiéticas, como os diferentes tipos de leucemia, e de células do sistema nervoso. A classificação dos tumores benignos está relacionada à dos malignos: um adenoma, por exemplo, é um tumor epitelial benigno de origem glandular, sendo o adenocarcinoma sua forma maligna (Alberts *et al*, 2002). Do mesmo modo, um condroma e um condrosarcoma são, respectivamente, a forma benigna e a maligna do tumor da cartilagem (Alberts *et al*, 2002).

Cada massa tumoral apresenta características que evidenciam sua origem. As células de um carcinoma originado de queratinócitos na pele, por exemplo, vão continuar a sintetizar filamentos de citoqueratina, gerando um tumor de aspecto peculiar (Alberts *et al*, 2002). Outro caso marcante é o do melanoma, derivado de melanócitos, cujo tumor continua a sintetizar grande quantidade de melanina, o que o deixa com uma coloração escura (Alberts *et al*, 2002).

Cerca de 90% dos cânceres humanos são carcinomas, provavelmente pelo fato de que a maior parte da proliferação celular do organismo se dá no epitélio e também por ser este o tecido mais exposto aos vários agentes que causam danos físicos ou químicos que favorecem o desenvolvimento de células anormais (Alberts *et al*, 2002).

Os processos que levam ao desenvolvimento dos mais de 100 tipos de câncer conhecidos, como proliferação descontrolada de células, inibição da apoptose, angiogênese, metástase e invasão, são regulados por uma complexa cadeia de eventos celulares envolvendo ligantes extracelulares, receptores transmembrana, sinalização intracelular de proteínas quinases, fatores de transcrição, entre outros (Ma & Adjei, 2009). Tamanha complexidade é um desafio para o desenvolvimento de fármacos tumor-específicos e não tóxicas para as células normais. Além disso, um grande problema enfrentado no tratamento desta doença é a aquisição de mecanismos de resistência a fármacos. No início do tratamento, parte dos tumores humanos responde de maneira satisfatória a fármacos citotóxicos, mas, passado algum tempo, tornam-se refratários a tratamentos com quimioterápicos e reincidem. (Weinberg, 2008). Estes mecanismos são, por exemplo: a perda da capacidade de captar moléculas de fármacos pela membrana plasmática; aquisição da habilidade de bombear essas moléculas para fora; a aquisição da capacidade de metabolizar as drogas, gerando moléculas não-tóxicas; e também a possibilidade de se adquirir mecanismos que podem reparar mais rapidamente os danos causados em seu DNA por ação de quimioterápicos ou por radiação (Weinberg, 2008). O câncer é ainda uma doença incurável em alguns casos, o que torna muito importante a descoberta e o desenvolvimento de novas alternativas ao seu tratamento atual.

1.2 *Salmonella enterica* e mecanismos de infecção

As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram-negativos anaeróbicos facultativos que fazem parte da família das enterobactérias. Sua classificação sorológica é baseada na detecção de antígenos flagelares (H), somáticos (O) e capsulares (Mastroeni & Maskell, 2006). De acordo com a classificação atual, o gênero *Salmonella* contém apenas duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. Na espécie *S. enterica*, foram descritos mais de 2500 sorovares, mas apenas alguns são de interesse médico. Os sorovares Typhi e Paratyphi de *S. enterica* são os principais responsáveis pela forma mais grave de salmonelose em humanos, a febre tifóide, enquanto outros serovares, como Typhimurium, causam gastroenterite, cujo grau de morbidade depende do estado nutricional e imunológico do paciente. Contudo, sorovares de *S. enterica* não Typhi ou Paratyphi também podem causar infecção sistêmica no homem em alguns casos (Mastroeni & Maskell, 2006).

A quantidade de *S. enterica* ingerida que causa infecções gira em torno de 10^5 - 10^{10} u.f.c. (unidades formadoras de colônia), variando de acordo com a sorovariedade da bactéria e o estado imunológico do hospedeiro (Darwin & Miller, 1999). O principal veículo de transmissão da salmonelose é a ingestão de alimentos contaminados. Infecções por *S. enterica* podem estar relacionadas a praticamente todos os tipos de alimentos, uma vez que é uma bactéria ubíqua e pode crescer em temperaturas que variam de 7 a 45 °C (Mastroeni & Maskell, 2006). Produtos tão diversos como chocolate, batata chips e brotos de feijão foram identificados como responsáveis por carrear a bactéria em surtos de salmonelose (van Duynhoven *et al*, 2002). Além disso, é muito comum a infecção pela ingestão de carne e derivados de aves domésticas, vacas, porcos e ovelhas.

Após a ingestão, a sobrevivência destas bactérias no estômago se dá por um mecanismo de ácido-tolerância (Garcia Del Portillo *et al*, 1993). Após passar pelo estômago, *S. enterica* infecta o intestino. Esta bactéria é um patógeno intracelular facultativo que se adere e invade células da mucosa intestinal, principalmente as células M. Estas são células epiteliais especializadas que capturam antígenos intestinais por endocitose e os transportam para células linfóides presentes nas placas de Peyer (Jones *et al*, 1994). A invasão das células M também permite que as bactérias infectem células epiteliais adjacentes através de sua superfície basolateral. Após a passagem de *S. enterica* pelo epitélio intestinal, os macrófagos da submucosa capturam a bactéria para eliminá-la do hospedeiro (Sano *et al*, 2007). No entanto, uma parte delas sobrevive ativando mecanismos de evasão que permitem à atividade microbiana das células fagocíticas (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, acidez, atividades de enzimas lisossomais e peptídeos antimicrobianos), possibilitando sua replicação no interior do vacúolo (Alpuche-Aranda *et al*, 1994.) Além disso, *S. Typhimurium* ativa a caspase-1 (uma cisteína protease que induz apoptose) dentro de macrófagos infectados, possibilitando o escape das bactérias após sua replicação. Esta ativação ocorre por diferentes mecanismos, incluindo aqueles produzidos pela flagelina, pelo sistema de secreção tipo III e pela proteína efetora SopE (Hoffman *et al*, 2010). Acredita-se que o papel de outras proteínas efetoras, como InvG e SipB, também é relevante na ativação da caspase-1. Hoffman e colaboradores (2010) reportaram a ausência de ativação da caspase-1 quando os macrófagos foram infectados por mutantes nulos para uma destas proteínas. A caspase I também cliva os precursores de IL1 β e IL18, produzindo citocinas bioativas que potencializam a inflamação local e promovem infiltração de fagócitos polimorfonucleares que, por sua vez, internalizam mais bactérias,

levando-as às placas de Peyer e aos linfonodos mesentéricos. Lançando mão novamente dos mecanismos de ativação de apoptose, elas escapam dos fagócitos, passam a colonizar esses órgãos e podem alcançar a circulação sanguínea através da circulação linfática. No sangue, *S. enterica* ativa o sistema complemento, mas o complexo lítico C5-9 não consegue se inserir na membrana celular devido às longas cadeias de lipopolissacarídeos (antígeno O) que fazem parte da sua parede celular. Assim, as bactérias não são lisadas, mas opsonizadas e, conseqüentemente, englobadas pelas células do sistema imune. Após ser removida da circulação, *S. enterica* é encontrada principalmente no baço, fígado e medula óssea, onde reside no interior de macrófagos, células dendríticas e fagócitos polimorfonucleares, formando granulomas. Caso a infecção não seja interrompida pela ação do sistema imune ou pelo uso de antibióticos, a bactéria pode se disseminar pelo organismo, causando uma infecção sistêmica letal.

Um dos responsáveis pela morte do paciente em uma infecção sistêmica por *Salmonella* pode ser o choque endotóxico causado pela resposta do sistema imune ao lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular da bactéria. Citocinas como TNF- α , IL1 β , IL6, IL12, IFN- γ , fator ativador de plaquetas e quimiocinas são produzidas em resposta ao LPS e estão associadas à patogênese do choque endotóxico, caracterizado por bacteremia, hipóxia, hipoperfusão, coagulação intravascular disseminada e falência múltipla dos órgãos (Van Amersfoort *et al*, 2003).

Um aparato especializado, chamado sistema de secreção tipo III (TTSS), é essencial para a colonização e patogênese da salmonela nos tecidos do hospedeiro. O TTSS auxilia a transferência de proteínas, conhecidas como efetoras, que são responsáveis pela alteração de algumas funções celulares do hospedeiro, como a arquitetura do citoesqueleto, tráfego

de membranas, transdução de sinais e expressão gênica de citocinas, para possibilitar a sobrevivência e colonização da bactéria (Hansen-Wester & Hensel, 2001). *S. enterica* infecta o hospedeiro empregando dois TTSS, um codificado pela ilha de patogenicidade 1 (SPI-1) e outro pela ilha de patogenicidade 2 (SPI-2), que são áreas presentes no cromossomo bacteriano que codificam um ou mais genes de virulência (*S. enterica* apresenta 10 SPIs). O primeiro é associado à invasão do epitélio intestinal pelas bactérias (Zhou, 2001), enquanto o segundo permite sua sobrevivência no interior de macrófagos e células dendríticas (Abrahams & Hensel, 2006). O TTSS-1 é expresso quando a bactéria está no meio extracelular no lúmen intestinal. Ele é responsável por iniciar a inflamação do intestino, ativando a invasão das células epiteliais e permitindo a colonização da lâmina própria. As moléculas do TTSS-1 atuam no citoesqueleto de actina induzindo a internalização das bactérias por causar alterações na conformação da membrana plasmática. Após a invasão do epitélio, as bactérias se deparam com células de defesa, como os macrófagos e células dendríticas, que as englobam em seus vacúolos. Isto requer a expressão do TTSS-2, que permite sua sobrevivência em seu interior, evitando os efeitos da oxidação. Este mecanismo de sobrevivência no interior dos vacúolos é essencial para a infecção sistêmica e potencializa a inflamação intestinal.

1.3 *Salmonella* no tratamento do câncer

Na pesquisa contra o câncer, grandes esforços já foram realizados na tentativa de se encontrar um veículo seletivo para destruir células tumorais. A presença de bactérias em tumores humanos sempre chamou a atenção dos pesquisadores. Coley (1893) observou, mais de um século atrás, que alguns pacientes com câncer foram curados após infecções

bacterianas pós-operatórias. No meio do século passado, Malmgren & Flanigan (1955) mostraram que bactérias anaeróbicas tinham a capacidade de sobreviver e se replicar em tecidos tumorais necróticos com baixa concentração de oxigênio. Após a observação de que na administração intravenosa ou oral de *Salmonella enterica* Typhimurium em camundongos esta se acumulava em tumores e inibia seu crescimento (Pawelek *et al*, 1997), este potencial passou a ser mais explorado pela comunidade científica. Além disso, os crescentes avanços na área de genética molecular bacteriana possibilitam inúmeras novas abordagens no tratamento do câncer.

A eficácia dos agentes antitumorais convencionais como os quimioterápicos citotóxicos continua insatisfatória, com baixas taxas de sobrevivência para pacientes com tipos diferentes de câncer. Isto ocorre, em parte, por não atingirem adequadamente a área tumoral e/ou por apresentarem baixa seletividade para as células tumorais. O problema se agrava pelo fato de que os novos vasos sanguíneos formados na área tumoral são muito irregulares e mal organizados, levando à formação de inúmeras regiões de hipóxia (<1% de oxigênio) ou anóxia (0% de oxigênio). Células tumorais em hipóxia geralmente não se proliferam, sendo, assim, refratárias para muitas formas de quimioterapia, já que os fármacos geralmente são direcionadas a inibir proteínas e outras moléculas que são expressas somente em células em multiplicação. Estratégias alternativas para se encontrar novos fármacos e genes terapêuticos estão sendo desenvolvidas, mas sua administração sistêmica continua severamente limitada devido ao inadequado suprimento vascular dos tumores. Esta limitação fez com que se buscassem vetores celulares que, depois de administrados sistemicamente, ativamente migrassem para as áreas em hipóxia dos tumores, tais como as bactérias anaeróbicas obrigatórias ou facultativas. Por serem

organismos vivos metabolicamente versáteis que podem adquirir energia a partir do meio e capazes de se locomover, a densidade bacteriana pode ser grande em áreas distantes dos vasos sanguíneos, diferentemente de moléculas passivas, como os quimioterápicos, cuja função se restringe a locais próximos à vasculatura.

Nos últimos anos, foi mostrado que muitos gêneros de bactérias têm capacidade de se acumular preferencialmente em tumores, incluindo *Salmonella*, *Escherichia*, *Clostridium* e *Bifidobacterium*; *Caulobacter*, *Listeria*, *Proteus* e *Streptococcus* também têm sido investigados como agentes antitumorais (Forbes, 2010). Uma das principais vantagens da terapia bacteriana é seu grande tropismo por tumores. Até o presente, muitas estratégias envolvendo bactérias foram utilizadas no tratamento do câncer em modelos animais. Nestes experimentos, vários pesquisadores obtiveram sucesso, reduzindo a massa tumoral e aumentando a sobrevivência dos animais, além de também tratar metástases (Forbes, 2010).

Anaeróbicos facultativos (por exemplo, *S. enterica* e *Escherichia*) utilizam um mecanismo complexo para colonizar tumores. Cinco características são responsáveis pelo acúmulo destas bactérias no tumor: retenção na caótica vasculatura dos tumores (Forbes *et al*, 2003); acesso aos tumores pelos mecanismos de inflamação (Leschner *et al*, 2009); quimiotaxia por moléculas produzidas pelos tumores, como o aspartato (Kasinskas *et al*, 2007); crescimento preferencial em microambientes tumor-específicos (Zhao *et al*, 2005); e proteção contra a ação do sistema imune quando estão no interior do tumor (Sznol *et al*, 2000). Recentemente, mais um mecanismo de ação de *Salmonella* na colonização de tumores foi elucidado. Crull e colaboradores (2011) reportaram a formação de biofilme por algumas linhagens da bactéria, em resposta ao grande número de neutrófilos que são

atraídos ao tumor, após sua colonização. Todos estes mecanismos permitem que *S. enterica* se acumule nos tumores em uma razão de 1000/1 quando comparado com outros órgãos, como fígado e baço (Yang *et al*, 2008). Além disso, a taxa de crescimento de *Salmonella* é maior em células tumorais *in vitro* quando estas estão em processo de morte, fenômeno que também é observado em modelos animais de tumor (Leschner *et al*, 2009).

Como descrito anteriormente, *S. enterica* invade e causa a morte de macrófagos, sua célula hospedeira natural, por vias que dependem ou independem da caspase I (Hernandez *et al*, 2003). Além disso, salmonelas invasivas têm a capacidade de infectar células não fagocíticas pela expressão do sistema de secreção tipo III, permitindo que penetrem em uma grande variedade de tipos celulares (Galan, 2001). Foi mostrado que o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi e possivelmente a mitocôndria da célula hospedeira são utilizados como fonte de nutrientes para as bactérias em crescimento dentro do vacúolo (Schulumberger & Hardt, 2006; Zhong *et al*, 2007). Desta forma, é possível que a bactéria lance mão destes mesmos mecanismos para invadir, colonizar e destruir células tumorais.

Experimentos *in vitro* mostraram que compostos quimioatrativos produzidos por células tumorais quiescentes também contribuem para a capacidade de *S. enterica* colonizar tumores sólidos (Kasinskas & Forbes, 2006). *In vivo*, *S. enterica* Typhimurium coloniza áreas necróticas ricas em nutrientes (Forbes *et al*, 2003), e também é capaz de invadir células tumorais (Pawelek *et al*, 2002; Avogadri *et al*, 2005), resultando em retardo do crescimento da massa tumoral e aumento da sobrevivência de camundongos (Zhao *et al*, 2006). Entre as explicações propostas para tal fato destacam-se maior disponibilidade de nutrientes liberados pelas células necróticas em regiões de hipóxia, diminuição da atividade

bactericida de macrófagos e neutrófilos granulocíticos sobre *S. enterica* em áreas com baixas concentrações de oxigênio, supressão do sistema imune e reduzida exposição da bactéria aos anticorpos e moléculas do sistema complemento devido às irregularidades da vascularização tumoral (Clairmont *et al*, 2000; Low *et al*, 1999; Pawelek *et al*, 1997,2003; Rosenberg *et al*, 2002; Zhao *et al*, 2007). Estas observações combinadas com a fácil manipulação gênica tornaram este gênero bacteriano um dos mais promissores para a construção de vetores com finalidade antitumoral (Sznol *et al*, 2000).

Zhao e colaboradores (2006) descrevem a cura de um tumor de mama ortotópico em camundongos *nude* após terapia com *S. enterica* Typhimurium auxotrófica para leucina e arginina. Em um estudo posterior (Zhao *et al*, 2007), o mesmo grupo relatou o desaparecimento de células humanas de câncer de próstata PC-3 em camundongos *nude* após injeção intratumoral do mesmo mutante de *S. enterica*. Em estudos clínicos, *Salmonella* modificada geneticamente administradas sistemicamente colonizaram tumores humanos sem causar grandes efeitos tóxicos adversos (Nemunaitis *et al*, 2003).

S. enterica Typhimurium também tem sido usada com sucesso para expressar e carrear moléculas terapêuticas, como enzimas conversoras de pró-drogas e antígenos, para tumores (Nishikawa *et al*, 2006). Yang e colaboradores (2008) transformaram *S. enterica* Typhimurium com um plasmídeo de expressão em eucariotos que codificava um RNA de interferência cujo alvo é o mRNA de uma proteína anti-apoptótica, com o objetivo de avaliar a eficácia de *Salmonella* como carreador de moléculas exógenas que possam interferir na expressão gênica de células tumorais. Outro enfoque terapêutico descrito foi o uso de cepas atenuadas da bactéria que foram modificadas para secretar citocinas e

interleucinas que podem ter o potencial para estimular respostas antitumorais do hospedeiro (Hahn *et al*, 2003).

Em pacientes com câncer, tumores em crescimento estabelecem mecanismos de escape do sistema imune que enfraquecem as funções de células dendríticas (CDs) e de células T. As CDs tornam-se debilitadas na sua locomoção, maturação e capacidade de ativar células T, que por sua vez se tornam anérgicas ou tolerogênicas (Vicari *et al*, 2002; Curiel, 2007). Deste modo, a identificação de fármacos ou outros agentes terapêuticos capazes de reverter a inativação de CD induzida pelos tumores é de grande importância. Neste sentido, os agentes imunostimulatórios mais poderosos conhecidos até agora são os microrganismos, como as bactérias.

A resposta imunológica ativada e sua ação em resposta ao tratamento de tumores com *S. enterica* estão sendo elucidadas. Avogadri e colaboradores (2005 e 2008) contribuíram grandemente para o entendimento da complexa relação entre tumor, *S. enterica* e sistema imune. A infecção por *S. enterica* faz com que os tumores sejam reconhecidos pelo sistema imune como células infectadas e não como células malignas que possuem mecanismos conhecidos de evasão e indução de tolerância a este sistema. Estes pesquisadores descreveram que células do melanoma B16F10 invadidas por mutantes atenuados de *S. enterica* Typhimurium apresentam antígenos de origem bacteriana e tornam-se alvos de células T específicas anti-*Salmonella*. Este “alerta” que as células tumorais dão ao sistema imune de que estão infectadas pode ser explorado para induzir a completa regressão de tumores, mesmo aqueles que são muito agressivos e imunossupressores, como o melanoma B16F10. Além disso, o tratamento de tumores com

bactérias faz com que o ambiente tumoral saia de um estado imunossuprimido para um estado rico em citocinas pró-inflamatórias provavelmente pela presença de grandes quantidades de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) expressos pelas bactérias e também pelo fato de o tecido tumoral estar infectado. Foi observado um aumento de 5 vezes na expressão das citocinas inflamatórias IL-1b, Il-6 e TNF- α no tumor B16F10 em 24 horas após a injeção intratumoral de *Salmonella*, evidenciando uma rápida ativação da resposta imune (Avogadri *et al*, 2008). Desta forma, as CDs contendo fragmentos de células tumorais mortas podem superar a sua letargia, sendo ativadas pelos PAMPs, e migrar para os linfonodos, onde também podem estimular linfócitos TCD8+ para gerar uma resposta imune antitumoral. Os granulócitos, estimulados pela bactéria, também podem auxiliar na destruição de células tumorais pela liberação de óxido nítrico (Reis e Sousa *et al*, 2001). A morte de células tumorais infectadas por *S. enterica* pela ação de células *natural-killer* (NK) também é um mecanismo que deve ser considerado. Além disso, durante a remoção de células tumorais mortas, seus detritos também podem ser englobados por células apresentadoras de antígenos endógenas e apresentados a células T “*naives*” para a estimulação de células T tumor-específicas (Merritt *et al*, 2004).

Como mencionado anteriormente, inúmeras linhagens bacterianas, especialmente de *S. enterica*, foram descritas como importantes agentes antitumorais em camundongos, levando-os inclusive à cura. No entanto, quando testadas em humanos, o efeito não foi similar. Um estudo piloto avaliando a eficácia antitumoral de bactérias foi realizado em pacientes humanos refratários aos tratamentos convencionais. Nemunaitis e colaboradores (2003) testaram a linhagem VNP20009 de *S. enterica* Typhimurium – auxotrófica para adenina e nula para o gene *msbB* – em 25 pacientes. Foi administrada uma dose intravenosa

de 10^8 u.f.c., mas nenhuma regressão tumoral foi aparente. Além disso, foi observado aumento na produção das citocinas IL- 1β , TNF- α e IL-6, associadas à toxicidade clínica, como hipotensão, febre, trombocitopenia, anemia, diarreia, náusea e vômito (Toso *et al*, 2002). Um segundo estudo foi descrito pelo mesmo grupo (Nemunaitis *et al*, 2003), no qual doses entre 10^6 e 10^8 u.f.c. da linhagem VNP20009 foram administradas diretamente nos tumores. Duas semanas após a injeção, a bactéria pôde ser detectada em biópsias de boa parte dos tumores tratados e alguns deles apresentavam sinais de necrose, inflamação e regressão. No entanto, não houve melhora significativa no quadro dos pacientes. Na tentativa de se potencializar o tratamento, foi inserido no genoma da linhagem VNP20009 o gene da citosina desaminase (CD) de *Escherichia coli*, originando a linhagem VNP20009 TAPET-CD. A enzima CD é encontrada em bactérias e fungos, mas não em mamíferos. Ela converte a 5-fluorocitosina (5-FC), um agente antifúngico, em 5-fluorouracila (5-FU). A 5-FU é utilizada no tratamento de cânceres gástrico, de cabeça e pescoço, pancreático e de mama (Haskell, 1995). O tratamento foi realizado pela injeção intratumoral da linhagem VNP20009 TAPET-CD seguido da administração oral de 5-FC. Neste caso, a resposta clínica dos pacientes também não foi muito significativa, mas um deles, no qual a concentração de 5-FU detectada no tecido maligno foi maior do que nos outros pacientes, manteve seu quadro estável e sobreviveu por mais de 1 ano após o tratamento (Nemunaitis *et al*, 2003).

A comunidade científica tem provado o grande potencial do uso de bactérias no tratamento do câncer. A cada ano surgem novas abordagens e linhagens atenuadas de bactérias com esta finalidade. Atualmente, o único método eficaz baseado em infecção bacteriana utilizado no tratamento de câncer humano é o sistema Bacillus Calmette-Guérin

(BCG) (cepa *M. bovis*) contra células de carcinoma da bexiga (Bohle & Brandau, 2003). Esse grande potencial terapêutico traz esperança no tratamento de tumores e deve continuar a ser estudado até que se sejam desenvolvidas linhagens eficazes que possam ser usadas no tratamento de qualquer tipo de câncer humano.

1.4 Nucleoid-associated proteins (Naps)

As bactérias possuem proteínas do tipo NAPs (“*Nucleoid-associated proteins*”) que compõem o nucleóide bacteriano. As NAPs participam da regulação da expressão gênica de inúmeros *operons* por se ligarem ao DNA. As NAPs mais bem descritas são IHF, FIS e H-NS (Mangan *et al*, 2006).

O “*Integration Host Factor*” (IHF) é uma proteína que se liga ao DNA e tem papel importante na organização estrutural e na regulação da expressão gênica em bactérias Gram-negativas (Dorman, 2009). Ela foi descoberta em *E. coli* como sendo uma proteína essencial para a integração sítio-específica e excisão do bacteriófago λ (Mangan *et al*, 2006). Além disso, é uma proteína importante em outros mecanismos como organização do genoma, controle da transcrição de alguns genes, recombinação e transposição (Mangan *et al*, 2006). IHF é composto por duas subunidades, α e β , codificados pelos genes *ihfA* e *ihfB*, respectivamente. Estes genes são encontrados em locais distintos no cromossomo, são sujeitos a influências regulatórias independentes (Aviv *et al*, 1994) e sua expressão aumenta na fase estacionária de crescimento (Magan *et al*, 2006). Apesar de comumente o IHF ser considerado um heterodímero, suas subunidades são capazes de formar homodímeros que também se ligam ao DNA (Werner *et al*, 1994). Em *S. enterica*, IHF controla a expressão do operon *pnt* (piridina nucleotídeo transidrogenase – enzima

importante na respiração celular) (Palacios & Escalante-Semerena, 2000) e dos genes *cysJIIH* (responsáveis pela redução da 3' fosfoadenosina 5' fosfosulfato em sulfeto) (Sirko *et al*, 1998). IHF pode também regular a expressão gênica pela modulação de um sítio de metilação na região regulatória do operon *carAB*, responsável pela síntese da enzima carbamoilfosfato sintetase que catalisa a formação de carbamoilfosfato, precursor da arginina e pirimidinas (Charlier *et al*, 1995). Além disso, IHF também estimula a expressão do gene *fis*, cujo produto é necessário para a inversão eficaz do fragmento *hin*, que controla a variação de fase das flagelinas FliC-FljB em *Salmonella* (Beach & Osuna, 1998). IHF também suprime o efeito inibitório da proteína H-NS neste mesmo sistema (Goshima *et al*, 1994). Portanto, a perda da expressão de IHF resulta em populações bacterianas que expressam exclusivamente *fliC* ou *fljB* por causa da redução da inversão do fragmento *hin*. Um mutante deficiente em *ihfA* expressa somente *fljB* e outro deficiente em *ihfB* expressa somente *fliC* (Mangan *et al*, 2006). Até o presente ainda não foi descrito o uso terapêutico destas linhagens no tratamento de tumores.

Na busca por uma vacina efetiva para a prevenção da salmonelose, foram construídas diferentes linhagens mutantes de *S. enterica*, contendo deleções em genes específicos que atenuaram a virulência (Galen *et al*, 2010; Guzman *et al*, 2006). Neste sentido, mutantes de *S. enterica* nulos para as subunidades α ou β de IHF (*Integration Host Factor*) foram construídos por nosso grupo (Mendes, 2008), utilizando-se o sistema de recombinação λ *Red* desenvolvido por Datsenko e Wanner (2000).

A proteína Fis (“*Factor for inversion simulation*”), assim como IHF, é uma Nap que é necessária para a expressão de genes da ilha de patogenicidade 2 (SPI-2). Um mutante

nulo para *fis* apresenta redução na expressão de genes da SPI-2 quando cultivado em meio LB até a fase estacionária (Lim *et al*, 2006). Fis influencia a transcrição de genes pela sua capacidade de preservar formas intermediárias superenoveladas de DNA, impedindo a alteração para topologias mais relaxadas ou mais negativamente superenoveladas (Travers *et al*, 2001).

Além disso, *fis* pode regular a expressão de genes de SPI-2 indiretamente, pois também influencia a expressão de outras proteínas regulatórias de SPI-2 como PhoP (Bijlsma & Groisman, 2005) e o fator de transcrição Hild, presente em SPI-1, que regula a ativação de SPI-2 (Bustamante *et al*, 2008). Resultados prévios de nosso grupo mostraram que mutantes nulos para *fis* de *S. enterica* são atenuados quanto à virulência em modelo murino (dados não publicados).

Objetivos

2. Objetivos

- Os objetivos deste projeto foram construir e avaliar a eficácia dos mutantes atenuados *ST662ΔihfA*, *ST662ΔihfB*, *ST662ΔihfAΔasd*, *ST662ΔmsbB* e *ST662Δfis* de *Salmonella enterica* Typhimurium na terapia antitumoral em modelos murinos.

Materiais e Métodos

3. Materiais e métodos

3.1 Meios de cultura, condições de cultivo e estocagem das linhagens

bacterianas

Os meios de cultura utilizados foram os meios LB, LB-Ágar, MacConkey, SS e SOC (Sambrook & Russell, 2001). Os antibióticos cloranfenicol e ampicilina, quando necessários, foram usados na concentração de 25µg/mL e 100µg/mL, respectivamente. As linhagens bacterianas foram estocadas a -80°C em LB com 20% de glicerol.

3.2 *Salmonella enterica* Typhimurium ST662

Todos os mutantes descritos neste projeto foram construídos na linhagem ST662 de *Salmonella enterica* Typhimurium. Esta linhagem é um isolado clínico cuja utilização foi aprovada pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, e teve sua infectividade e imunogenicidade em camundongos comprovada em estudos prévios. Além disso, a comparação do genoma de ST662 com o da linhagem padrão LT2 comprova que a linhagem ST662 representa de maneira abrangente a população de *S. enterica* Typhimurium (Figura 1).

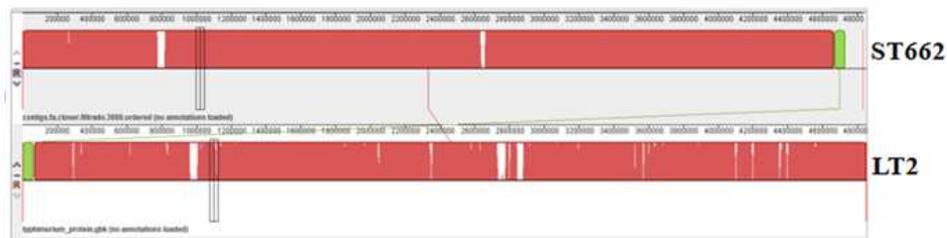


Figura 1: Comparação entre os genomas sequenciados da linhagem ST662 e da linhagem LT2 utilizando o programa Mauve (Aaron *et al*, 2010). Observa-se que há pouca diferença entre os dois genomas, indicando que a linhagem ST662 representa bem a população de *S. Typhimrium*. As partes em branco representam regiões do genoma presentes em um linhagem, mas ausentes na outra. Os genomas foram seqüenciados em colaboração com o grupo do Dr. Piotr Mieczkowski utilizando a plataforma Illumina na *Facility* de Sequenciamento da Universidade da Carolina do Norte (USA). As sequencias foram montadas por Leandro Costa do grupo do Prof. Dr. Gonçalo A. G. Pereira da Unicamp, utilizando o programa Velvet (Zerbino & Birney, 2008).

3.3 Cultivo das células tumorais

As linhagens celulares tumorais de camundongos melanoma B16-F10 e carcinoma 3LL estocadas a -80°C (em 90% de soro fetal bovino e 10% de DMSO) foram transferidas para garrafas de cultura de 270 mL contendo 13,5 mL de meio RPMI1640 (Gibco BRL) suplementado com 1,5 mL de soro fetal bovino (concentração final de 10%). As células foram incubadas em estufa de CO_2 a 5% e a 37°C . até a confluência celular (de 2 a 3 dias). Em seguida, foram lavadas com PBS (concentração final de NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM e pH 7.4) esterilizado e incubadas com 1mL de tripsina (Tripsina EDTA – Cultilab) até se desprenderem da garrafa. A tripsina foi inativada com 3 mL de SFB e as células foram transferidas para duas novas garrafas de 270 mL (1,5 mL em cada), contendo 13,5 mL de meio RPMI e cultivadas nas mesmas condições. Apenas uma passagem já é suficiente para a utilização das células na indução dos tumores *in vivo*, como descrito a

seguir. Todos os procedimentos envolvendo as culturas de células foram realizados no laboratório da Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos, no Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes do Instituto de Biologia da Unicamp.

3.4 Modelos animais de tumor

Os animais utilizados neste projeto foram obtidos do Centro de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB) e foram mantidos em gaiolas de policarbonato em racks ventilados (Alesco, Brasil) em condições livres de patógenos no Laboratório de Experimentação Animal do nosso Departamento, com ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os camundongos foram alimentados com ração comercial (Labina-Purina, Brasil) e água à vontade, ambos esterilizados por autoclavagem. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNICAMP, segundo as recomendações do “Canadian Council on Animal Care”.

Camundongos C57BL/6 com idade entre 6 e 8 semanas foram utilizados como modelo de crescimento tumoral e estudos de infecção com os mutantes ST662 Δ *ihfA*, ST662 Δ *ihfB*, ST662 Δ *ihfA* Δ *asd*, ST662 Δ *msbB* e ST662 Δ *fis* de *S. enterica* Typhimurium. As linhagens tumorais B16-F10 (“*murine melanoma cells*”) e 3LL (“*Lewis lung carcinoma*”), que se desenvolvem preferencialmente nesta linhagem de camundongos (motivo pelo qual não foram realizados experimentos em camundongos BALB/c, que também são mais suscetíveis à infecção por *S. enterica*) foram inoculadas subcutaneamente nos animais. Para a implantação do tumor, após tripsinização, as células foram lavadas com PBS (concentração final de NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM e pH 7.4) esterilizado (pH = 7,4), ressuspendidas em meio RPMI e centrifugadas por 15 minutos a 2000 rpm.

Após centrifugação, as células foram ressuspensas para se alcançar a concentração de 5×10^6 células/mL para as células B16-F10 e 1×10^7 células/mL para as células 3LL. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer com o corante Azul de Tripán. Os camundongos foram inoculados subcutaneamente com 50 μ L de cada suspensão (5×10^5 e 5×10^6 células das linhagens B16F10 e 3LL, respectivamente).

3.5 Construção dos mutantes $\Delta ihfA$, $\Delta ihfB$ e $\Delta msbB$

Para a obtenção dos mutantes de *Salmonella* nulos para os genes *ihfA*, *ihfB* e *msbB* foi utilizada a metodologia λ Red, desenvolvida por Datsenko e Wanner (2000). Resumidamente, esta metodologia envolve a transformação de linhagens selvagens de *S. enterica* com o plasmídeo pKD46, que expressa genes de recombinação do fago λ , a construção de cassetes de recombinação por PCR a partir do plasmídeo pKD3 contendo o gene de resistência ao cloranfenicol e a substituição dos genes *ihfA*, *ihfB*, *ihfA/asd* e *msbB* pelo de resistência por meio de recombinação homóloga.

As linhagens ST662 $\Delta ihfA$ e ST662 $\Delta ihfB$ foram construídas e caracterizadas quanto a atenuação da virulência anteriormente por Mendes (2008). No entanto, houve certa dificuldade em se resgatar os estoques originais destes mutantes. Assim, por segurança, foi necessária a reconstrução e caracterização destas linhagens, de modo que todos os experimentos neste projeto foram realizados com os mutantes recém-construídos, inclusive as linhagens ST662 $\Delta ihfA \Delta asd$ e ST662 $\Delta msbB$.

3.5.1 Introdução do plasmídeo pKD46 em *S. enterica* Typhimurium

A introdução do plasmídeo pKD46 na linhagem selvagem 662ST foi realizada por eletroporação, seguindo a metodologia de Ausubel e colaboradores (2003). Genes presentes

neste plasmídio, quando induzidos por arabinose, expressam três proteínas que auxiliam o processo de recombinação homóloga. Estes são os genes γ , β e *exo*. O gene γ expressa uma proteína que inibe exonucleases, permitindo que o cassete de recombinação linear (descrito posteriormente) não seja degradado quando for introduzido na bactéria. Os genes β e *exo*, por sua vez, expressam proteínas envolvidas diretamente na recombinação homóloga.

Para o preparo das células eletrocompetentes, a linhagem selvagem 662ST foi inoculada em 3 mL de meio LB e cultivada durante 18h a 37°C sob agitação de 150 rpm. No dia seguinte, 0,5 ml desta cultura foi transferido para 50 mL de meio LB fresco (inóculo na proporção de 1:100). Esta cultura foi incubada a 37°C sob agitação (150 rpm) até atingir a D.O.₆₀₀ de 0,7. Em seguida, foi resfriada em gelo por 20 minutos e centrifugada (10 minutos a 5000g a 4°C). As bactérias foram ressuspensas em 50 mL de água destilada esterilizada gelada (4°C) e centrifugadas novamente nas mesmas condições descritas anteriormente. A lavagem foi repetida por mais 3 vezes, desta vez com glicerol 10% gelado (diluído em água destilada) esterilizado, em volumes decrescentes (50mL, 25mL e 12,5mL, respectivamente). Por fim, as bactérias foram ressuspensas em 500 μ L de glicerol 10% gelado esterilizado (Sambrook & Russell, 2001) e armazenadas em alíquotas de 90 μ L. Para a eletroporação, foram adicionados ao tubo contendo as bactérias eletrocompetentes aproximadamente 20 ng do plasmídeo pKD46. A reação foi incubada em gelo por 5 minutos e transferida para uma cubeta esterilizada de 0,1 cm. Após a eletroporação (ajuste de 25 μ F, 1,5 KV e 200 ohms), as bactérias foram incubadas por 1 hora em meio SOC a 30°C e em seguida semeadas em meio LB ágar com ampicilina (100 μ g/mL). O plasmídeo pKD46 contém o gene de resistência a ampicilina e é termosensível, não podendo se replicar em temperaturas maiores que 30°C.

3.5.2 Amplificação do cassete de recombinação por PCR

O plasmídeo pKD3 possui uma região que expressa o gene de resistência ao cloranfenicol. Baseado nisto, foram desenhados iniciadores (tabela 1 - Mendes, 2008 e tabela 2) que contêm sequências que flanqueiam este gene, além de regiões homólogas aos genes de interesse *ihfA*, *ihfB* e *msbB*. Assim, os cassetes de recombinação linear amplificados por estes iniciadores são compostos por regiões homólogas aos genes de interesse flanqueando a sequência de resistência ao antibiótico. Os cassetes foram amplificados pela técnica de PCR. A reação continha 2 mM de MgCl₂, tampão fornecido pelo fabricante da polimerase, 20 μmol de cada iniciador, aproximadamente 20 ng do plasmídeo, 1mM de cada dNTP e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase. O termociclador (PTC-200 Peltier Thermal Cycler) foi programado para realizar 30 ciclos nas respectivas temperaturas e tempos: 94°C por 60 segundos, 56°C por 60 segundos e 72°C por 60 segundos. Após o término dos ciclos, foi programada uma extensão final de 72°C por 7 minutos. O produto da reação foi analisado em gel de agarose 1%.

Tabela 1- Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação do cassete de recombinação para a construção dos mutantes ST662Δ*ihfA* e ST662Δ*ihfB* .

Iniciador	Sequência
<i>ihfA</i> -f	5' - GCGCTTACAAAAGCTGAAATGTCAGAATATCTGTTTGATAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC - 3'
<i>ihfA</i> -r	5' - CGCAATACACCCTGATGGATGTTATGCCTGGATCTGATTACATATGAATATCCTCCTTAGTTC - 3'
<i>ihfB</i> -f	5' - CAGCCAATTTGCCTTTAAGGAACCGGAGGAATCATGACCAAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC - 3'
<i>ihfB</i> -r	5' - TTTTTCGGGTTCAAGTTTTGCGTTAAACTTAACCGTAAATCATATGAATATCCTCCTTAGTTC - 3'

Fonte: Mendes, 2008.

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação do cassete de recombinação para a construção do mutante ST662 Δ *msbB*.

Iniciador	Sequência
<i>msbB-f_P1</i>	5'-GGGTTTGTTCAGCATAAAGCCTCTTACGAGAGGCTTTATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
<i>msbB-r_P2</i>	5'-ATTCAACAATTCCTTTTCGCGTCAGCAGACCCTGGAAAAGCCATATGAATATCCTCCTTAGTT-3'

Fonte: este estudo.

3.5.3 Substituição dos genes *ihfA*, *ihfB* e *msbB* pelo cassete de recombinação linear

Nesta etapa, os cassetes de recombinação linear foram introduzidos na linhagem que contém o plasmídeo pKD46 após a indução da expressão dos genes γ , β e *exo*. Esta linhagem foi processada para eletrocompetência como descrito anteriormente, com apenas algumas modificações. Neste caso, foi necessária a adição de ampicilina (100 μ g/mL) em todos os meios de cultura e o acréscimo de 1mM de L-arabinose (Sigma) à cultura de 50mL para induzir a expressão de γ , β , e *exo*. Além disso, todas as incubações foram realizadas a 30°C. Após a eletroporação com aproximadamente 30 ng do cassete de recombinação, as bactérias foram incubadas em meio SOC por 1 hora e posteriormente semeadas em meio LB ágar, desta vez com cloranfenicol (25 μ g/mL). As placas foram incubadas por 18h a 37°C para a eliminação do plasmídeo pKD46 e seleção das colônias que sofreram a recombinação.

3.5.4 Confirmação das mutações utilizando os iniciadores de detecção

Além dos iniciadores utilizados para amplificação do cassete de recombinação, foram desenhados dois “iniciadores de detecção” para cada linhagem. A utilização dos iniciadores de detecção é muito interessante. Eles são planejados de tal forma que o mesmo

par de iniciadores consegue detectar o gene de interesse tanto no DNA da bactéria selvagem quanto no da bactéria mutante. Isto ocorre porque eles reconhecem regiões que flanqueiam o gene de interesse e que não são afetadas após sua substituição pelo gene de resistência ao cloranfenicol, que possui um tamanho aproximado de 1200 kb. Assim, a confirmação da mutação ocorre quando os mesmos iniciadores de detecção amplificam o gene selvagem ou a região originada após a recombinação homóloga. Os iniciadores de detecção mostrados na Tabela 3, foram os utilizados previamente por Mendes (2008). Já os iniciadores de detecção do gene *msbB* (Tabela 4) foram desenhados durante este trabalho.

Tabela 3 - Sequência dos iniciadores externos aos genes *ihfA* e *ihfB*.

Iniciador	Sequência
<i>IhfADT</i> – f	5'- TTGCGGAGGGTTATAAGAGC - 3'
<i>IhfADT</i> – r	5'- GCGTGATTTTACGGTGGGTA - 3'
<i>IhfBDT</i> – f	5'- GTTTCGGCCTGTAATCAAGC - 3'
<i>IhfBDT</i> – r	5'- TTTTCGGTCGAATAGCGTTT - 3'

Fonte: Mendes, 2008.

Tabela 4 - Sequência dos iniciadores externos ao gene *msbB*.

Iniciador	Sequência
<i>msbBDT</i> – f	5'- ACCGTCGGTTCAACCAATAC - 3'
<i>msbBDT</i> – r	5'- CAAGCCGTTAACCCTCTGAC - 3'

Fonte: este estudo.

3.5.5 Etapa de transdução com o bacteriófago P22

Dentro de uma grande população de bactérias é possível encontrar algumas que contêm uma camada de lipopolissacarídeos (LPS) incompleta. Estas são mais facilmente transformadas por eletroporação. Desta forma, após as etapas de eletroporação é possível que sejam selecionadas colônias que sofreram recombinação, mas cujo LPS é incompleto. Bactérias com LPS incompleto são mais suscetíveis à ação do sistema imune e menos imunogênicas. Para assegurar que as linhagens utilizadas nas experiências tenham LPS completo, foi realizada uma etapa de transdução com o bacteriófago P22. Assim, através do bacteriófago, o cassete de recombinação é transferido do genoma da bactéria transformada para o de uma linhagem selvagem que não foi eletroporada, gerando um mutante com LPS completo, uma vez que o fago depende do LPS para se ligar à bactéria. Além disso, o sistema λ Red pode ativar profagos ou recombinações secundárias na linhagem hospedeira. Desta forma, a transferência de uma marca de seleção por transdução diminui consideravelmente a possibilidade de seleção de clones contendo recombinações adicionais.

Para a transdução, as linhagens ST662 Δ *ihfA*, ST662 Δ *ihfB* e ST662 Δ *msbB* foram incubadas em 3 mL de meio LB suplementado com cloranfenicol (25 μ g/mL) por 18h. No dia seguinte, 0,03 mL de cada cultura foi transferido para 3 mL de um meio LB novo, também contendo cloranfenicol. Após 3 horas de crescimento a 37°C e 150 rpm, 10⁵ u.f.p. (unidades formadoras de placas) do bacteriófago P22 foram adicionadas à cultura, que foi incubada por 18h nas mesmas condições. No dia seguinte, a cultura foi centrifugada a 7000 rpm por 7 minutos e o sobrenadante foi recolhido e filtrado em membrana de 0,22 μ m. Em paralelo, a linhagem selvagem ST662 foi cultivada por 18h em 3 mL de meio LB a 37°C e

150 rpm. A transdução foi realizada pela incubação de 90 μ L da cultura contendo bactérias selvagens com 10 μ L da solução contendo partículas do fago P22 previamente incubadas com as linhagens ST662 Δ *ihfA*, ST662 Δ *ihfB* ou ST662 Δ *msbB*. Esta suspensão foi incubada em estufa a 37°C por 15 minutos para ligação do fago às bactérias e em seguida semeada em meio LB ágar com cloranfenicol para seleção dos mutantes transduzidos. A presença de bactérias mutantes nas colônias que cresceram foi confirmada com os iniciadores de detecção. Para o cultivo do mutante ST662 Δ *msbB* é necessária a utilização de um meio modificado, segundo Clairmont e colaboradores (2000). Para o preparo de 1 litro deste meio é preciso 10g de triptona, 5g de extrato de levedura, 2 mL de CaCl₂ 1N e 2 mL de MgSO₄ 1N, além do acréscimo de cloranfenicol na concentração descrita anteriormente.

3.6 Construção do duplo mutante ST662 Δ *asd* Δ *ihfA*

No sistema λ red, a introdução do plasmídio pCP20 em uma linhagem mutante que sofreu recombinação com o cassete amplificado a partir do plasmídio pKD3, é capaz de deletar o gene de resistência ao cloranfenicol, originando uma “cicatriz” no genoma bacteriano (Datsenko & Wanner, 2000). Nesta “cicatriz” não está presente nem o gene de interesse, nem o de resistência ao cloranfenicol. Isto possibilita a introdução de outro cassete de recombinação linear para gerar uma segunda mutação em outra região de interesse, conduzindo a construção de um duplo mutante. Assim, a linhagem ST662 Δ *asd* Δ *ihfA* foi construída pela transdução com fago P22 contendo fragmentos gênicos da linhagem ST662 Δ *ihfA* para a linhagem mutante ST662 Δ *asd* contendo a “cicatriz”, que foi produzida anteriormente no laboratório por Guilherme Payer Milanez.

Uma vez que o mutante é auxotrófico para o ácido diaminopimélico (DAP), os meios de cultura foram suplementados com 50 µg/ml de DAP.

3.7 O mutante ST662Δ*fis*

A única linhagem cujo efeito antitumoral foi testado e que não foi construída neste projeto foi a 662STΔ*fis*, desenvolvida anteriormente por Mendes e Gregoracci (dados não publicados). Esta linhagem também foi construída com a metodologia λ red e a linhagem ST662 foi transduzida pelo fago P22 contendo fragmentos do mutante 662STΔ*fis* obtido anteriormente por eletroporação.

3.8 Teste de persistência dos mutantes ST662Δ*ihfA* nos camundongos e análise da sobrevivência

Para investigar a distribuição das bactérias em diferentes órgãos, 10⁸ u.f.c. das linhagens ST662 e ST662Δ*ihfA* foram administrados por gavagem em fêmeas de C57BL/6 divididas em 2 grupos de 9 camundongos. Nos dias 3, 10 e 17 após a infecção, 3 camundongos de cada grupo foram sacrificados e seus fígados, placas de Peyer e baços foram coletados e macerados em PBS (concentração final de NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM e pH 7.4) gelado esterilizado. As contagens de bactérias foram realizadas após diluições seriadas e plaqueamento em meio LB (com cloranfenicol no caso da linhagem atenuada). Este teste não foi realizado com a linhagem ST662Δ*ihfB*, pois os dados obtidos com a linhagem ST662Δ*ihfA* em camundongos C57BL/6 foram semelhantes aos obtidos previamente por Mendes (2008), que testou a atenuação dessas duas linhagens em camundongos BALB/c.

3.9 Injeção subcutânea da linhagem ST662 Δ ihfA

Para avaliar a DL_{50} e a ocorrência de necrose tecidual no ponto de inoculação, o mutante ST662 Δ ihfA foi inoculado pela via subcutânea em camundongos C57BL/6, uma vez que os tratamentos foram realizados pela via intratumoral. Para este teste, 18 camundongos fêmeas C57BL/6 foram divididos em 6 grupos de 3 animais. As doses inoculadas variaram de 10^4 a 10^8 u.f.c. e o grupo controle foi inoculado com PBS (concentração final de NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM e pH 7.4) esterilizado.

3.10 Tratamento

Os tratamentos dos animais com as bactérias mutantes começaram quando os tumores alcançavam um volume de 50-60 mm³, aproximadamente 12 dias após o inóculo das linhagens tumorais. Foram realizados experimentos iniciais com administração oral e intravenosa da linhagem ST662 Δ ihfA para o tratamento dos tumores. No entanto, nenhuma das abordagens se mostrou eficaz para este mutante (dados não mostrados). Os melhores resultados foram obtidos com injeção intratumoral, descrita em outros trabalhos (Avogadri *et al*, 2008; Zhao *et al*, 2005).

Todas as linhagens mutantes atenuadas foram testadas no tratamento intratumoral. As bactérias foram cultivadas a 37 °C durante a noite em 3 mL meio LB com cloranfenicol. Em seguida, foram diluídas 1:10 em um novo meio, também com antibiótico, e cultivadas até atingir a $D.O_{600}$ de 0,7. Após este período, foram lavadas 2 vezes com PBS (concentração final de NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM e pH 7.4) estéril (centrifugações de 7 minutos a 7000 rpm) e ressuspensas no mesmo tampão. Um volume de 50 μ L contendo densidades celulares que variaram de 10^4 a 10^8 , dependendo da

linhagem testada, foi administrado intratumoralmente. O grupo controle foi composto por animais inoculados com 50 μ L de PBS (concentração final de NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM e pH 7.4).

Os tratamentos foram realizados da seguinte forma:

- Mutantes *ST662 Δ ihfA* e *ST662 Δ ihfB*: 25 camundongos C57BL/6 portadores de tumor foram divididos em grupos de 5 e receberam doses intratumorais que variaram de 10^4 a 10^8 u.f.c.
- Mutante *ST662 Δ ihfA Δ asd*: um grupo de 5 camundongos C57BL/6 portadores de tumor foi tratado com uma dose de 10^8 u.f.c.
- Mutante *ST662 Δ msbB*: um grupo de 5 camundongos C57BL/6 portadores de tumor foi tratado com uma dose de 10^8 u.f.c.
- Mutante *ST662 Δ fis*: 25 camundongos C57BL/6 portadores de tumor foram divididos em grupos de 5 e receberam doses intratumorais que variaram de 10^4 a 10^7 u.f.c.

3.11 Avaliação da atividade antitumoral

A atividade antitumoral foi avaliada pela inibição do crescimento do tumor e sobrevida dos camundongos. Antes e durante a análise do tratamento, os tumores foram medidos individualmente com paquímetro. Seus volumes foram determinados usando a seguinte fórmula: volume do tumor = comprimento x largura² x 0,52, de acordo com Jia e colaboradores (2007).

3.12 Análises histológicas

3.12.1 Processamento do material

As massas tumorais de 3LL tratada e não tratada foram processadas para microscopia de luz. Inicialmente, foram incubadas por 18h em paraformaldeído 4% diluído em PBS 0,1M pH 7,4. Em seguida as amostras foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com PBS 0,1M pH 7,4 e 3 vezes com água destilada. A desidratação foi realizada com incubação sequencial de 30 minutos em etanol 70%, 80%, 95% e 100% (neste último por 3 vezes). Após a desidratação as amostras foram diafanizadas com etanol-xilol, xilol I e xilol II, por 20 minutos cada. A inclusão foi realizada com incubação de 1 hora em xilol-parafina e 1 hora em parafina.

3.12.2 Coloração

Para a coloração dos cortes foram utilizados os corantes hematoxilina e eosina. Inicialmente, os cortes foram desparafinizados, com passagens de 10 minutos cada, no Xilol I, II e III. Em seguida, foram hidratados com incubações de 5 minutos em álcool 100%, 95%, 80%, 70% e água destilada, respectivamente. Para a coloração, foram incubados por 1 minuto na hematoxilina filtrada, lavados em água destilada e incubados por 7 minutos em eosina Y. Em seguida, foram desidratados em álcool 95% e 3 vezes em etanol 100% por 5 minutos cada. A montagem das lâminas foi realizada após incubações em álcool-xilol, xilol I e xilol II (5 minutos cada). Todos os procedimentos histológicos foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro, no Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da Unicamp.

3.13 Dosagem de transcritos para IL-12 e INF- γ

Foi realizado um experimento piloto de PCR em tempo real para a detecção de transcritos das citocinas IL-12 e INF- γ em camundongos inoculados com o tumor 3LL não tratados e tratados com 10^5 u.f.c. da linhagem ST662 $\Delta ihfA$. Foram coletados o baço e os linfonodos de dois animais tratados e de dois não tratados em dois períodos: 24 horas após o tratamento e 7 dias após o tratamento (dos animais que sobreviveram).

3.13.1 Extração de RNA total

Para a extração do RNA total, os órgãos coletados foram macerados e incubados com 500 μ L de Trizol por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio, a solução foi agitada em vórtex por 15 segundos e incubada em gelo por 15 minutos. Após esta incubação, o sistema foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa, contendo RNA, foi retirada, incubada com 500 μ L de isopropanol, agitada no vórtex por 15 segundos e centrifugada a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuscitado em 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugado nas mesmas condições anteriores. Ao sedimento foi adicionado 10 μ L de água DEPC para solubilização do RNA.

3.13.2 Síntese do cDNA

Para a síntese do cDNA, foram utilizados os reagentes e o protocolo do kit “High-capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems).

3.13.3 PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR)

Para a reação de PCR em tempo real quantitativo, foram utilizados os reagentes do kit “TaqMan Universal PCR Master MIX” (Applied Biosystems). A análise das reações foi realizada no “Taqman ABI Prism 7500 Sequence Detector” (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Os iniciadores utilizados nesta análise foram os da enzima constitutiva GAPDH (Applied Biosystems, ref. Mm99999915_g1) da interleucina 12 (Applied Biosystems, ref. Mm00434189_m1) e do interferon- γ (Applied Biosystems, ref. Mm01168134_m1). Os dados foram obtidos pela medição de duplicatas independentes de cada amostra. O valor do limiar (“*threshold cycle value*”) de cada medição não ultrapassou 0.5 ciclos de amplificação.

Resultados

4. Resultados

4.1 Construção dos mutantes ST662 Δ *ihfA* e ST662 Δ *ihfB*

Os mutantes ST662 Δ *ihfA* e ST662 Δ *ihfB* foram obtidos com sucesso. Na figura 2 observa-se a detecção da mutação com os iniciadores de detecção, descritos na Tabela 2.

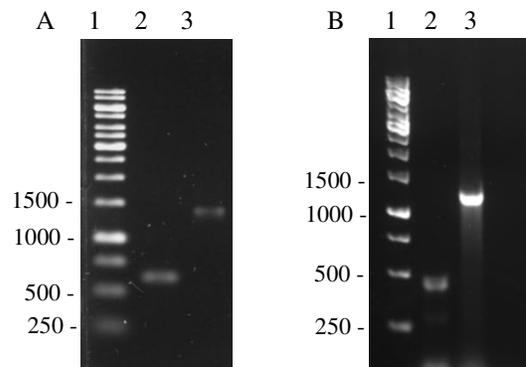


Figura 2: Confirmação da obtenção de mutantes de *S. enterica* nulos para os genes *ihfA* e *ihfB* utilizando o sistema de recombinação homóloga λ red; (A) 1: marcador de massa molecular 1 kb; 2: detecção do gene *ihfA* na bactéria selvagem; 3: detecção da substituição do gene *ihfA* pelo de resistência a antibiótico. Ambas reações de PCR foram realizadas com o mesmo par de iniciadores de detecção. (B) 1: marcador molecular 1 kb; 2: detecção do gene *ihfB* na bactéria selvagem; 3: detecção da substituição do gene *ihfB* pelo de resistência a antibiótico. Ambas reações de PCR foram realizadas com o mesmo par de iniciadores de detecção.

4.2 Teste de persistência do mutante ST662 Δ *ihfA* nos camundongos e análise da sobrevivência

Neste teste é avaliada a capacidade e a quantidade de bactérias que colonizam diferentes órgãos, como baço e placas de Peyer, além do tempo que a colonização persiste. O teste de persistência (Figuras 3) mostrou que a bactéria não causa nenhum sintoma de

doença nos camundongos, mesmo em densidades celulares elevadas quando administradas por via oral, e em aproximadamente 17 dias é eliminada de seu organismo. Deste modo, foi verificada a atenuação da virulência por essa via.

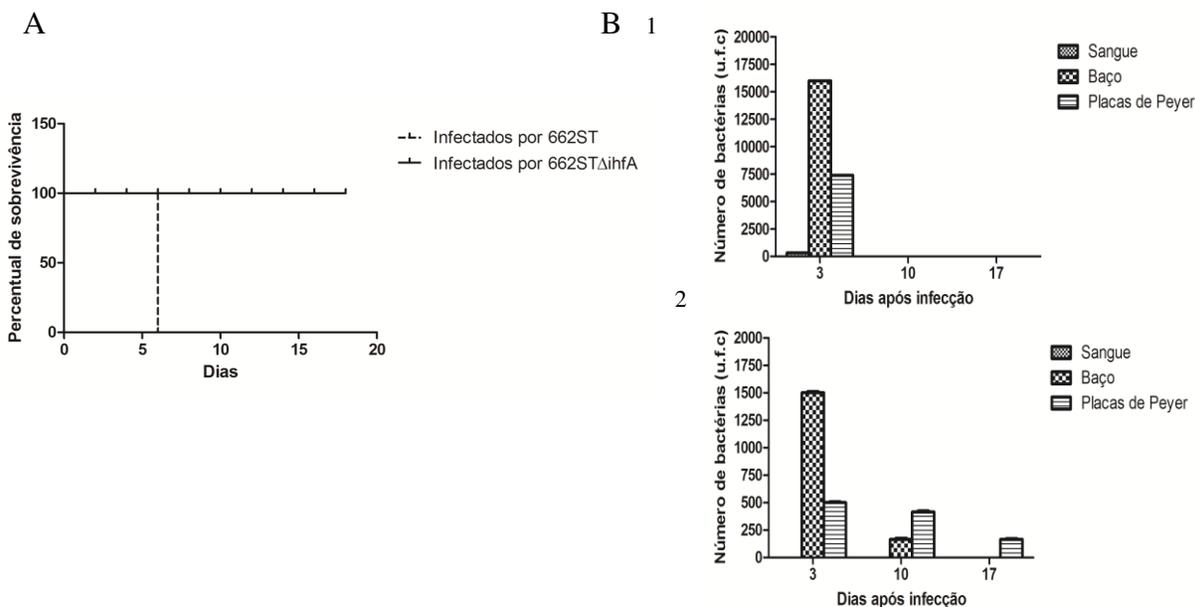


Figura 3: Testes de sobrevivência de camundongos após infecção com o mutante ST662 Δ ihfA em camundongos C57BL/6 e análise da persistência desta linhagem em seu organismo. Cerca de 10^8 u.f.c. da bactéria selvagem e mutante foram inoculados por gavagem e após o 3^o, 10^o e 17^o dias, os animais foram sacrificados e seus baços, placas de Peyer e sangue foram coletados para contagem de colônias. Nota-se em “A” que todos os camundongos inoculados com a bactéria selvagem morrem no 6^o dia após a infecção, impedindo o acompanhamento da persistência destas bactérias em seu organismo. B(1) Média do número de u.f.c. de bactérias selvagens ST662 encontradas no sangue, baço e placas de Peyer de 3 animais no 3^o dia após a infecção. No 6^o dia, todos os outros animais do grupo morreram. B(2) Média do número de bactérias atenuadas ST662 Δ ihfA encontradas no 3^o, 10^o e 17^o após a infecção.

4.3 Avaliação da atividade antitumoral da linhagem ST662 Δ ihfA

Os tratamentos realizados com injeção intravenosa e por gavagem da linhagem atenuada surtiram pouco efeito, uma vez que as massas tumorais continuaram a crescer ao longo do tempo (dados não mostrados). O primeiro tratamento intratumoral, por sua vez, mostrou-se bastante promissor: 10^8 u.f.c. do mutante ST662 Δ ihfA concentrado em 50 μ L foram injetadas diretamente no tumor e em menos de 24 horas o tumor B16F10 desapareceu completamente (figura 4), enquanto a massa do tumor 3LL diminuiu consideravelmente e adquiriu um aspecto necrosado (figura 5).



Figura 4: Avaliação da atividade antitumoral da linhagem ST662 Δ ihfA em camundongos portadores do melanoma B16F10. (A) Camundongo do grupo controle com o tumor B16F10 não tratado. (B) Camundongo tratado com 10^8 u.f.c. do mutante ST662 Δ ihfA. (C, D e E) Comparação entre os camundongos tratado (E) e não tratado (D).

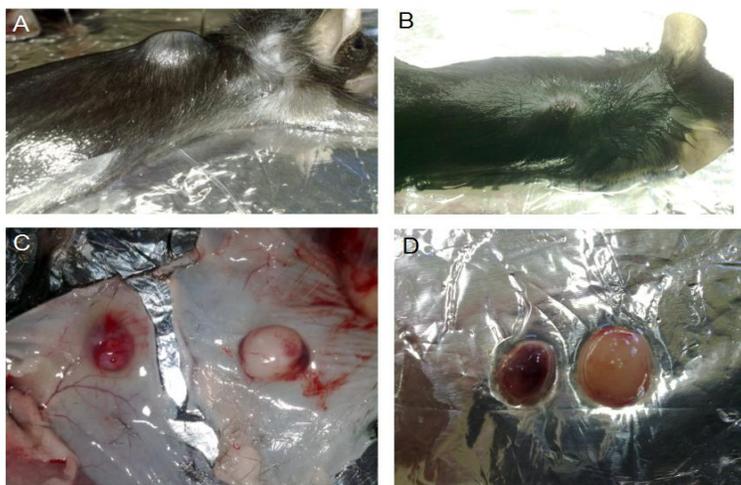


Figura 5: Avaliação da atividade antitumoral da linhagem ST662 Δ ihfA em camundongos portadores do carcinoma 3LL. (A) Camundongo do grupo controle com o tumor 3LL não tratado. (B) Camundongo tratado com 10^8 u.f.c. do mutante ST662 Δ ihfA. (C e D) Comparação entre o camundongo tratado (esquerda) e não tratado (direita).

No entanto, os camundongos estavam em estado de choque, prestes a morrer. Isto provavelmente se deve a uma forte reação imunológica associada à síndrome da lise tumoral, que é causada pela destruição massiva de células tumorais. A rápida liberação do conteúdo intracelular causa hiperuricemia, hipercalemia, hiperfosfatemia e hipercalcemia. Estas anormalidades metabólicas podem causar disritmia cardíaca, lesão aguda do fígado, edema pulmonar e mesmo levar à morte (Abu-Alfa & Younes, 2010). Quando tratados com doses menores, como 10^5 e 10^4 u.f.c., os resultados foram mais satisfatórios. As massas tumorais regrediram e “secaram” (figuras 6 e 7) e a sobrevivência dos camundongos foi maior. No entanto, ao longo do tempo, a porcentagem de morte observada nestes grupos foi em torno de 60%. Nos grupos controles, quando a massa tumoral atingia um volume aproximado de 500 mm^3 os animais que continuavam vivos eram sacrificados, para evitar mais sofrimento, uma vez que o tamanho do tumor era exagerado (figura 8).

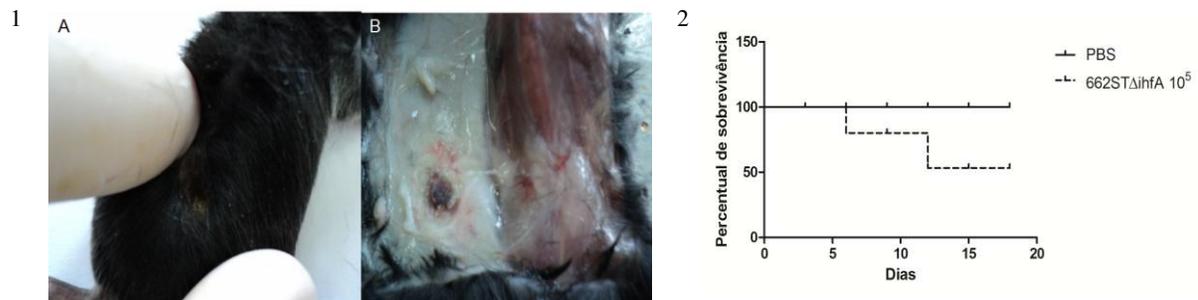


Figura 6: Avaliação da atividade antitumoral da linhagem ST662Δ*ihfA* em camundongos portadores do carcinoma 3LL. (1) Camundongo com o tumor 3LL no 4^o dia após o tratamento com 10⁵ u.f.c. do mutante ST662Δ*ihfA*. Observa-se que o tumor “seca” e se forma uma casca em seu lugar (1A). Após a dissecação do camundongo, nota-se a massa tumoral endurecida e com aspecto necrosado (1B). Antes de ser sacrificado, o animal apresentava aspecto saudável, sem sintomas de choque ou doença. (2) Gráfico de sobrevivência do grupo tratado com 10⁵ u.f.c. do mutante ST662Δ*ihfA*.

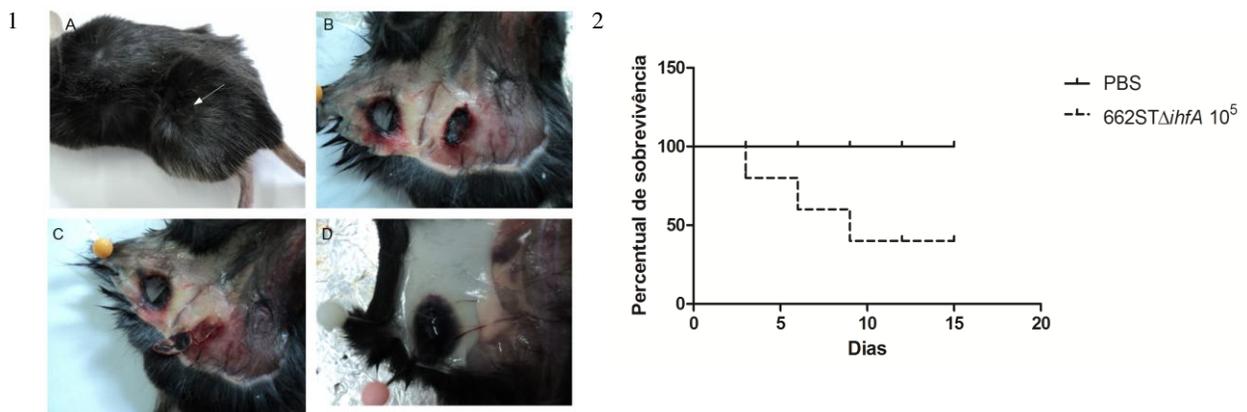


Figura 7: Avaliação da atividade antitumoral da linhagem ST662Δ*ihfA* em camundongos portadores do melanoma B16F10. (1) Camundongo com o tumor B16F10 no 5^o dia após o tratamento com 10⁵ u.f.c. do mutante ST662Δ*ihfA*. Observa-se que o tumor “seca” e se forma uma casca em seu lugar (1A - seta). Após a dissecação do camundongo, nota-se a massa tumoral endurecida e com aspecto necrosado (1B). Em 1C, a casca foi retirada, não deixando nenhum vestígio do tumor. Em 1D, observa-se a massa tumoral de um animal controle. (2) Gráfico de sobrevivência do grupo tratado com 10⁵ u.f.c. do mutante ST662Δ*ihfA*.

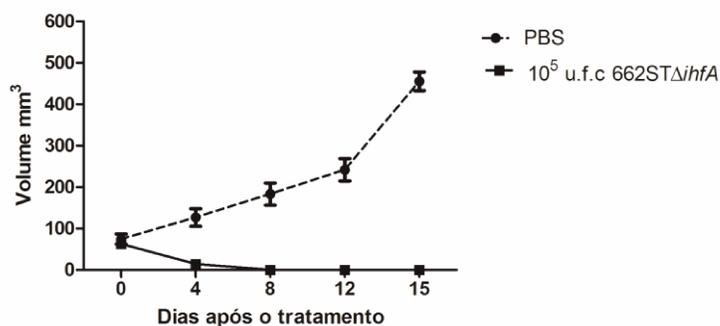


Figura 8: Comparação entre os volumes do tumor B16F10 tratado e não tratado. 4 dias após o tratamento já não é mais possível medir a massa tumoral, uma vez que ela foi substituída por uma “cicatriz”.

No período de 3 semanas após o tratamento com 10^5 do mutante ST662ΔihfA, a massa tumoral de B16F10 dos camundongos que sobreviveram desapareceu completamente, restando apenas tecido fibroso/colagenoso em seu lugar (figura 9). No entanto, após a dissecação dos camundongos, observam-se possíveis pontos de metástase na derme (figura 9).

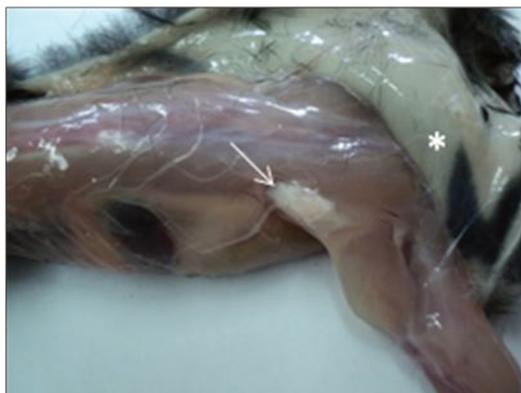


Figura 9: Avaliação da atividade antitumoral da linhagem ST662ΔihfA em camundongo portador do melanoma B16F10. Camundongo dissecado 3 semanas após o tratamento com 10^5 u.f.c de ST662ΔihfA. Observa-se que a massa tumoral tratada desapareceu completamente, restando apenas tecido fibroso (seta). No entanto, surgiram pontos possivelmente de metástase em sua pele (asterisco).

4.4 Injeção subcutânea da linhagem ST662 Δ ihfA

O resultado da avaliação da LD₅₀ da linhagem ST662 Δ ihfA pela via subcutânea foi o de que todos os camundongos dos grupos inoculados com 10⁷ e 10⁸ u.f.c. morreram após 4 dias, enquanto os que foram inoculados com as doses de 10⁴, 10⁵ e 10⁶ u.f.c. sobreviveram sem nenhum sintoma de doença (ou necrose tecidual) tanto quanto camundongos saudáveis. Este resultado indica que a morte dos camundongos tratados intratumoralmente com doses variando entre 10⁴ e 10⁶ não se deve à infecção pela bactéria atenuada, mas sim a mecanismos de resposta imune aos tumores infectados e possivelmente à síndrome da lise tumoral.

4.5 Microscopia de luz

Como mostrado na figura 10, após o tratamento do tumor 3LL com 10⁶ u.f.c. da linhagem ST662 Δ ihfA observam-se pontos de hemorragia e inúmeras células em processo de morte celular em áreas próximas. A forte hemorragia é provavelmente causada pela produção de inúmeras citocinas pró-inflamatórias, em resposta a infecção bacteriana, principalmente TNF- α (Leschner *et al*, 2009).

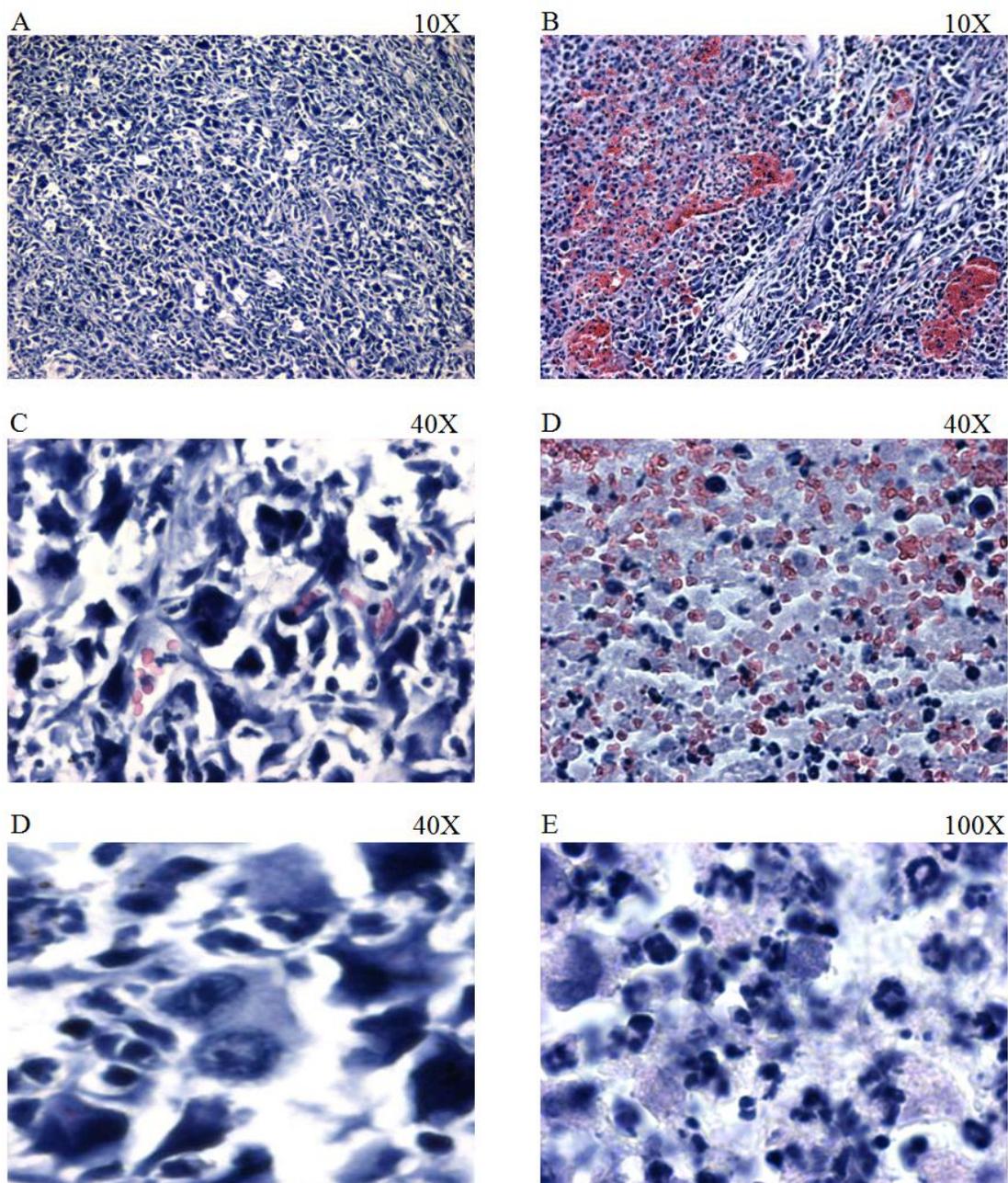


Figura 10: Microscopia de luz do tumor 3LL. A, C e D: Tumor não tratado. B, D e E: Tumor tratado com 10^5 u.f.c. do mutante *ST662ΔihfA*. No tratado observam-se pontos hemorrágicos (B) e células em fase de morte celular (D e E), enquanto os vasos do tumor não tratado encontram-se íntegros (C) e suas células estão em divisão (D).

4.6 PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR)

A expressão do IFN- γ tanto no baço quanto nos linfonodos dos animais tratados aumentou (Figura 11) em relação aos não tratados e continuou alta até sete dias após o inóculo.

A análise do resultado do PCR em tempo real com os iniciadores para detecção da expressão de IL-12 foi inconclusiva, pois uma das duplicatas de cDNA de linfonodo não pôde ser lida por algum problema na amostra.

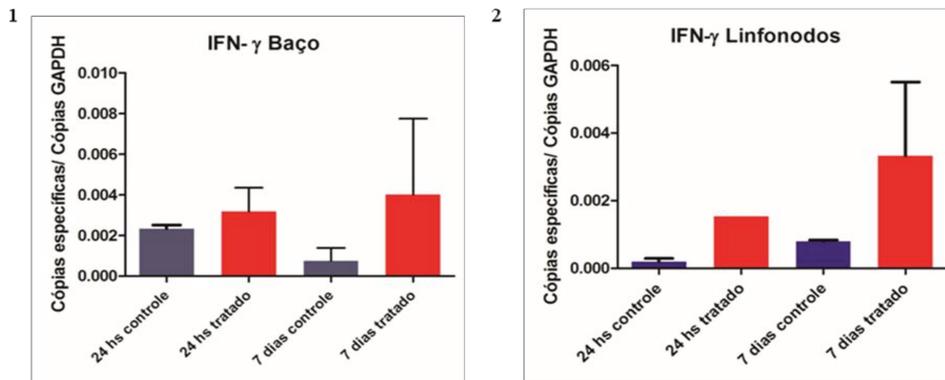


Figura 11: Gráficos mostrando a expressão de IFN- γ no baço (1) e linfonodos (2) de camundongos não tratados e tratados com 10^5 u.f.c. da linhagem ST662 $\Delta ihfA$. Observa-se um aumento na expressão gênica da interleucina IFN- γ no baço (1) e nos linfonodos (2) após o tratamento com a bactéria mutante.

4.7 Avaliação da atividade antitumoral da linhagem ST662 $\Delta ihfB$

O efeito antitumoral da linhagem ST662 $\Delta ihfB$ foi semelhante ao da linhagem ST662 $\Delta ihfA$. Foram realizados tratamentos intratumorais com diferentes doses, variando de 10^4 a 10^7 u.f.c. Ao longo do tempo, todos os camundongos dos grupos tratados com 10^5 ,

10^6 e 10^7 u.f.c. morreram, apesar da significativa redução da massa tumoral (Figura 12). O único camundongo que sobreviveu no grupo tratado com 10^4 ficou completamente curado; sua massa tumoral desapareceu totalmente e ele permaneceu vivo por várias semanas (Figura 13). É importante comentar que, no caso dos tumores tratados com 10^6 e 10^7 u.f.c. da linhagem *ST662 Δ ihfB* foi observada uma grande hemorragia na área tumoral (Figura 12), o que não tinha sido visto nos tratamentos com a linhagem *ST662 Δ ihfA*.

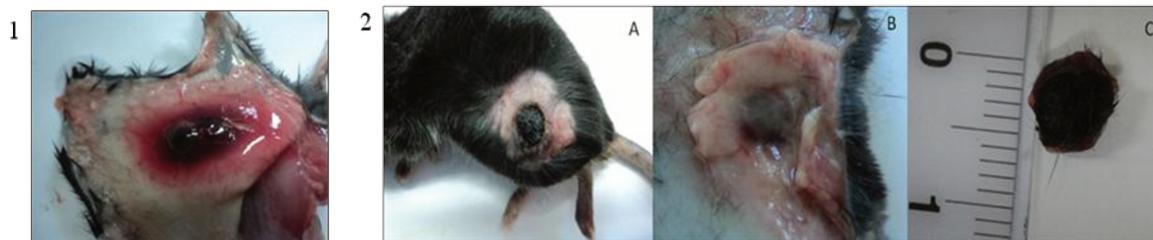


Figura 12: Avaliação da atividade antitumoral da linhagem *ST662 Δ ihfA* em camundongos portadores do melanoma B16F10. (1) Camundongo com o tumor B16F10 tratado com 10^7 u.f.c. do mutante *ST662 Δ ihfB*. Observa-se uma grande hemorragia na área tumoral, o que não tinha sido visto nos tratamentos com a linhagem *ST662 Δ ihfA*. (2) Camundongo tratado com 10^5 u.f.c. da linhagem *ST662 Δ ihfB*. Após a dissecação do camundongo, nota-se a massa tumoral endurecida e com aspecto necrosado.



Figura 13: Avaliação da atividade antitumoral da linhagem *ST662 Δ ihfA* em camundongo portador do melanoma B16F10. Camundongo com o melanoma B16F10 tratado com injeção intratumoral de 10^4 u.f.c. da linhagem atenuada *ST662 Δ ihfB*. A: 12 dias após tratamento; B: 18 dias após tratamento; C: 21 dias após tratamento.

Após inúmeras experiências, foi observado que ambas linhagens ST662 Δ *ihfA* e ST662 Δ *ihfB* apresentam grande potencial antitumoral. No entanto, dependendo da concentração utilizada, nem todos os animais do grupo com tumor sobrevivem após o tratamento, apesar dos mutantes terem apresentado virulência atenuada quando administrados em altas doses via oral em camundongos saudáveis. Assim, a partir destes resultados, o projeto tomou um novo rumo. Os esforços foram voltados para o desenvolvimento e testes de outros mutantes de *S. enterica* Typhimurium com o objetivo de se buscar linhagens menos reatogênicas.

4.8 Construção e avaliação da atividade antitumoral do duplo mutante

ST662 Δ *asd* Δ *ihfA*

Foi construída uma linhagem ainda mais atenuada, o mutante ST662 Δ *asd* Δ *ihfA*, na esperança de se otimizar o tratamento. O gene *asd* é um dos responsáveis pela via de síntese do ácido diaminopimélico (DAP), componente importante da parede celular de *Salmonella*. Deste modo, na ausência de DAP, mutantes *asd* sofrem lise após poucos ciclos de replicação.

A construção da linhagem ST662 Δ *asd* Δ *ihfA* está mostrada na Figura 14. Esta linhagem é ainda mais atenuada que ST662 Δ *ihfA*, uma vez que é auxotrófica para o ácido diaminopimélico (DAP). Por não sobreviver por mais de alguns ciclos replicativos, a hipótese levantada foi a de que lançando mão deste mutante os problemas de mortalidade seriam superados, enquanto a massa tumoral seria reduzida com a mesma eficácia que ocorre quando tratada com as linhagens ST662 Δ *ihfA* e ST662 Δ *ihfB*. De fato, nenhum animal saudável inoculado via oral com o mutante auxotrófico morreu ou sequer apresentou

sintomas de doença (dados não mostrados). Além disso, quando injetado diretamente no tumor, este mutante não provocou a morte de nenhum camundongo, mesmo em doses altas como 10^7 u.f.c. No tratamento intratumoral com 10^7 u.f.c deste mutante, houve certa inibição do crescimento tumoral em relação ao grupo controle (dado não mostrado), mas, ao longo do tempo, mesmo os tumores dos camundongos tratados continuavam a crescer bastante. Deste modo, mesmo com doses elevadas, o duplo mutante ST662 Δ *asd* Δ *ihfA* não apresentou o mesmo efeito das linhagens ST662 Δ *ihfA* e ST662 Δ *ihfB*. Assim, é provável que a atividade antitumoral de *S. enterica* dependa de sua multiplicação no interior do tumor, já que o duplo mutante não se replica por mais de um ciclo. O fato positivo foi que nenhum camundongo do grupo tratado morreu devido ao tratamento; os camundongos foram sacrificados somente quando os tumores atingiram um volume acima de 500 mm³.

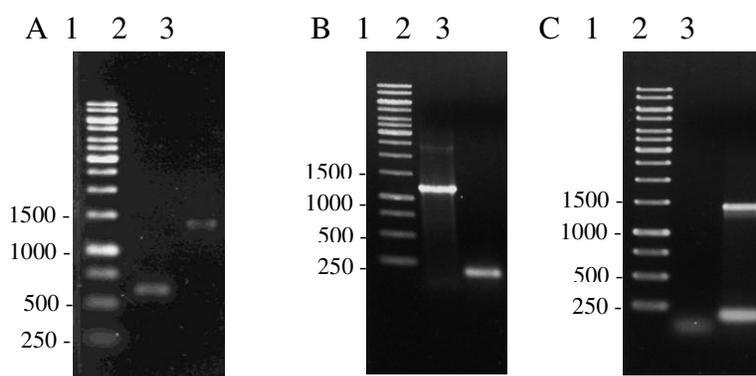


Figura 14: Construção do duplo mutante Δ *asd* e Δ *ihfA*. (A) Sistema de recombinação homóloga λ . 1: marcador molecular 1 kb; 2: detecção do gene *ihfA* na bactéria selvagem; 3: detecção da substituição do gene *ihfA* pelo de resistência a antibiótico. Ambas reações de PCR foram realizadas com o mesmo par de iniciadores; (B): ``Cicatrização`` do gene *Asd* pelo uso do plasmídeo pCP20. 1: marcador molecular 1 kb; 2: tamanho original do gene *asd* amplificado por PCR; 3: tamanho do fragmento do gene *asd* cicatrizado; (C): Confirmação da criação de um mutante para os genes *asd* e *ihfA* por multiplex PCR. 1: marcador molecular 1 Kb; 2: branco da reação; 3: multiplex PCR com os primers *ihfADT* e *asdDT*.

4.9 Construção e avaliação da atividade antitumoral do mutante ST662 Δ *msbB*

Acredita-se que o que levou boa parte dos camundongos tratados com as linhagens ST662 Δ *ihfA* e ST662 Δ *ihfB* à morte foi a sua capacidade de ainda induzir grande produção de TNF- α , o que culmina no choque séptico. Isto ocorre porque as mutações nos genes *ihfA* e *ihfB* não influenciam a síntese do lipopolissacarídeo da bactéria, responsável pela atividade endotóxica. Uma alternativa ao tratamento seria a construção do duplo mutante 662ST Δ *ihfA* Δ *msbB*. O gene *msbB* é responsável pela adição de um grupo mirístico terminal ao lipídio A, componente glicolipídico do lipopolissacarídeo que estimula a produção de TNF- α e, conseqüentemente, a cascata de eventos que leva ao choque séptico. Assim, a deleção do gene *msbB* diminui a capacidade das bactérias de induzir a produção de TNF- α e de causar o choque séptico (Clairmont *et al*, 2000; Rosenberg *et al*, 2002; Toso *et al*, 2002). No entanto, a construção do duplo mutante 662ST Δ *ihfA* Δ *msbB* não foi possível. Assim, foi construído e testado somente o mutante 662ST Δ *msbB*.

O mutante ST662 Δ *msbB* foi obtido com sucesso, seguindo-se todas as etapas do sistema de recombinação λ red, inclusive a transdução com o fago P22 (a Figura 15 mostra a confirmação da mutação).

Como descrito anteriormente, devido à alta taxa de mortalidade observada no tratamento de camundongos com as linhagens ST662 Δ *ihfA* e ST662 Δ *ihfB* e à falta de resposta antitumoral do duplo mutante ST662 Δ *asd* Δ *ihfA*, partiu-se para a construção do mutante ST662 Δ *msbB*, com o objetivo de se obter uma linhagem mais atenuada que pudesse eliminar o tumor sem causar mortalidade. O tratamento inicial com esta linhagem foi feito com uma dose de 10^7 u.f.c. em um grupo de 5 animais com o tumor B16F10. Se a mesma dose fosse utilizada no tratamento com os mutantes ST662 Δ *ihfA* e ST662 Δ *ihfB*, por

exemplo, as massas tumorais desapareceriam completamente, mas os camundongos também morreriam. No caso da linhagem ST662 Δ *msbB*, nem mesmo esta alta dose surtiu efeito no retardo ou eliminação da massa tumoral. Além disso, 10 dias após o tratamento, todos os camundongos deste grupo morreram (Figura 16). Desta forma, não foram realizados novos experimentos com esta linhagem, já que por algum motivo esta mutação gerou um fenótipo que não induz a regressão tumoral e ainda causa grande mortalidade nos camundongos.

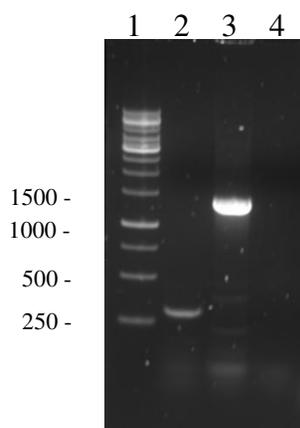


Figura 15: Construção do mutante 662ST Δ *msbB* com o sistema de recombinação homóloga λ red. 1: marcador molecular 1 kb; 2: detecção do gene *msbB* na bactéria selvagem; 3: detecção da substituição do gene *msbB* pelo de resistência a antibiótico; 4: branco da reação. Ambas reações de PCR foram realizadas com o mesmo par de iniciadores de detecção.

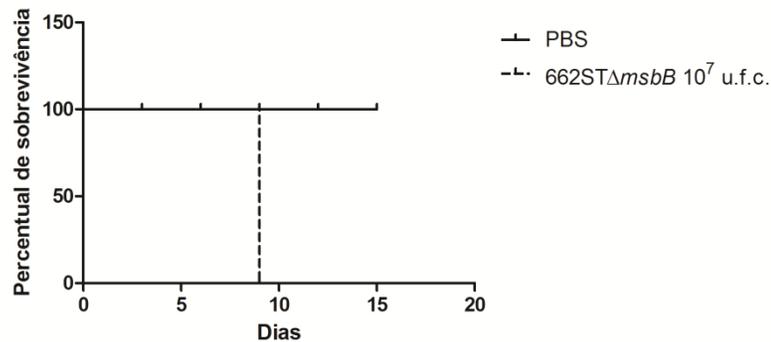


Figura 16: Gráfico de sobrevivência dos animais tratados com 10^7 u.f.c. do mutante 662STΔmsbB. Nota-se que no 9º dia após o tratamento, todos os camundongos do grupo morreram.

4.10 Avaliação da atividade antitumoral da linhagem ST662Δfis

O mutante ST662Δfis representou mais uma tentativa de se encontrar uma linhagem atenuada que induzisse a regressão tumoral e que ao mesmo tempo não causasse nenhum efeito colateral. Neste experimento, todos os camundongos, mesmo os que foram tratados com a dose de 10^4 u.f.c., morreram 6 dias após o tratamento. No entanto, foi possível observar a regressão do tumor em grande parte dos animais (Figura 17).

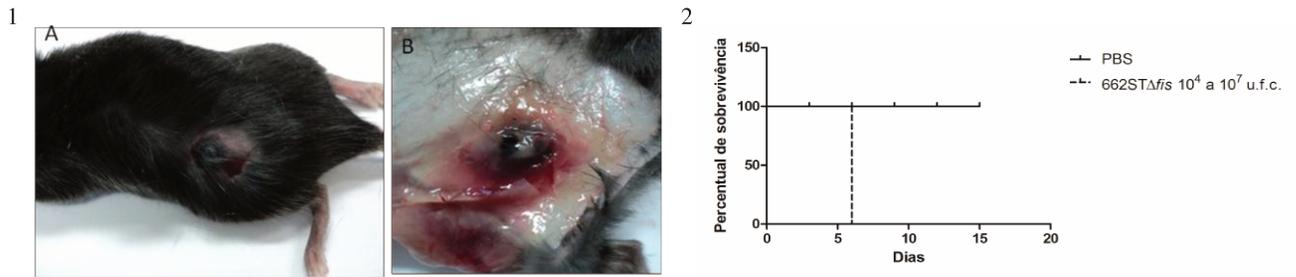


Figura 17: Avaliação da atividade antitumoral da linhagem ST662Δ*ihfA* em camundongo portador do melanoma B16F10. (1) Camundongo com o tumor B16F10 no 3^o dia após o tratamento com 10⁷ u.f.c. do mutante ST662Δ*fis*. Observa-se que o tumor apresenta aspecto necrosado e grande hemorragia (1A e 1B). No entanto, no gráfico se sobrevivência dos animais (2) tratados com doses que variavam de 10⁴ a 10⁷ u.f.c. do mutante 662STΔ*fis*, nota-se que no 6^o dia após o tratamento, todos os camundongos, independentemente da dose, morreram.

Discussão

5. Discussão

O potencial de se tratar tumores com o uso de bactérias geneticamente modificadas vem sendo muito estudado pela comunidade científica. No Brasil, ainda é um tema que vem sendo pouco abordado. Deste modo, este trabalho foi baseado na avaliação do efeito terapêutico de inúmeras linhagens atenuadas de *S. enterica* Typhimrium desenvolvidas por nosso grupo.

Esta linha de pesquisa é nova para o Prof. Dr. Marcelo Brocchi, que aceitou o desafio de orientar este projeto pioneiro. Foram construídos e testados inúmeros mutantes de *S. enterica* no tratamento de tumores e cada experimento permitiu um novo aprendizado teórico-prático sobre o tema. Em seguida, são discutidos os resultados obtidos com cada linhagem e as conclusões que puderam ser tiradas após esta experiência inovadora.

Inicialmente, pode-se concluir que o volume da massa tumoral no início do tratamento é importante para que o mesmo tenha efeito. Este fato é suportado por Crull e colaboradores (2011), que chegaram à mesma conclusão em seus experimentos. Caso seja igual ou maior do que 100mm³, nenhum tratamento foi capaz de interromper seu crescimento. Há uma redução inicial no seu desenvolvimento, mas dentro de alguns dias a massa volta a aumentar, mesmo com a administração de uma segunda dose (dado não mostrado).

Os mutantes ST662 Δ *ihfA* e ST662 Δ *ihfB* são vítimas do próprio sucesso, já que apesar de eliminar eficazmente a massa tumoral e manter a sobrevivência dos camundongos em alguns casos, seu forte efeito antitumoral tem levado parte dos camundongos à morte. Acredita-se que existe uma associação entre o choque séptico e a síndrome da lise tumoral na morte dos animais. Citocinas como TNF- α , IL1 β , IL6, IL12, IFN- γ , fator ativador de

plaquetas e quimiocinas são produzidas em resposta ao LPS e estão associadas à patogênese do choque endotóxico, caracterizado por bacteremia, hipóxia, hipoperfusão, coagulação intravascular disseminada e falência múltipla dos órgãos (Van Amersfoort *et al*, 2003). Além disso, a rápida e massiva destruição das células tumorais causa a liberação do conteúdo intracelular na corrente sanguínea, causando hiperuricemia, hipercalcemia, hiperfosfatemia e hipercalcemia. Estas anormalidades metabólicas podem causar disritmia cardíaca, lesão aguda do fígado, edema pulmonar e mesmo levar à morte (Abu-Afa & Younes, 2010). Apesar de os camundongos serem isogênicos e a mesma quantidade de células tumorais foram injetadas em posições similares em cada camundongo, há fatores que variam de indivíduo para indivíduo. O fato de alguns camundongos terem sobrevivido ao tratamento e sua massa tumoral ter desaparecido evidencia que houve fatores intrínsecos aos camundongos e às linhagens tumorais que possibilitaram sua sobrevivência. Microambiente tumoral, maior ou menor irrigação do tumor, volume tumoral, etc., podem ter sido fatores determinantes na melhora de uma parte dos camundongos em detrimento de outra.

Apesar de a massa tumoral de B16F10 desaparecer completamente em 3 semanas após o tratamento com ST662 Δ *ihfA*, observam-se indícios de metástase na pele dos camundongos. Estes dados sugerem que tratamento conjunto com drogas antitumorais e/ou irradiação do tumor podem ser necessário para a eliminação total de células malignas e a cura do animal.

Com o experimento utilizando o duplo mutante ST662 Δ *asd* Δ *ihfA*, pode-se indicar que a multiplicação da bactéria no interior do tumor é provavelmente um fator inerente à ação antitumoral de *S. enterica*, uma vez que o efeito deste mutante não foi satisfatório em

comparação com os mutantes ST662 Δ *ihfA* e ST662 Δ *ihfB*. O mutante para o gene *asd* não se multiplica por mais de poucos ciclos, uma vez que é auxotrófico para o ácido diaminopimélico, importante na síntese da parede celular. O tratamento dos tumores com esta linhagem não desacelerou o crescimento da massa tumoral. No entanto, o fato positivo foi que nenhum camundongo morreu após a injeção intratumoral deste mutante, mesmo com a administração de uma alta dose de 10^7 u.f.c. Como este mutante não se multiplica em ausência de DAP como os outros, a densidade de bactérias no organismo não aumenta significativamente, e o risco de causar choque séptico diminui bastante, uma vez que a rápida multiplicação de outras linhagens no organismo induz cada vez mais a produção de TNF- α . Assim, este resultado pode indicar duas possibilidades: que a multiplicação das bactérias no interior do tumor pode ser necessária para a eficácia de sua ação antitumoral e que o duplo mutante ST662 Δ *asd* Δ *ihfA* poderia ser utilizado como um carreador seguro de moléculas terapêuticas. É importante também salientar que todos os tratamentos foram baseados em dose única. É possível que doses diárias do duplo mutante apresentem uma maior eficácia terapêutica.

Um dos fatores que limitam o uso de *S. enterica* como agente antitumoral é o choque séptico causado após a indução da produção de TNF- α estimulada pelo lipídio A da bactéria. Neste sentido, foi construído o mutante ST662 Δ *msbB* que, apesar de possuir um lipídio A incompleto, foi capaz de levar os camundongos tratados à morte. Isto indica que os outros fatores de virulência de *Salmonella* também devem ser atenuados e que somente a mutação no lipídio A não é suficiente para construção de uma linhagem segura. Além disso, mesmo altas doses deste mutante não exibiram o mesmo efeito dos mutantes ST662 Δ *ihfA*, ST662 Δ *ihfB* e ST662 Δ *fis*, por exemplo, contra os tumores, uma vez que a massa tumoral

continuou crescendo com o passar do tempo. Apesar de Low e colaboradores (1999) terem descrito a mesma mutação simples no gene *msbB* em outra linhagem de *S. enterica* e terem evidenciado sua segurança e certo efeito – na verdade não muito satisfatório, uma vez que seus resultados mostram que os tumores não tratados alcançavam um volume de 3000 mm³ enquanto os tratados não regrediam mas continuavam com um volume de 1000 mm³ (ainda assim muito grande) - sobre o melanoma B16F10, o mesmo não ocorreu em relação à linhagem ST662Δ*msbB*. É possível que as linhagens mutadas para o gene *msbB* não sejam apropriadas para o tratamento de tumores, já que uma grande redução nos níveis de TNF-α pode diminuir o potencial terapêutico das bactérias (Leschner & Weiss, 2010), uma vez que alguns mecanismos de ação antitumoral já descritos, como hemorragia, dependem da indução de TNF-α (Leschner *et al*, 2009).

S. enterica induz a inflamação da mucosa e diarreia pela indução da produção de inúmeras citocinas, incluindo IFN-γ, TNF-α, IL-1b, IL-17 e IL-22 (Muller *et al*, 2009). O IFN-γ é produzido nos linfonodos e no baço pouco tempo após a infecção por *S. enterica* pelas células NK, NKT, linfócitos T CD4 e CD8, o que ativa as funções microbidas dos macrófagos (Foster *et al*, 2003). Além disso, Morello e colaboradores (2011) descreveram que o IFN-γ pode inibir o crescimento de células tumorais e induz a diferenciação de células NK e células T em células efectoras que produzem TNF-α, contribuindo para a regressão tumoral. Desta forma, o resultado obtido pelo PCR em tempo real quantitativo está de acordo com os dados da literatura, evidenciando que o aumento na expressão de IFN-γ pela presença da bactéria nos tumores também é um mecanismo de ação antitumoral.

O uso de bactérias no tratamento do câncer ainda está longe de ser uma terapia clínica estabelecida. Isto porque muitos grupos de pesquisa vêm relatando as mesmas

dificuldades encontradas neste projeto em relação à mortalidade de animais após o tratamento, seja por choque séptico ou por infecção de órgãos saudáveis a longo prazo. Neste sentido, Crull & Weiss (2011) relataram o uso do antibiótico ciprofloxacina como medida de impedir a morte dos camundongos após o tratamento da massa tumoral. Para garantir a sobrevivência dos animais, a administração do antibiótico deve começar dentro de 24 horas após o tratamento. Os autores comentam que este tratamento não prejudica o efeito terapêutico das bactérias. Assim, a combinação de bactérias e controle por antibióticos pode ser uma forma de se alcançar bons resultados na terapia contra o câncer.

Inúmeros experimentos mostraram a vasta capacidade das bactérias de tratar o câncer por meio de inúmeros mecanismos. Forbes (2010) comenta que a terapia bacteriana definitiva será constituída por uma coleção de linhagens construídas para propósitos específicos, ao invés de uma única e perfeita linhagem. Por exemplo, o tratamento ideal poderia usar linhagens cooperativamente e em combinação com a quimioterapia molecular: uma anaeróbica facultativa detectável poderia ser usada para o diagnóstico; uma linhagem imunogênica geneticamente modificada poderia ser usada para sensibilizar o sistema imune; uma anaeróbica obrigatória poderia ser utilizada para o tratamento de tumores primários inoperáveis; uma outra linhagem que produza um agente citotóxico controladamente poderia ser utilizada para tratar metástases e tumores difusos. Neste sentido, o mutante deste estudo poderia ser aplicado para reduzir e eliminar o tumor primário, enquanto uma outra linhagem seria responsável por eliminar metástases. Uma vez aprimoradas, bactérias anticâncer serão uma ferramenta clínica essencial, capazes de desempenhar funções que não podem ser realizadas por outras terapias e que poderão detectar, prevenir e tratar tumores primários e metástases.

As perspectivas para a continuação deste projeto envolvem novas tentativas de se encontrar uma linhagem segura e eficaz no tratamento de tumores em modelos murinos. Boas alternativas no tratamento seriam a construção dos duplos mutantes *ST662ΔihfAΔihfB* e *ST662ΔihfAΔmsb*, a utilização das linhagens já construídas em conjunto ou mesmo o uso de antibióticos no controle do tratamento.

Referências

6. Referências Bibliográficas

- AARON E. DARLING, BOB MAU, AND NICOLE T. PERNA. *progressiveMauve: Multiple Genome Alignment with Gene Gain, Loss, and Rearrangement*. *PLoS One*. 5(6):e11147. 2010.
- ABRAHAMAS, G.L.; HENSEL, M. *Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular Salmonella enterica and its host cells*. *Cell Microbiol*. 8(5):728-37. 2006.
- ABU-ALFA, A.K. & YOUNES, A. *Tumor lysis syndrome and acute kidney injury: evaluation, prevention, and management*. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*, 55(5 Suppl 3), pp.S1-13; quiz S14-9. 2010.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 1268 p. 2002.
- ALPUCHE-ARANDA, C.M. ; RACOOSIN, E.L. ; SWANSON, J.A. ; MILLER, S.I. *Salmonella stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes*. *J Exp Med*. 179(2):601-8. 1994.
- ALTMeyer, M.; BARTHEL, M.; EBERHARD, M.; REHRAUER, H.; HARDT, W. D. *Absence of PARP1 delays the onset of Salmonella-induced gut inflammation*. *Infect Immun*. 78(8):3420-31. 2010.
- APPEL, J. G.; BERGSNEIDER, M.; VINTERS, H.; SALAMON, N.; WANG, M. B.; HEANEY, A. P. *Acromegaly due to an ectopic pituitary adenoma in the clivus: case report and review of literature*. *Pituitary*. 2011.
- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH. J.A. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2^a ed. John Wiley & Sons. 600p. 2003.

- AVIV, M.; GILADI, H.; SCHREIBER, G.; OPPENHEIM, A.B.; GLASER, G. *Expression of the genes coding for the Escherichia coli integration host factor are controlled by growth phase, rpoS, ppGpp and by autoregulation.* Mol Microbiol. Dec;14(5):1021-31. 1994.
- AVOGADRI, F.; MARTINOLI, C.; PETROVSKA, L.; CHIODONI, C.; TRANSIDICO, P.; BRONTE, V.; LONGHI, R.; COLOMBO, M.P.; DOUGAN, G.; RESCIGNO, M. *Cancer immunotherapy based on killing of Salmonella-infected tumor cells.* Cancer Res. May 1;65(9):3920-7. 2005
- AVOGADRI, F.; MITTAL, D.; SACCHERI, F.; SARRAFIORE, M.; CIOCCA, M.; LARGHI, P.; ORECCHIA, R.; RESCIGNO, M. *Intra-tumoral Salmonella typhimurium induces a systemic anti-tumor immune response that is directed by low-dose radiation to treat distal disease.* European journal of immunology, 38(7), pp.1937-47. 2008.
- BEACH, M.B.; OSUNA, R. *Identification and characterization of the fis operon in enteric bacteria.* J Bacteriol.;180(22):5932-46. 1998.
- BIJLSMA, J.J.; GROISMAN, E.A. *The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three secretion system of Salmonella enterica.* Mol Microbiol, 57:85-96. 2005.
- BÖHLE, A.; BRANDAU, S. *Immune mechanisms in bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for superficial bladder cancer.* J Urol. Sep;170(3):964-9. 2003.
- BUSTAMANTE, V.H.; MARTINEZ, L.C.; SANTANA, F. J.; KNODLER, L.A.; STEELE-MORTIMER, O.; PUENTE, J.L. *HilD-mediated transcriptional crosstalk between SPI-1 and SPI-2.* Proc Natl Acad Sci USA, 105:14591-14596. 2008.
- CHARLIER, D.; GIGOT, D.; HUYSVELD, N.; ROOVERS, M.; PIÉRARD, A.; GLANSDORFF, N. *Pyrimidine regulation of the Escherichia coli and Salmonella typhimurium carAB operons: CarP and integration host factor (IHF) modulate the methylation status of a GATC site present in the control region.* J Mol Biol. 21;250(4):383-91. 1995.

- CLAIRMONT, C.; LEE, K.C.; PIKE, J.; ITTENSOHN, M.; LOW, K.B.; PAWELEK, J.; BERMUDEZ, D.; BRECHER, S.M.; MARGITICH, D.; TURNIER, J.; LI, Z.; LUO, X.; KING, I.; ZHENG, L.M. *Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of Salmonella typhimurium*. J Infect Dis. 181(6):1996-2002. 2000.
- COLEY, W.B. *The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases*. Am J Med Sci **105**: 487–511. 1893.
- CRULL, K.; BUMANN, D; WEISS, S. *Influence of infection route and virulence factors on colonization of solid tumors by Salmonella enterica serovar Typhimurium*. FEMS Immunol Med Microbiol. 62(1):75-83. 2011.
- CRULL, K.; ROHDE, M.; WESTPHAL, K.; LOESSNER, H.; WOLF, K.; FELIPE-LÓPEZ, A.; HENSEL, M.; WEISS, S. *Biofilm formation by Salmonella enterica serovar Typhimurium colonizing solid tumours*. Cell Microbiol. Aug;13(8):1223-33. 2011.
- CRULL, K.; WEISS, S. *Antibiotic control of tumor-colonizing Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Exp Biol Med (Maywood). 2011.
- CURIEL, T. J. *Tregs and rethinking cancer immunotherapy*. J. Clin. Invest. 117: 1167–1174. 2007.
- DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. *Molecular basis of the interaction of Salmonella with the intestinal mucosa*. Clin Microbiol Rev. Jul;12(3):405-28. 1999.
- DATSENKO, K. A.; WANNER, B.L. *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(12): 6640-5. 2000.
- DORMAN, C.J.; CORCORAN, C.P. *Bacterial DNA topology and infectious disease*. Nucleic Acids Res. 37(3):672-8. 2009.

- DURÁN, N.; MENCK, C. F. *Chromobacterium violaceum: a review of pharmacological and industrial perspectives*. Crit Rev Microbiol. 27(3):201-22.2001.
- FERREIRA, C. V.; BOS, C. L.; VERSTEEG, H. H.; JUSTO, G. Z.; DURÁN, N.; PEPPELENBOSCH, M. P. *Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death*. Blood. 104(5):1459-64. 2004.
- FORBES, N. S.; MUNN, L. L.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. *Sparse initial entrapment of systemically injected Salmonella typhimurium leads to heterogeneous accumulation within tumors*. Cancer Res. 63, 5188–5193. 2003.
- FORBES, N.S. *Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy*. Nat Rev Cancer. 10(11):785-94. 2010.
- FOSTER, N.; HULME, S.D.; BARROW, P.A. *Induction of antimicrobial pathways during early-phase immune response to Salmonella spp. in murine macrophages: gamma interferon (IFN-gamma) and upregulation of IFN-gamma receptor alpha expression are required for NADPH phagocytic oxidase gp91-stimulated oxidative burst and control of virulent Salmonella spp.* Infect Immun 71: 4733–4741. 2003.
- GALÁN, J. E. *Salmonella interactions with host cells: type III secretion at work*. Annu Rev Cell Dev Biol. 17:53-86. 2001.
- GALEN, J.E.; WANG, J.Y.; CHINCHILLA, M.; VINDURAMPULLE, C.; VOGEL, J. E.; LEVY, H.; BLACKWELDER, W.C.; PASETTI, M. F.; LEVINE, M. M. *A new generation of stable, nonantibiotic, low-copy-number plasmids improves immune responses to foreign antigens in Salmonella enterica serovar Typhi live vectors*. Infect Immun. 78(1):337-47. 2010.
- GARCIA-DEL PORTILLO, F.; FOSTER, J. W.; FINLAY, B. B. *Role of acid tolerance response genes in Salmonella typhimurium virulence*. Infect Immun. Oct;61(10):4489-92.1993.

- GOSHIMA, N.; KANO, Y.; TANAKA, H.; KOHNO, K.; IWAKI, T.; IMAMOTO, F. *IHF supresses the inhibitory effect of H-NS on HU function in the hin inversion system*. Gene. 141(1):17-23. 1994.
- GUYTON, A. C. & HALL, J.E. *Tratado de fisiologia médica de Guyton & Hall*. 11^a edição. Elsevier; 1264p. 2006.
- GUZMAN, C. A.; BORSUTZKY, S.; GRIOT-WENK, M.; METCALFE, I.C.; PEARMAN, J.; COLLIOD, A.; FAVRE, D.; DIETRICH, G. 2006. *Vaccines against typhoid fever*. Vaccine 24(18):3804-11. 2006.
- HAHN, H. P.; VON SPECHT, B. U. *Secretory delivery of recombinant proteins in attenuated Salmonella strains: potential and limitations of Type I protein transporters*. FEMS Immunol Med Microbiol. 37(2-3):87-98. 2003.
- HANSEN-WESTER, I.; HENSEL, M. *Salmonella pathogenicity islands encoding type III secretion systems*. Microbes Infect. 3(7):549-59. 2001.
- HASKELL, C. M. *Fluorouracil*. In: In Cancer Treatment. WB Sounds Company. 116–119. 1995.
- HERNANDEZ, L. D. ; PYPART, M. ; FLAVELL, R. A. ; GALÁN, J. E. *A Salmonella protein causes macrophage cell death by inducing autophagy*. J Cell Biol. 163(5):1123-31. 2003.
- HOFFMANN, C.; GALLE, M.; DILLING, S.; KÄPPELI, R.; MÜLLER, A. J.; SONGHET, P.; BEYAERT, R.; HARDT, W.D. *In macrophages, caspase-1 activation by SopE and the type III secretion system-1 of S. typhimurium can proceed in the absence of flagellin*. PLoS One. 5(8):e12477. 2010.
- JIA, L.J.; WEI, D.P.; SUN, Q.M.; HUANG, Y.; WU, Q.; HUA, Z.C. *Oral delivery of tumor-targeting Salmonella for cancer therapy in murine tumor models*. Cancer Sci. 98(7):1107-12. 2007.

- JONES, B.D.; GHORI, N.; FALKOW, S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med.* 180(1):15-23. 1994.
- KASINSKAS, R.W.; FORBES, N.S. *Salmonella typhimurium* lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis. *Cancer Res.* 67, 3201–3209. 2007.
- KASINSKAS, R.W.; FORBES, N.S. *Salmonella typhimurium* specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue in vitro. *Biotechnol Bioeng.* 94(4):710-21. 2006.
- LEON, L. L.; MIRANDA, C. C.; DE SOUZA, A. O.; DURÁN, N. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *J Antimicrob Chemother.* 48(3):449-50. 2001.
- LESCHNER, S.; WEISS, S. *Salmonella*-allies in the fight against cancer. *J Mol Med* 88:763–73. 2010.
- LESCHNER, S.; WESTPHAL, K.; DIETRICH, N.; VIEGAS, N.; JABLONSKA, J.; LYSZKIEWICZ, M.; LIENENKLAUS, S.; FALK, W.; GEKARA, N.; LOESSNER, H.; WEISS, S. Tumor invasion of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* is accompanied by strong hemorrhage promoted by TNF- α . *PLoS ONE* 4, e6692. 2009.
- LIM, S.; KIM, B.; CHOI, H. S.; LEE, Y.; RYU, S. *Fis* is required for proper regulation of *ssaG* expression in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Microb Pathog* 41:33-42. 2006.
- LORENZ, M.; HILLISCH, A.; GOODMAN, S.D.; DIEKMANN, S. Global structure similarities of intact and nicked DNA complexed with IHF measured in solution by fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Res.* 27(23):4619-25. 1999.
- LOW, K.B.; ITTENSOHN, M.; LE, T.; PLATT, J.; SODI, S.; AMOSS, M.; ASH, O.; CARMICHAEL, E.; CHAKRABORTY, A.; FISCHER, J.; LIN, S.L.; LUO, X.; MILLER, S.I.; ZHENG, L.; KING, I.; PAWELEK, J.M.; BERMUDES, D. *Lipid A*

- mutant Salmonella with suppressed virulence and TNFalpha induction retain tumor-targeting in vivo.* Nat Biotechnol.17(1):37-41.1999.
- MA, W. W.; ADJEI, A. A. *Novel agents on the horizon for cancer therapy.* CA Cancer J Clin. 59(2):111-37. Erratum in: CA Cancer J Clin. 2010 Jan-Feb;60(1):62. 2009.
- MALMGREN, R.A.; FLANIGAN, C. C. *Localization of the vegetative form of Clostridium tetani in mouse tumors following intravenous spore administration.* Cancer Res. 15(7):473-8. 1955.
- MANGAN, M.W.; LUCCHINI, S.; DANINO, V.; CRÓINÍN, T.O.; HINTON, J.C.; DORMAN, C.J. *The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in Salmonella enterica serovar Typhimurium.* Mol Microbiol. 59(6):1831-47. 2006.
- MASTROENI, P.; MASKELL, D. *Salmonella infections: clinical, immunological, and molecular aspects.* Cambridge University Press, 381p. 2006.
- MENDES, G. M. T. *Construção e caracterização de linhagens de Salmonella enterica mutantes nos genes de IHF (Integration Host Factor).* 2008. 100f. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2008
- MERRITT, R. E.; YAMADA, R. E.; CRYSTAL, R. G.; KORST, R. J. *Augmenting major histocompatibility complex class I expression by murine tumors in vivo enhances antitumor immunity induced by an active immunotherapy strategy.* J. Thorac Cardiovasc. Surg. 127: 355–364. 2004.
- MORELLO, S.; SORRENTINO, R.; MONTINARO, A.; LUCIANO, A.; MAIOLINO, P.; NGKELO, A.; ARRA, C.; ADCOCK, I. M.; PINTO, A. *NK1.1 cells and CD8 T cells mediate the antitumor activity of Cl-IB-MECA in a mouse melanoma model.*Neoplasia. 13(4):365-73. 2011.
- MULLER, A.J.; HOFFMANN, C.; GALLE, M.; VAN DEN BROEKE, A.; HEIKENWALDER, M. *The S. Typhimurium effector SopE induces caspase-1*

- activation in stromal cells to initiate gut inflammation. Cell Host Microbe* 6: 125–136. 2009.
- NEMUNAITIS, J.; CUNNINGHAM, C.; SENZER, N.; KUHN, J.; CRAMM, J.; LITZ, C.; CAVAGNOLO, R.; CAHILL, A.; CLAIRMONT, C.; SZNOL, M. *Pilot trial of genetically modified, attenuated Salmonella expressing the E. coli cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. Cancer Gene Ther.* Oct;10(10):737-44. 2003.
- NISHIKAWA, H.; SATO, E.; BRIONES, G.; CHEN, L. M.; MATSUO, M.; NAGATA, Y.; RITTER, G.; JÄGER, E.; NOMURA, H.; KONDO, S.; TAWARA, I.; KATO, T.; SHIKU, H.; OLD, L. J.; GALÁN, J. E.; GNJATIC, S. *In vivo antigen delivery by a Salmonella typhimurium type III secretion system for therapeutic cancer vaccines. J Clin Invest.* 116(7):1946-54. 2006.
- PALACIOS, S.; ESCALANTE-SEMERENA, J.C. *prpR, ntrA, and ihf functions are required for expression of the prpBCDE operon, encoding enzymes that catabolize propionate in Salmonella enterica serovar typhimurium LT2. J Bacteriol.* 182(4):905-10. 2000.
- PAWELEK, J.M.; LOW, K.B.; BERMUDEZ, D. *Tumor-targeted Salmonella as a novel anticancer vector. Cancer Res.* 57(20):4537-44. 1997.
- PAWELEK, J.M.; LOW, K.B.; BERMUDEZ, D. *Bacteria as tumour-targeting vectors. Lancet Oncol.* 4(9):548-56. Erratum in: *Lancet Oncol.* 4(11):658. 2003.
- PAWELEK, J.M.; SODI, S.; CHAKRABORTY, A.K.; PLATT, J. T.; MILLER, S.; HOLDEN, D. W.; HENSEL, M.; LOW, K. B. *Salmonella pathogenicity island-2 and anticancer activity in mice. Cancer Gene Ther.* 9(10):813-8. 2002.
- REIS E SOUSA, C.; EDWARDS, A. D.; MANICKASINGHAM, S. P.; SCHULZ, O. *Conditioning of dendritic cells by pathogen-derived stimuli. Immunobiology.* 204(5):595-7. 2001.

- ROSENBERG, S. A. ; SPIESS, P. J. ; KLEINER, D. E. *Antitumor effects in mice of the intravenous injection of attenuated Salmonella typhimurium*. J Immunother. 25(3):218-25. 2002.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. *Molecular cloning: a Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 2444p.2001.
- SANO, G.; TAKADA, Y.; GOTO, S.; MARUYAMA, K.; SHINDO, Y.; OKA, K.; MATSUI, H.; MATSUO, K. *Flagella facilitate escape of Salmonella from oncotic macrophages*. J Bacteriol. 189(22):8224-32. 2007.
- SCHLUMBERGER, M. C.; HARDT, W. D. *Salmonella type III secretion effectors: pulling the host cell's strings*. Curr Opin Microbiol. 9(1):46-54. 2006.
- SIRKO, A.; WEGLEŃSKA, A.; HULANICKA, D. *Integration host factor positively regulates cycJIIH transcription*. Mol Gen Genet. 258(1-2):174-7. 1998.
- SZNOL, M.; LIN, S.L.; BERMUDES, D.; ZHENG, L. M.; KING, I. *Use of preferentially replicating bacteria for the treatment of cancer*. J Clin Invest. 105(8):1027-30. 2000.
- THANBICHLER, M.; WANG, S. C.; SHAPIRO, L. *The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure*. J Cell Biochem. 96(3):506-21. 2005.
- TOSO, J. F.; GILL, V. J.; HWU, P.; MARINCOLA, F. M.; RESTIFO, N. P.; SCHWARTZENTRUBER, D. J.; SHERRY, R. M.; TOPALIAN, S. L.; YANG, J. C.; STOCK, F.; FREEZER, L. J.; MORTON, K. E.; SEIPP, C.; HAWORTH, L.; MAVROUKAKIS, S.; WHITE, D.; MACDONALD, S.; MAO, J.; SZNOL, M.; ROSENBERG, S. A. *Phase I study of the intravenous administration of attenuated Salmonella typhimurium to patients with metastatic melanoma*. J Clin Oncol. Jan 1;20(1):142-52. 2002.

- TRAVERS, A.; SCHNEIDER, R.; MUSKHELISHVILI, G. *DNA supercoiling and transcription in Escherichia coli: The FIS connection*. *Biochimie* 83:213-217. 2001.
- VAN AMERSFOORT, E. S.; VAN BERKEL, T. J.; KUIPER, J. *Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock*. *Clin Microbiol Rev.* 16(3):379-414. 2003.
- VAN DUYNHOVEN, Y. T.; WIDDOWSON, M. A.; DE JAGER, C. M.; FERNANDES, T.; NEPELENBROEK, S.; VAN DEN BRANDHOF, W.; WANNET, W. J.; VAN KOOIJ, J. A.; RIETVELD, H. J.; VAN PELT, W. *Salmonella enterica serotype Enteritidis phage type 4b outbreak associated with bean sprouts*. *Emerg Infect Dis.*8(4):440-3. 2002.
- VICARI, A. P. ; CAUX, C. ; TRINCHIERI, G. *Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation*. *Semin Cancer Biol.* 12(1):33-42. 2002.
- WEINBERG, R. A. *A biologia do câncer*. Porto Alegre: Artmed. 864 p. 2008.
- WERNER, M. H.; CLORE, G.M.; GRONENBORN, A.M. *Symmetry and asymmetry in the function of Escherichia coli integration host factor: implications for target identification by DNA-binding proteins*. *Curr Biol.* 4(6):477-87. 1994.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em :
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> Acesso em: 31 de out. 2011.
- YANG, N.; ZHU, X.; CHEN, L.; LI, S. ; REN, D. *Oral administration of attenuated S. typhimurium carrying shRNA-expressing vectors as a cancer therapeutic*. *Cancer Biol Ther.* 7(1):145-51. 2008.
- ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. *Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs*. *Genome Res.*18(5):821-9. 2008.
- ZHAO, M.; GELLER, J.; MA, H.; YANG, M.; PENMAN, S.; HOFFMAN, R. M. *Monotherapy with a tumor-targeting mutant of Salmonella typhimurium cures*

orthotopic metastatic mouse models of human prostate cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 104(24):10170-4. 2007.

ZHAO, M.; YANG, M.; LI, X-M.; JIANG, P. ; BARANOV, E.; LI, S.; XU, M.; PENMAN, S.; HOFFMAN, R. M. *Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing Salmonella typhimurium.* Proc. Natl Acad. Sci. USA 102, 755–760. 2005.

ZHAO, M.; YANG, M.; MA, H.; LI, X.; TAN, X.; LI, S. ; YANG, Z. ; HOFFMAN, R. M. *Targeted therapy with a Salmonella typhimurium leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice.*Cancer Res. 66(15):7647-52. 2006.

ZHONG, Z.; KAZMIERCZAK, R.A.; DINO, A.; KHREIS, R.; EISENSTARK, A.; SCHATTEN, H. *Salmonella-host cell interactions, changes in host cell architecture, and destruction of prostate tumor cells with genetically altered Salmonella.* Microsc Microanal. 13(5):372-83. 2007.

ZHOU, D. *Collective efforts to modulate the host actin cytoskeleton by Salmonella type III-secreted effector proteins.* Trends Microbiol. 9(12):567-9. 2001.

Anexo

7. Anexo

7.1 Testes com a violaceína

Além do teste dos mutantes descritos, foram realizados experimentos com a violaceína na tentativa de se tratar os tumores. A violaceína é um pigmento de cor violeta produzido pela bactéria Gram-negativa de vida livre *Chromobacterium violaceum* e *Janthinobacterium lividum* e possui um largo espectro de ação antimicrobiana, antitumoral, tripanocida (Durán & Menck, 2001) e leishmanicida (Leon *et al*, 2001), além de apresentar a vantagem de ser um composto indutor de apoptose em linhagens tumorais; na linhagem HL60, por exemplo, a apoptose é induzida pela ativação direta do receptor para fator de necrose tumoral 1, causando a ativação da caspase 8, transcrição dos genes regulados pelo fator nuclear kappa-B (NF-kappaB) e a ativação da MAP-quinase p38 (Ferreira *et al*, 2004); além disso, há evidências de que a via de apoptose mitocondrial (que é ativada pelo extravasamento de citocromo C e SMAC-Diablos) aja concomitantemente. Deste modo, a violaceína apresenta um bom potencial terapêutico. Inicialmente, a idéia era a de utilizar a violaceína em conjunto com *S. enterica* para avaliar se haveria um sinergismo entre os dois, já que a violaceína não causa dano à *S. enterica in vitro* (dados não publicados). No entanto, como não foi possível encontrar um mutante seguro para o tratamento, foi avaliado o efeito antitumoral da violaceína isoladamente.

A violaceína utilizada nos testes foi a comercial, vendida pela Sigma-Aldrich. Inicialmente, o produto foi diluído em dimetilsulfóxido 99,9% (DMSO – Mallinckrodt), sendo a concentração da solução estoque 1µg/µL. Foram realizados dois tipos de

tratamentos, um pela via intraperitoneal e outro pela via intratumoral. No primeiro, a solução estoque foi diluída em diferentes concentrações e a violaceína foi administrada intraperitonealmente durante 7 dias em camundongos C57/BL6 apresentando o tumor B16F10. As concentrações administradas foram 0,75 mg/Kg, 0,25mg/Kg e 0,05 mg/Kg. O outro tratamento correspondeu a uma única dose de violaceína na concentração 0,75 mg/Kg via intratumoral. Aos grupos controles de cada tratamento, foi administrado DMSO 99,9% diluído em PBS (concentração final de NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2,7 mM e pH 7.4) correspondente à concentração mais alta de DMSO usada nos tratamentos com a violaceína (0,75 mg/Kg de violaceína).

Como resultado, foi verificado que tanto o tratamento intraperitoneal quanto o tratamento intratumoral exerceram efeito no retardo do crescimento das massas tumorais quando comparados ao grupo controle tratado com DMSO diluído em PBS (Figura 18). Embora este seja um experimento preliminar, o tratamento mais eficaz correspondeu a injeção intratumoral. Assim, o uso de violaceína neste modelo experimental parece ser promissor e será melhor explorado futuramente.

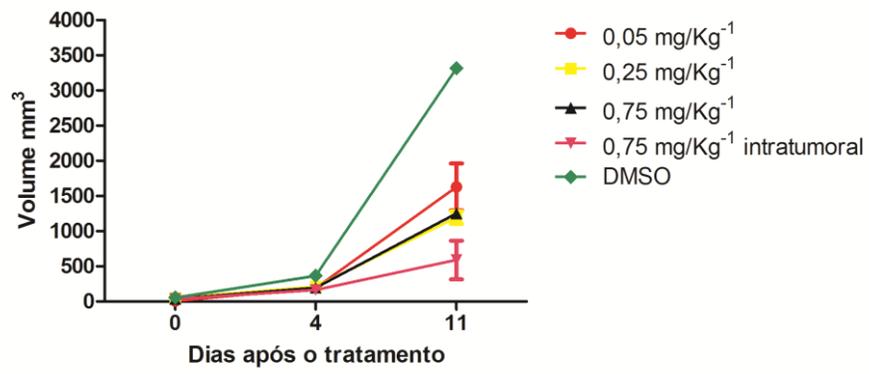


Figura 18: Gráfico comparando os tratamentos intraperitoneal e intratumoral com violaceína em diferentes doses.