



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

GENESY PEREZ JORGE

***SALMONELLA ENTERICA E VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA COMO
AGENTE ANTITUMORAL***

CAMPINAS

2022

GENESY PEREZ JORGE

***SALMONELLA ENTERICA E VESÍCULAS DE MEMBRANA EXTERNA
COMO AGENTE ANTITUMORAL***

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
Doutora em Genética e Biologia Molecular na área de
Genética de Microrganismos.*

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA GENESY PEREZ JORGE,
ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCELO
BROCCHI.

CAMPINAS

2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

P415s Pérez Jorge, Genesy, 1994-
Salmonella enterica e vesículas de membrana externa como agente antitumoral / Genesy Pérez Jorge. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Marcelo Brocchi.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Salmonella enterica*. 2. Vesícula de membrana externa. 3. Câncer - Imunoterapia. 4. Violaceína. I. Brocchi, Marcelo, 1967-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: *Salmonella enterica* and outer membrane vesicles as an anti-tumor agent

Palavras-chave em inglês:

Salmonella enterica

Outer membrane vesicle

Cancer - Immunotherapy

Violacein

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Marcelo Brocchi [Orientador]

Cristina Elisa Alvarez Martinez

Carmen Veríssima Ferreira

Fernanda de Freitas Anibal

Gerson Nakazato

Data de defesa: 11-11-2022

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-2138-7393>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0720726752297051>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Brocchi (Orientador)

Profa. Dra. Cristina Alvarez

Profa. Dra. Carmen Veríssima

Profa. Dra. Fernanda Anibal (Universidade Federal de São Carlos)

Prof. Dr. Gerson Nakazato (Universidade Estadual de Londrina)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biologia/UNICAMP.

DEDICATÓRIA

*Conheço as tuas obras. Eis que tenho colocado
diante de ti uma porta aberta que ninguém
consegue fechar; tens pouca força, mas
obedeceste à minha Palavra e não negaste o
meu Nome. Apocalipse 3.8*

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte da minha vida, que sempre me acompanhou e me deu forças em todos os momentos desta trajetória e que não esquece dos meus sonhos.

A mi bebê, que me acompanhou em esta última fase de doutorado, me fez a pessoa mais feliz do mundo desde o momento que escutei seu coração e que me deu o maior motivo para continuar cada dia. Espero ser a melhor mamãe para você.

Aos meus pais Ided Jorge e Edilberto Pérez, pelo amor, dedicação e pela oportunidade que me deram de ir para a universidade, mesmo não tendo essa oportunidade.

Aos meus irmãos, Nilson Pérez pelo apoio e Laury Vanessa por acreditar em mim e por suas orações.

Ao meu amigo de longa data, quem sempre esteve presente na minha vida, meu marido Marlon Paternina, por seu amor, seu apoio constante, seu sacrifício e suas palavras de encorajamento ao longo desta jornada. Sem ele o cumprimento de este sono não seria possível.

À minha professora do ensino médio Ederlina Reyes, que sem perceber, incutiu em mim o amor pela ciência que hoje me impulsionou a chegar até aqui.

Ao meu orientador prof. Dr. Marcelo Brochi, por abrir as portas de seu laboratório para mim, pela paciência, confiança, humildade e por todos os seus ensinamentos. Fazer parte de seu laboratório foi um verdadeiro orgulho e mais ainda poder discutir ciência com ele.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de doenças tropicais, por sua colaboração nos experimentos, companhia nos almoços, risadas e choros. Marco Gontijo, Yessica Flores, Isabella Rodrigues, Marina Flóro, Pedro Gallo e Guilherme Augusto Sanches Roque. Levo vocês no meu coração, vocês foram peças-chave no meu doutorado.

A Bruna Lima, por sua colaboração técnica e emocional. Obrigada por essas conversas proveitosas que foram fundamentais para chegar até aqui.

Aos meus colegas do IB que foram prestativos e muito colaboradores.

À UNICAMP, pelo acolhimento durante este tempo, e a todos os funcionários que me ajudaram.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bispo do Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) pelos ensinamentos, conselhos e ajuda com equipamentos.

Ao Prof. Dr. Fausto Almeida e suas orientadas Bianca e Caroline do departamento de bioquímica e imunologia da Universidade de São Paulo, pelo auxílio no isolamento de vesículas de membrana externa.

À Profa. Dra. Sandra Dias e o seus orientados Raquel, Renata e Cyro do Laboratório Nacional de Biociências do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por seu auxílio nos testes *in vitro* em culturas 2D e 3D.

À Profa. Dra. Monica Pupo e sua orientada Carlismari da faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, por seu auxílio no HPLC.

A Lilian Coser, pelo auxílio em citometria de fluxo.

À UNICAMP, pelo acolhimento durante esses dois anos, e a todos os funcionários que me fazem este trabalho possível.

Ao ministério de ciências tecnologia e inovação da Colômbia (Colciencias 2016/772) pelo apoio financeiro no meu doutorado.

RESUMO

Salmonella enterica Typhimurium é a bactéria mais promissora para o tratamento do câncer e pode ser usada como vetor para a entrega de genes antitumorais. Por sua vez, as OMVs são consideradas mais seguras que as bactérias atenuadas, podem estimular o sistema imunológico e também podem ser usadas como nanocarregadores de agentes antitumorais. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antitumoral de novos mutantes atenuados de *S. enterica* Typhimurium e OMVs carregadas de violaceína *in vitro* e *in vivo*. Assim, três vertentes foram exploradas. Em uma primeira abordagem, uma linhagem atenuada com lise retardada foi utilizada para entregar o gene antitumoral *p53* em células de câncer de bexiga humana. A cepa utilizada confere contenção biológica para que as bactérias não persistam *in vivo* ou sobrevivam no caso de serem excretadas. A Expressão do gene *p53* entregue por *S. enterica* Typhimurium foi verificada por *western blot*. Demonstramos por ensaio de Calceína AM que *p53* entregue por *S. enterica* Typhimurium diminuiu significativamente a viabilidade de células de câncer de bexiga de uma maneira dependente da dose (entre o 14-82%). Na segunda abordagem, foram construídos os mutantes $\Delta tolRA$ e $\Delta ihfABpmi$ utilizando o sistema de recombinação λ red. Os mutantes construídos demonstraram ser atenuados e conseguem invadir e se replicar em células de câncer de bexiga e melanoma. O tratamento com $\Delta ihfABpmi$ levou a redução completa da massa tumoral, indução da polarização de macrófagos a o fenótipo M1 e ao incremento significativo da expressão de mediadores pro inflamatórios. Finalmente, na terceira abordagem, o potencial antimelanoma de OMVs carregadas e não carregadas de violaceína foi avaliado. As OMVs foram isoladas a partir de mutante hipervesiculado e sua linhagem parental; A caracterização das OMVs por NTA mostrou que o mutante hipervesiculado produz maior quantidade de OMVs. Análises de HPLC e fluorescência demonstraram que as OMVs podem carregar violaceína. Por fluorescência também demonstramos que OMVs podem entregar violaceína no citoplasma de células tumorais. O tratamento com OMVs carregadas de violaceína levou a redução completa da massa tumoral. Adicionalmente demonstramos que OMVs podem reprogramam o microambiente tumoral pela indução da infiltração de macrófagos, polarização de macrófagos ao fenótipo M1 e produção de mediadores pro-inflamatórios. Os resultados obtidos sugerem que mutantes atenuados de *S. enterica* Typhimurium e OMVs são uma estratégia promissória para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: *Salmonella enterica* Typhimurium, vesículas de membrana externa, imunoterapia, câncer, *p53*, violaceína.

ABSTRAC

Salmonella enterica Typhimurium is the most promising bacterium for cancer treatment and can be used as a vector for the delivery of antitumor genes. For their part, OMVs are considered safer than attenuated bacteria, can stimulate the immune system and can also be used as nanocarriers for antitumor agents. The aim of this study was to evaluate the antitumor effect of new attenuated mutants of *S. enterica* Typhimurium and violacein-loaded OMVs *in vitro* and *in vivo*. Thus, three aspects were explored. In a first approach, an attenuated strain with delayed lysis was used to deliver the *p53* antitumor gene into human bladder cancer cells. The strain used provides biological containment so that the bacteria do not persist *in vivo* or survive in case they are excreted. Expression of the *p53* gene delivered by *S. enterica* Typhimurium was verified by western blot. We demonstrated by Calcein AM assay that *p53* delivered by *S. enterica* Typhimurium significantly decreased bladder cancer cell viability in a dose-dependent manner (between 14-82%). In the second approach, mutants $\Delta tolRA$ and $\Delta ihfABpmi$ were constructed using the λ red recombination system. The constructed mutants were shown to be attenuated and able to invade and replicate in bladder cancer and melanoma cells. Treatment with $\Delta ihfABpmi$ led to a complete reduction in tumor mass, induction of macrophage polarization to the M1 phenotype and a significant increase in the expression of pro-inflammatory mediators. Finally, in the third approach, the antimelanoma potential of violacein loaded and unloaded OMVs was evaluated. OMVs were isolated from hypervesiculated mutant and its parental lineage; The characterization of OMVs by NTA showed that the hypervesiculated mutant produces a greater amount of OMVs. HPLC and fluorescence analysis demonstrated that OMVs can carry violacein. By fluorescence we also demonstrated that OMVs can deliver violacein into the cytoplasm of tumor cells. Treatment with violacein-loaded OMVs led to complete reduction of tumor mass. Additionally, we demonstrate that OMVs can reprogram the tumor microenvironment by inducing macrophage infiltration, polarizing macrophages to the M1 phenotype and producing pro-inflammatory mediators. The results obtained suggest that attenuated mutants of *S. enterica* Typhimurium and OMVs are a promising strategy for the treatment of cancer.

Keywords: *Salmonella enterica* Typhimurium, outer membrane vesicles, immunotherapy, cancer, *p53*, violacein.

LISTA DE FIGURAS

Figura I. Ativação da resposta imune no microambiente tumoral por *Salmonella enterica*..39

Figura II. Polarização de macrófagos tumorais por *Salmonella enterica* Typhimurium.40

CAPÍTULO I

Figura I.1. Caracterização do crescimento, da invasão celular e da sobrevivência de *Salmonella enterica* Typhimurium χ 11218 pYA4545p53. A. Mapa do vetor pYA4545p53. O plasmídeo inclui os promotores P_{CMV}, P_{BAD} e P22R; os genes *p53*, *araC*, *murA* e *asd*; e SV40 poli A tardio, DTS (I) e DTS (II) (Com base em Kong et al., 2012). B. Curva de crescimento bacteriano. O crescimento de *S. enterica* Typhimurium UK-1 χ 11218 pYA4545p53 e de *S. enterica* Typhimurium UK-1 χ 11218 pYA4545 foram monitorados por 12 horas em intervalos de 2 horas determinando UFC. Os dados são os resultados de três experimentos independentes. C. Capacidade de invasão e sobrevivência de χ 11218 pYA4545p53 e χ 11218 pYA4545 na linha celular de carcinoma da bexiga humana 5637. São fornecidos os resultados da contagem de UFC/ml recuperada após lise celular. Os resultados são representados como a média $\pm$ SD de três experimentos independentes realizados em poços em triplicado. A significância estatística foi determinada usando ANOVA de uma via.....75

Figura I.2. Análise da expressão de *p53* e EGFP em células tumorais. A. Western blot mostrando os níveis de expressão da proteína *p53* nas células de adenocarcinoma de próstata humano PC-3 (*p53* nulo) e nas células de carcinoma de bexiga humano 5637 (*p53* mutado e não funcional) após transfecção com 1 μ g de pYA4545p53 ou pYA4545. Os lisados celulares foram preparados após 48 horas de transfecção. B. Determinação semiquantitativa usando ImageJ de níveis de proteína *p53* comparados e normalizados com controle endógeno (β -actina). Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SD de três experimentos. **P* < 0,05, ** *P* < 0,01, *** *P* < 0,001 vs. grupo não transfectado. C. Imagens mostrando fluorescência de EGFP em células 5637. A transfecção de EGFP foi realizada usando o vetor plasmidial pYA4685 (pYA4545-EGFP). O DNA nuclear foi corado com Hoechst (fluorescência azul). Barra de escala: 200 μ m.77

Figura I.3. Viabilidade da linha celular de carcinoma da bexiga humana 5637 infectada com bactérias recombinantes (MOI: 50, 100 ou 200) ou transfectadas com plasmídeos (0,5 μ g ou 1 μ g). A. As células 5637 foram infectadas (MOI: 50) por incubação com χ 11218 pYA4545p53 ou a cepa parental por 1 hora. B. As células 5637 foram infectadas (MOI: 100) com χ 11218 pYA4545p53 ou a cepa parental por incubação por 1 hora. C. As células 5637 foram infectadas (MOI: 200) com χ 11218 pYA4545p53 ou a cepa parental por incubação por 1 hora. D. As células 5637 foram transfectadas com 0,5 μ g de pYA4545p53 ou pYA4545. E. As células 5637 foram transfectadas com 1 μ g de pYA4545p53 ou pYA4545. A viabilidade celular foi determinada após 24, 48 e 72 horas de infecção ou transfecção e avaliada por fluorescência de calceína AM (492/517 nm, excitação/emissão). Os resultados foram normalizados para os das células 5637 não tratadas. Observamos um efeito dose-resposta: quanto maior o número de bactérias utilizadas (MOI: 200) ou a quantidade de plasmídeo utilizado (1 μ g), maior a quantidade de morte celular. O valor

representa a média $\pm$ SD dos dados obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A significância estatística foi determinada usando ANOVA, seguida pelo teste post-hoc de Tukey, e $p < 0,05$ foi usado como ponto de corte para determinar a significância. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. F. Imagens representativas obtidas do ensaio Calceína AM para células 5637 tratadas com χ 11218 pYA4545 ou χ 11218 pYA4545p53 por 72 horas, MOI: 200. Os canais exibidos correspondem a fluorescência vermelha (EthD-1), fluorescência verde (calceína) e fluorescência azul (Hoechst). Barra de escala: 200 μ m.....80

Figura I.4. Viabilidade da linha celular de papiloma de bexiga humana RT4 infectada com bactérias recombinantes (MOI: 50, 100 ou 200) A. As células RT4 foram infectadas (MOI: 50) por incubação com χ 11218 pYA4545p53 ou a cepa parental por 1 h. B. As células RT4 foram infectadas (MOI: 100) com χ 11218 pYA4545p53 ou a cepa parental por incubação por 1 h. C. As células RT4 foram infectadas (MOI: 200) com χ 11218 pYA4545p53 ou a cepa parental por incubação por 1 h. A viabilidade celular foi determinada após 24 h, 48 h e 72 h de infecção e avaliada por fluorescência de calceína AM (492/517 nm, excitação/emissão). Os resultados foram normalizados aos das células RT4 não infectadas. Observamos um efeito dose-resposta: quanto maior o número de bactérias utilizadas (MOI: 200), maior a quantidade de morte celular. O valor representa a média $\pm$ SD dos dados obtidos de duas experiências independentes realizadas em triplicado. A significância estatística foi determinada usando ANOVA, seguida pelo teste post-hoc de Tukey, e $p < 0,05$ foi usado como ponto de corte para determinar a significância. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$. D. Imagens representativas obtidas do ensaio calceína AM para células RT4 tratadas com χ 11218 pYA4545 ou χ 11218 pYA4545p53 por 72 h, MOI: 200. Os canais exibidos correspondem a fluorescência vermelha (EthD-1), fluorescência verde (calceína) e fluorescência azul (Hoechst). Barra de escala: 200 μ m.....82

CAPITULO II

Figura II.1. Crescimento bacteriano e virulência dos mutantes. O crescimento de mutantes e cepa selvagem foi monitorado durante 12 horas, medindo a contagem de UFC (A) e OD (λ 600 nm) (B) a cada hora. As curvas de crescimento foram realizadas três vezes. O gráfico mostra os resultados de um experimento independente. (C) virulência de mutantes e cepa selvagem no modelo de *Galleria mellonella*. As larvas foram inoculadas com 10^4 UFC na última pata falsa (*proleg*) e a sobrevivência foi observada por 96 horas. Os gráficos mostram os valores representativos de três experimentos independentes. (D) perfil eletroforético de LPS. Gel de poliacrilamida corado com solução de prata para a confirmação da integridade do LPS bacteriano. 1. Padrão de peso molecular Dual color (Bio-rad); 2. *S. enterica* Typhimurium 14028; 3. *S. enterica* Typhimurium 14028 Δ ihfABpmi; 3. *S. enterica* Typhimurium 14028 Δ tolRA. 4. *Pseudomonas aeruginosa* (Δ wzz)...100

Figura II.2. Capacidade dos mutantes para invadir, sobreviver e toxicidade em células cancerígenas. As células cancerígenas foram infectadas *in vitro* com cepas mutantes por 2 e 6 horas em uma MOI de 10:1, em seguida, a capacidade das cepas mutantes de invasão (A) e a sobrevivência (B) em células cancerígenas foram determinadas pela contagem de UFC intracelular. A cepa 14028 WT foi usada como controle positivo. Porcentagem de células cancerígenas viáveis 5637 (C) e B16F10 (D) após 24 h de infecções por cepas bacterianas. Resultados representados como média $\pm$ SD de valores representativos de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguido pelo

Teste de comparações multiplex de Dunnett's * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$101

Figura II.3. Avaliação da segurança do tratamento com mutantes atenuados de *S. enterica* Typhimurium (A) Desenho experimental para testar a toxicidade e a segurança dos mutantes em camundongos inoculados por via subcutânea. (B) Peso corporal de camundongos inoculados com mutantes atenuados ao longo do experimento. Peso dos baços (C) e fígados (D) de camundongos inoculados com mutantes atenuados (n=5). O experimento foi repetido duas vezes. Os gráficos mostram os dados de um experimento representativo. A significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$104

Figura II.4. Eficácia antitumoral de mutantes atenuados de *S. enterica* Typhimurium em modelo de tumor subcutâneo B16F10. Camundongos C57BL/6JUnib foram inoculados com células B16F10 (3×10^6) no dia 0. Quando o tumor atingiu $\sim 100 \text{ mm}^3$, 10^6 UFC do mutante $\Delta tolRA$, 10^5 UFC do mutante $\Delta ihfABpmi$ ou PBS foi injetado por via intratumoral uma vez por semana por duas semanas (n = 7). A. Crescimento tumoral depois de iniciados os tratamentos. B. Peso dos camundongos durante os tratamentos. C. Tamanho do tumor no ponto final do experimento. D-F. Cinética do crescimento do tumor individual nos grupos inoculados com PBS, com mutante $\Delta ihfABpmi$ e com mutante $\Delta tolRA$, respectivamente. G. Peso de baço após os tratamentos. H. Peso de fígado após os tratamentos. Foram feitos dois experimentos independentes, usando sete camundongos por grupo. Os gráficos mostram os dados de um experimento representativo. A significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$106

Figura II.5. Imunofenotipagem de macrófagos infiltrados nos tumores B16F10. A. População de macrófagos e B. Fenótipo de macrófagos (do tipo M1 ou do tipo M2) depois do tratamento por via intratumoral com 10^5 UFC do mutante $\Delta ihfABpmi$ ou PBS em modelo murino de melanoma (três camundongos por grupo). A significância estatística foi calculada por teste t Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$107

Figura II.6. Efeito do mutante $\Delta ihfABpmi$ na expressão de genes. Nível relativo de expressão de RNA dos genes Bax (A), IL-6 (B), VEGF (C), iNOS (D), Ki-67 (E) e TNF- α (F). Tecido tumoral de camundongos portadores de tumor B16F10 foi coletado após quatro dias de uma injeção por via intratumoral com 10^5 UFC do mutante $\Delta ihfABpmi$ ou PBS (n = 3). Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SD. A significância estatística foi calculada por teste t Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$108

CAPITULO III

Figura III.1. Transformação de cepas bacterianas com plasmídio pBAT_vioABCDE contendo o operon da violaceína. (A) crescimento de mutantes *S. enterica* Typhimurium 14028 $\Delta tolRA$ e *S. enterica* Typhimurium 14028 $\Delta tolRA$ pBAT_vioABCDE após 24 horas em placas de LB ágar e comparação com a cepa parental. As colônias da cepa *S. enterica* Typhimurium 14028 pBAT_vioABCDE apresentam coloração púrpura escura, enquanto *S. enterica* Typhimurium 14028 $\Delta tolRA$ pBAT_vioABCDE apresenta coloração púrpura clara. O crescimento bacteriano foi monitorado por 12 horas a partir da medição da DO (λ 600 nm) (B) e contagem de UFC (C)...135

Figura III.2. Caracterização de OMVs isoladas de *S. enterica* Typhimurium por quantificação do conteúdo de proteínas e por NTA. OMVs foram isoladas de culturas de fase exponencial em caldo LB. A. quantidade de proteínas presentes nas amostras de OMVs. (B) OMVs quantificadas por NTA. A deleção dos genes *tolR* e *tolA* em *S. enterica* Typhimurium 14028 aumenta a produção de OMVs e o conteúdo total de proteína. C. Diâmetros médios das OMVs medidos por NTA. D. relação de OMVs produzidas por UFC. E. Índice de polidispersidade das OMVs. Amostras com valores de Span menores que um são caracterizadas como monodispersas, enquanto amostras com valores maiores que um são caracterizadas como polidispersas. Os dados são representados como a média $\pm$ SD (n=4 réplicas biológicas). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$; **** $p<0,0001$137

Figura III.3. Caracterização de OMVs isoladas de *S. enterica* Typhimurium por TEM e HPLC. A. Imagens de TEM. Barra de escala = 200 nm. B. Detecção de violaceína em OMVs a partir de HPLC. C. Quantificação de violaceína presente em OMVs (n= 3 réplicas biológicas). A significância estatística foi calculada por teste t Student. * $p<0,05$139

Figura III.4. Perfil citotóxico de OMVs para células de melanoma murino B16-F10 em 24 h. A. Curva dose-resposta de SDS (150 $\mu\text{g/mL}$); B. ST-OMV; C. STvio-OMV; D. Violaceína; E. *tolRA*-OMV; F. *tolRAvio*-OMV. Células tratadas com diluições seriadas (maior diluição testada: $2,036 \times 10^{10}$ partículas/l) de OMV. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT. Cada valor representa a média $\pm$ S.D. de dois experimentos independentes (n=6), os valores foram normalizados para o controle de células não tratadas.140

Figura III.5. Características morfológicas de células B16F10 tratadas com 5×10^9 partículas/ml de OMVs isoladas de *S. enterica* Typhimurium. Escala de barras, imagens da esquerda = 100 μm , imagens da direita = 20 μm141

Figura III.6. Modelo tridimensional de células B16-F10 de melanoma murino tratadas com OMVs por 24 horas. (-) controle negativo não tratado; (SDS) Controle positivo de morte. As concentrações de *tolRAvio*-OMV e *tolRA*-OMV são: 1) $2,036 \times 10^{10}$ partículas/ml; 2) $1,018 \times 10^{10}$ partículas/ml; 3) $0,509 \times 10^{10}$ partículas/ml. Para violaceína, as concentrações são: 1) 5,8 μM ; 2) 2,90 μM ; 3) 1,45 μM ; 4) 0,72 μM . A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio luminescente 3D CellTiter Glo. Cada valor representa a média $\pm$ S.D. de dois experimentos independentes; os valores foram normalizados para controle não tratado. A significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,005$; **** $p<0,0001$142

Figura III.7. Imagens representativas de células B16-F10 por microscopia de fluorescência. A. As células foram semeadas em microplaca de 96 poços (1×10^4 células/poço) e tratadas por 4 horas com $1,02 \times 10^{10}$ partículas/ml de ST-OMV, *tolRA*-OMV e $2,75 \times 10^9$ partículas/ml de *tolRAvio*-OMV, STvio-OMV. B-C. Células B16F10 tratadas com $2,75 \times 10^9$ partículas/ml de *tolRAvio*-OMV por 24 horas, campo claro e campo escuro, respectivamente. As setas destacam a vacuolização. Os núcleos foram corados com DAPI (azul-em/ex: $\sim 350/470$ nm) e violaceína observada em vermelho (em/ex: $\sim 575/675$ nm). As imagens foram adquiridas com ampliação de 20 $\times$ em High-Content Analysis Operetta™ 3.5. Barras de escala: 50 μm144

Figura III.8. Intensidade relativa de OMVs carregadas de violaceína por microscopia de fluorescência de células B16-F10 após 4 horas de exposição a $2,75 \times 10^9$ partículas/ml de *tolRAvio*-OMV e *STvio*-OMV. A significância estatística foi determinada pelo teste Mann-Whitney, **** $P < 0.0001$145

Figura III.9. Imagens representativas do modelo tridimensional B16F10. 2×10^4 células/poço foram semeadas em placa de 96 poços. As células foram incubadas por 48 horas para permitir a agregação. Posteriormente, as células foram tratadas com $2,036 \times 10^{10}$ partículas/ml por 24 horas. A. células sem vesículas. B. células tratadas com SDS (1500 µg/mL). C. *TolRA*-OMV. D. *tolRAvio*-OMV. E. *STvio*-OMV. F. Violaceína (5,08 µM). As imagens foram adquiridas com ampliação de $2 \times$ em High-Content Analysis Operetta™ 3.5. Barras de escala: 50 µm.145

Figura III.10. Avaliação da segurança do tratamento com diferentes doses de OMVs em camundongos. A. Desenho experimental para testar a toxicidade de diferentes doses de OMVs em camundongos inoculados por via subcutânea. B. Taxa de sobrevivência (SR) de camundongos inoculados com diferentes doses de OMVs no ponto final. C-D. Peso corporal de camundongos inoculados com diferentes doses de OMVs durante o período testado. E. Peso dos baços de camundongos inoculados com diferentes doses de OMVs e imagens representativas no ponto final. F. Peso dos fígados de camundongos inoculados com diferentes doses de OMVs no ponto final do experimento. O experimento foi feito duas vezes com cinco camundongos por grupo. Os gráficos mostram os dados de um experimento representativo. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's. *** $p < 0,005$148

Figura III.11. Eficácia antitumoral de OMVs em modelo de melanoma murino. A supressão do crescimento tumoral foi investigada em modelo de melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6JUnib. Camundongos portadores de tumores ($\sim 100 \text{ mm}^3$) foram tratados por via intratumoral, duas vezes por semana por duas semanas com PBS, *tolRA*-OMV (5×10^9), *tolRAvio*-OMV (5×10^9) ou violaceína (306 ng). A. crescimento de tumores depois de iniciados os tratamentos. B. Tamanho do tumor no ponto final do experimento. C-F. Cinética do crescimento individual de tumores de camundongos inoculados com PBS, *tolRA*-OMV (5×10^9), *tolRAvio*-OMV (5×10^9) ou violaceína (306 ng). G. Peso dos camundongos durante os tratamentos. Peso de baço (H) e fígado (I) após os tratamentos. A significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's ** $p < 0,01$150

Figura III.12. Detecção de macrófagos infiltrantes no tecido tumoral de camundongos tratados com OMVs. A. Porcentagem de macrófagos (CD11b+_F4/80+_CD80+). B. Polarização de macrófagos do tipo M1(CD11b+_F4/80+_CD80+) e M2 (CD11b+_F4/80+_CD206+). Foram utilizados três camundongos por grupo. A significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$152

Figura III.13. Efeito de OMVs na expressão gênica de citocinas e mediadores associados com a resposta antitumoral. Nível relativo de expressão de mRNA dos genes Bax (A), VEGF (B), IL-6 (C), iNOS (D), Ki-67 (E) e TNF- α (F). Massa tumoral de camundongos portadores de tumor B16F10 foi coletada quatro horas após a segunda inoculação de OMVs, violaceína ou PBS via intratumoral (n=3). Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SD. A significância estatística

foi determinada por ANOVA de uma via seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's $*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,005$; $****p<0,0001$153

FIGURAS SUPLEMENTARES

Figura suplementar III.1. NTA de OMVs isoladas de sobrenadantes de cultura de *S. enterica* Typhimurium. (A) e (B) histograma mostrando a distribuição de tamanho de partícula e captura de tela do vídeo de ST-OMVs, respectivamente. (C) e (D) histograma mostrando a distribuição de tamanho de partícula e captura de tela do vídeo de STvio-OMVs, respectivamente. (E) e (F) histograma mostrando a distribuição de tamanho de partícula e captura de tela do vídeo de tolRA-OMVs, respectivamente. (G) e (H) histograma mostrando a distribuição de tamanho de partícula e captura de tela do vídeo de tolRAvio-OMVs, respectivamente.....162

Figura suplementar III.2. Peso de fígados e baços de camundongos inoculados com diferentes doses de OMVs. A. Peso dos baços de camundongos inoculados com 1×10^{10} OMVs. B. Peso dos baços de camundongos inoculados com 2×10^{10} OMVs. C. Peso dos fígados de camundongos inoculados com 1×10^{10} OMVs. D. Peso dos fígados de camundongos inoculados com 2×10^{10} OMVs. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's. $*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,005$163

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela II.1. Linhagens, plasmídeos e primers usados para a construção dos mutantes	93
Tabela II.2. Primers utilizados para qRT-PCR.....	98
Tabela II.3. Ensaio de segurança do tratamento com mutantes atenuados por via subcutânea em camundongos C57BL/6JUnib (5 por grupo).....	103

CAPÍTULO III

Tabela III.1. Quantidade estimada de violaceína em μM de acordo com a concentração de OMV/ml pela curva padrão de absorbância da violaceína ($r = 0,9987$).	146
---	-----

TABELA SUPLEMENTAR

Tabela 01. Quantidade estimada de violaceína em μM de acordo com a concentração de OMV/ml pela área de HPLC da violaceína padrão.	161
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

Bax: BCL2 associado a X

BSA: Albumina sérica bovina

cDNA: DNA complementar

DAP: Ácido diaminopimérico

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidade óptica

EGFP: Proteína fluorescente verde aprimorada

GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HPLC: Cromatografia líquida de alta afinidade

IHF: Fator de integração ao hospedeiro

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

iNOS: Sintase de óxido nítrico induzível

IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

Ki-67: Marcador de Proliferação Ki-67

LB: Meio Luria Bertani

Log: Logaritmo na base 10

LPS: Lipopolissacarídeo

MOI: Multiplicidade de infecção

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

Naps: Proteínas associadas a nucleóide

NTA: Análise de rastreamento de nanopartículas

OMS: Organização Mundial de Saúde

pb: Pares de bases

PBS: Tampão fosfato-salino

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PFA: Paraformaldeído

pH: Potencial hidrogeniônico

qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa

rbs: Sítio de ligação do ribossomo

RNA: Ácido ribonucleico

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio

TEM: Microscopia eletrônica de transmissão

TNF- α : Fator de necroses tumoral alfa

UFC: Unidades formadoras de colônia

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

WT: Tipo selvagem

LISTA DE SÍMBOLOS

%: Por cento

° C: Graus Celsius

g: Força centrífuga relativa

kDa: Quilodalton

L: Litro

mM: Milimolar

M: Molar

mg: Miligrama

min: Minuto

ml: Mililitro

mm: Milímetro

ng: nanograma

nm: nanometro

rpm: Rotações por minuto

SD: Desvio padrão

U: Unidade de atividade enzimática

µg: Micrograma

µl: Microlitro

µm: Micrometro

µM: Micromolar

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	24
O gênero <i>Salmonella</i>	24
Salmoneloses e patogenicidade	24
<i>Salmonella enterica</i> e seus produtos bacterianos: Ferramentas para as vacinas e no tratamento de doenças	27
Câncer.....	27
Câncer de bexiga e tratamentos disponíveis.....	28
Melanoma e tratamentos disponíveis	29
<i>Salmonella enterica</i> na imunoterapia do câncer	29
Vantagens do uso de <i>Salmonella</i> na imunoterapia do câncer	30
Programabilidade genética versátil.....	30
Habilidade de se dirigir ao microambiente.....	34
Acumulação seletiva no tumor	35
Penetração intratumoral	36
<i>Salmonella enterica</i> inibe o crescimento tumoral pela ativação do sistema imune	38
OMVs na imunoterapia do câncer.....	41
Produção de OMVs	43
Violaceína.....	44
Referências	46
OBJETIVOS	65
CAPÍTULO I	67
A entrega do gene <i>p53</i> por <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium recombinante leva à morte de células de carcinoma da bexiga humana <i>in vitro</i>	67
Resumo.....	68
I.1 Introdução	69
I.2 Materiais e métodos	71
I. 2.1 Bactérias, plasmídeos, cepas celulares e condições de crescimento	71
I.2.2 Manipulação de DNA.....	71
I.2.3 Crescimento <i>in vitro</i>	72
I.2.4 Análise de invasão e replicação bacteriana	72
I.2.6 Western blotting para detectar a expressão de <i>p53</i>	73
I.2.7 Ensaio de viabilidade celular de calceína AM	73

I.2.8 Análises estatísticas	74
I.3 Resultados e discussão	74
Referências	84
CAPITULO II	88
Atividade antitumoral de mutantes atenuados de <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	88
II. 1 Introdução	90
II. 2 Materiais e Métodos	92
II.2.1. Cepas bacterianas, plasmídeos, primers e meios de cultivo	92
II.2.2. Condições de crescimento	92
II.2.3. Construção de mutantes	92
II.2.4. Linhagem de células cancerígenas	93
II.2.5. Curva de crescimento	93
II.2.6. Virulência no modelo <i>Galleria mellonella</i>	94
II.2.7. Extração de LPS e análise por SDS-PAGE (do inglês: SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	94
II.2.8. Ensaio de Invasão e Sobrevivência	95
II.2.9. Ensaios de toxicidade <i>in vitro</i>	95
II.2.10. Animais	96
II.2.11. Ensaios de segurança dos tratamentos	96
II.2.12. Eficácia antitumoral <i>in vivo</i>	96
II.2.13. Mecanismos envolvidos na resposta antitumoral	97
II.2.13.1. Análise de macrófagos por citometria de fluxo	97
II.2.13.2. RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) para a detecção da expressão gênica	97
II.2.14 Análises estatísticas	98
II.3. Resultados	99
II.3.1. Crescimento <i>in vitro</i> de mutantes e atenuação da virulência no modelo <i>Galleria mellonella</i>	99
II.3.2. Capacidades de invasão e sobrevivência de mutantes em células cancerígenas	99
II.3.4. Citotoxicidade de mutantes de <i>S. enterica</i> Typhimurium em células tumorais	101
II.3.5. Análise da segurança do tratamento com mutantes atenuados de <i>S. enterica</i> Typhimurium	102
II.3.6. Eficácia antitumoral de mutantes atenuados de <i>S. enterica</i> Typhimurium no modelo de melanoma murino	103

II.3.7. Análise dos mecanismos envolvidos na resposta antitumoral	107
II.4. Discussão	109
Referencias	116
CAPITULO III.....	123
Vesículas da membrana externa isoladas de <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium carregadas com violaceína exercem atividade antineoplásica no melanoma	123
III.1. Introdução.....	125
III.2. Materiais e métodos	127
III.2.1. Linhagens bacterianas, plasmídeos e condições de crescimento.....	127
III.2.2. Crescimento <i>in vitro</i> de cepas bacterianas.....	128
III.2.3. Isolamento de OMVs.....	128
III.2.4. Caracterização de OMVs.....	129
III.2.4.1. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (do inglês: Nanoparticle-Tracking Analysis - NTA).....	129
III.2.4.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês: Transmission electron microscopy - TEM).....	129
III.2.4.3. Detecção e quantificação da violaceína presente em OMVs por HPLC	129
III.2.5. Linhagem de células cancerígenas	129
III.2.5.1. Teste de viabilidade celular e determinação da concentração inibitória 50% de OMVs em cultura 2D.....	130
III.2.5.2. Microscopia de células B16F10 tratadas com OMVs.....	130
III.2.5.3. Modelo tridimensional de toxicidade.....	131
III.2.3.6. Microscopia de fluorescência	131
III.2.3.7. Quantificação de violaceína por densidade óptica.....	131
III.2.6. Camundongos	131
III.2.6.1. Avaliação da segurança dos tratamentos com OMVs.....	132
III.2.6.2. Avaliações do efeito antitumoral	132
III.2.6.3. Análise da resposta antitumoral	133
III.2.7. Análises estatísticas	134
III.3. Resultados	134
III.3.1. Caracterização de OMVs: Deleção dos genes <i>tolR</i> e <i>tolA</i> aumenta significativamente a produção de OMVs.....	134
III.3.2. Efeito citotóxico de OMVs <i>in vitro</i>	139
III.3.2. Captação de violaceína por células tumorais.....	143

III.3.2. Estimativa da quantidade de violaceína presente nas OMVs por absorbância.....	146
III.3. Avaliação da segurança dos tratamentos com OMVs carregadoras e não carregadoras de violaceína	147
III.3. Eficácia antitumoral de OMVs carregadoras e não carregadoras de violaceína no modelo de melanoma murino	149
III. 3. Investigação da resposta imune desencadeada por OMVs carregadoras e não carregadoras de violaceína.....	150
III. Discussão.....	154
Referências	164
CONCLUSÃO GERAL.....	173
PERSPECTIVAS PARA A PESQUISA	175

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Salmonella*

Salmonella é um gênero que pertence à família Enterobacteriaceae, constituída por bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, não formadoras de esporos, oxidases negativas, catalases positivas, intracelulares e geralmente móveis por presença de flagelos (com algumas exceções, como *Salmonella enterica* Gallinarum e *Salmonella enterica* Pullorum) (RYAN; O'DWYER; ADLEY, 2017). A temperatura ótima de crescimento de *Salmonella* é 37 °C, mas foi registrado que a mesma pode crescer entre 2 °C e 54 °C (XYLIA et al., 2022). Na atualidade, o gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (GARAI; GNANADHAS; CHAKRAVORTTY, 2012). A espécie *Salmonella enterica* tem mais de 2600 sorovares agrupados em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*), que se distinguem por variações nos antígenos O (somático) e H (flagelar) (GARAI; GNANADHAS; CHAKRAVORTTY, 2012; JAJERE, 2019). Cerca do 99% das infecções por *Salmonella* em humanos e animais de sangue quente são atribuídas a *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, enquanto as outras cinco subespécies de *Salmonella enterica* e a única subespécie de *Salmonella bongori* são raras em seres humanos e geralmente são associadas a animais de sangue frio, incluindo répteis (BRANCHU; BAWN; KINGSLEY, 2018; JAJERE, 2019).

Salmoneloses e patogenicidade

A Salmonelose é uma doença que tem grande impacto na saúde pública e na economia, sendo responsável por milhares de mortes em todo o mundo, especialmente em crianças de países não industrializados (JAJERE, 2019). A salmonelose é causada pela transmissão de *Salmonella* pela via fecal-oral. Frequentemente, *Salmonella* causa infecção em seres humanos depois que consomem alimentos contaminados com *Salmonella* (ovos, carne, produtos láteos, água e verduras) (PHAM; MCSORLEY, 2015). Quando se ingerem doses infectante, entre 10^5 a 10^6 bactérias, *Salmonella* causa Salmonelose pela colonização do trato intestinal. A gravidade da infecção causada por *Salmonella* depende da sorovariedade e do estado imunológico do hospedeiro. Por exemplo, idosos, pessoas imunocomprometidas e crianças menores de cinco anos são vulneráveis a Salmonelose (EHUWA; JAISWAL; JAISWAL, 2021).

Diferentes sorovares do gênero *Salmonella* têm preferência por espécies distintas, assim como causam diversas manifestações clínicas que vão desde uma gastroenterite autolimitada até infecções sistêmicas graves. Baseando-se em seus fatores de virulência, os sorovares de *S. enterica* podem ser divididos em sorovares tifoide e não tifoide (HUME et al., 2017). *S. enterica* Typhi por exemplo, é estritamente restringida a humanos e primatas superiores e é caracterizada por causar infecção sistêmica. Por outro lado, os sorovares não-tifoides, como *S. enterica* Typhimurium e *S. enterica* Enteritidis, possuem uma grande variedade de hospedeiros e, com regularidade, causam diarreia autolimitada em indivíduos imunocompetentes, mas em pessoas imunocomprometidas ou desnutridas, crianças menores de cinco anos e idosos podem causar morte (HUME et al., 2017). *S. enterica* Typhimurium e *S. enterica* Enteritidis são bem conhecidos por causar infecção sistêmica em camundongos, muito semelhante à infecção causada por *S. enterica* Typhi em humanos (ZHA; GARRETT; SUN, 2019). Apesar das diferenças quanto às manifestações clínicas dos diferentes sorovares, todos eles têm que enfrentar a mesma barreira inicial para causarem a infecção: a camada epitelial intestinal (HUME et al., 2017).

Após a ingestão oral e passagem pelo estômago, a bactéria atinge o intestino, superando a microbiota intestinal a traves da expressão do sistema de secreção tipo 6 (SST6). O SST6, codificado por genes da ilha de patogenicidade VI (SPI-6), tem um papel importante no antagonismo inter bacteriano. Previamente foi demonstrado *in vitro* que *S. enterica* Typhimurium mata as bactérias comensais usando o SST6 e que a atividade antimicrobiana de este sistema é essencial para a colonização dentro do intestino do hospede (SANA et al., 2016).

A colonização de *S. enterica* na luz intestinal induz a inflamação, uma resposta do hospedeiro que também contribui para a colonização (ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017). Posteriormente *S. enterica* chega no íleo distal e invade o epitélio intestinal, preferencialmente as células M (células especializadas que revestem as placas de Peyer). Nas células M *Salmonella* se adere usando as fimbrias. A partir das células M, a bactéria passa a os macrófagos subjacentes e às células dendríticas. A capacidade de invasão celular de *S. enterica* é conferida principalmente por genes de virulência codificados na ilha de patogenicidade I (SPI-1). Os genes dessa ilha codificam proteínas que constituem um sistema de secreção especializado do tipo III (SST3), que transporta e secreta proteínas bacterianas para o citosol das células hospedeiras para modular sua função. Entre as proteínas secretadas se encontram SipC, SipD, SopB, SopE e SopE2. As proteínas secretadas dentro das células hospedeiras ativam vias de transdução de sinal e induzem o rearranjo

do citoesqueleto de actina, afetam a membrana celular, além de promover a desconexão das junções epiteliais celulares, facilitando a invasão de *Salmonella* incluso por células não fagocitárias (PHAM; MCSORLEY, 2015). Estas proteínas efetoras também podem induzir a inflamação intestinal mediada pela ativação de NF- κ B e posterior produção de mediadores pro inflamatórios como iNOS, IL-1 β e IL-23. O ambiente inflamado gera subprodutos metabólicos como fontes de energia alternativos, que podem ser utilizados para o processo de invasão da *Salmonella* (ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017).

Além dos genes da SPI-1, outros genes também participam na invasão. Por exemplo, genes da ilha de patogenicidade IV (SPI-4), os quais codificam um sistema de secreção especializado do tipo I (SST1). O SST1 junto com a proteína SiiE jogam um papel chave para iniciar o contato com as células do epitélio intestinal. As proteínas produzidas pelos genes da ilha de patogenicidade V (SPI-5) mediam a endocitoses mediada por bactérias nas células epiteliais. A proteína SopB, efector da SPI-5 é translocado ao citosol das células hospedeiras pelo SST3 aonde promove a invasão e ondulação da membrana (KNODLER et al., 2002; GERLACH et al., 2007; ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017).

Após a invasão, a bactéria se aloja em um vacúolo contendo *Salmonella* (SCV) construído pela própria célula. A *Salmonella* pode ser destruída pela fusão entre o SCV e os lisossomos carregados de enzimas digestivas. No entanto, *Salmonella* pode sobreviver e se replicar intracelularmente graças aos genes localizados na ilha de patogenicidade II (SPI-2), ilha de patogenicidade III (SPI-3) e o sistema regulador de dois componentes PhoP-PhoQ (GROISMAN; DUPREY; CHOI, 2021). O SPI-2 codifica o sistema de secreção especializado do tipo III (SST3-2) a partir do qual serão transportadas proteínas efetoras que contribuiram a sobrevivência intracelular. Também tem sido relatado que *Salmonella* também escapar do SCV e se replicar no citoplasma de células não fagocíticas graças aos genes da SPI-1 (KNODLER et al., 2002; GERLACH et al., 2007; ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017). Proteínas efetoras codificadas pela SPI-2 são secretadas no SCV e evitam sua fusão com os lisossomos para permitir a sobrevivência intracelular e o posterior transporte no sistema retículo endotelial, alcançando diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro (JENNINGS; THURSTON; HOLDEN, 2017). Os macrófagos são a principal célula a partir da qual *Salmonella* se espalha a os órgãos. Macrófagos infectados por *Salmonella* são transportados ao fígado e baço a partir do gânglio linfático mesentérico e o torrente sanguíneo (KNODLER et al., 2002; GERLACH et al., 2007; ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017).

***Salmonella enterica* e seus produtos bacterianos: Ferramentas para as vacinas e no tratamento de doenças**

As propriedades únicas de *S. enterica* e de seus derivados (como metabolitos e vesículas de membrana externa (do inglês: *Outer membrane vesicles*: OMVs) têm permitido que sejam usados no design de vacinas e no tratamento de doenças como diabetes (MBONGUE et al., 2020; COBB et al., 2021), vírus de influenza (KONG et al., 2012), vírus da imunodeficiência humana (CHIN'OMBE, 2013) e câncer (ALSHATWI; SUBASH-BABU; ANTONISAMY, 2016; WEI, 2015; KIM et al., 2017; ALY et al., 2021; HASHIMI; XU). Entre as propriedades de *S. enterica*, temos a facilidade de modificação genética. Essa bactéria pode ser modificada geneticamente para transformar cepas patogênicas em cepas atenuadas capazes de transportar antígenos homólogos e heterólogos para interior das células hospedeiras (ZHANG; JEZA; PAN, 2008; KONG et al., 2012; HASSAN et al., 2019; HEWAWADUGE; SENEVIRATHNE; LEE, 2020;). Cepas atenuadas de *S. enterica* e suas OMVs têm sido usadas eficientemente como vetor de antígenos proteicos (HEWAWADUGE; SENEVIRATHNE; LEE, 2020), moléculas citotóxicas (HASHIMI; XU; WEI, 2015; KIM et al., 2017) e material genético (KONG et al., 2012). Outra propriedade interessante da *S. enterica* e suas OMVs é que podem atuar como potentes adjuvantes naturais que promovem a ativação de células do sistema imune inato e adaptativo, assim como a secreção de citocinas e outros mediadores inflamatórios de grande interesse no tratamento de doenças como o câncer (KURTZ; GOGGINS; MCLACHLAN, 2017; ALY et al., 2021).

Câncer

Na atualidade, o câncer representa uma carga para o sistema de saúde mundialmente, carente de um tratamento eficiente. O câncer é um grupo de doenças malignas que podem afetar qualquer parte do corpo (SENGA; GROSE, 2021). A complexidade do câncer envolve o acúmulo de mutações, seguido da alteração de vias moleculares e celulares que resultam na proliferação descontrolada de células (HANAHAHAN; WEINBERG, 2011; SENGAR; GROSE, 2021). Apesar das políticas de prevenção do câncer implementadas por alguns países, a incidência global da doença continua aumentando, especialmente em países de alta renda per capita, em grande parte devido ao envelhecimento da população e ao estilo de vida pouco saudável das pessoas destes países (TORRE et al., 2016; HULVAT, 2020). Para 2040, espera-se que mais de 28 milhões de pessoas sejam diagnosticadas com câncer (SUNG et al., 2021).

A taxa de mortalidade também continua aumentando. O aumento da mortalidade parece estar relacionado à economia dos países (SUNG et al., 2021), sendo a taxa de mortalidade maior em países de baixa e média renda quando comparados a países de alta renda. Essa diferença provavelmente pode ser explicada devido às dificuldades de acesso a serviços de diagnósticos de qualidade e à carência de tratamentos exitosos para os diferentes tipos de câncer (HULVAT, 2020; SUNG et al., 2021). Conforme as projeções para 2040, o câncer de bexiga será o terceiro câncer mais diagnosticado em homens, e o melanoma será o segundo mais comum em mulheres e homens (RAHIB et al., 2021).

Câncer de bexiga e tratamentos disponíveis

O câncer de bexiga é um dos cânceres mais comuns no mundo, com mais de 580.000 novos casos diagnosticados e mais de 212.530 mortes em 2020 (SUNG et al., 2021). Aproximadamente, 90% dos casos de câncer de bexiga diagnosticados são classificados como carcinomas de células uroteliais (CHALASANI; CHIN; IZAWA, 2009). O tratamento padrão para o câncer de bexiga envolve a ressecção transuretral do tumor, seguida de terapia adjuvante (quimioterapia ou terapia intravesical com *Bacillus Calmette-Guérin*, ou BCG). No entanto, as taxas de recorrência são altas e a progressão da doença é comum (RINK et al., 2013).

A progressão do tumor e o mau prognóstico têm sido associados a mutações no gene *p53* em pacientes com carcinoma urotelial (SALINAS-SÁNCHEZ et al., 2008). O fator de transcrição *p53* é uma proteína supressora de tumor essencial, e mutações em *p53* são observadas em aproximadamente 50% dos cânceres humanos diagnosticados (VAN LEEUWEN, 2020). Estudos anteriores demonstraram que a restauração funcional de *p53* é uma terapia promissora para o tratamento de diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer de bexiga (PAGLIARO et al., 2003a). No entanto, a maioria dos estudos sobre a restauração funcional do *p53* usa vírus (PAGLIARO et al., 2003a, 2003b) ou nanopartículas (KONG et al., 2019) para a entrega de genes. Poucos estudos exploraram o uso potencial de vetores bacterianos para entrega de *p53* a células cancerígenas da bexiga (JIANG et al., 2013). Considerando que o BCG é amplamente utilizado na terapia do câncer de bexiga, o uso de cepas atenuadas de *S. enterica* Typhimurium para a mesma finalidade é uma opção promissória, principalmente porque essa bactéria é um bom vetor para moléculas terapêuticas (GAO et al., 2019).

Melanoma e tratamentos disponíveis

O melanoma é o tipo mais agressivo, grave e metastático entre todos os tipos de câncer de pele. A maioria das mortes por câncer de pele é atribuída ao melanoma (SUNG et al., 2021). A incidência desse tipo de câncer tem aumentado desde 1998 (RAHIB et al., 2021). As estatísticas globais de câncer de 2020 reportam 324.635 novos casos, com mais de 57.000 mortes em todo o mundo (SUNG et al., 2021). O elevado número de óbitos por melanoma deve-se, em grande parte, à sua natureza altamente metastática (TASDOGAN et al., 2020). As opções de tratamento para o melanoma incluem a ressecção cirúrgica do tumor e margens no local do tumor para os estágios iniciais, em combinação com quimioterapia com dacarbazina, ou imunoterapia com interleucina 2 (IL-2), especialmente para estágios metastáticos (LUKE et al., 2017; LEE; BRADY, 2021).

A imunoterapia (anticorpos, interleucinas e inibidores de *checkpoint*) tem melhorado substancialmente a supervivência a 5 anos dos pacientes com melanoma metastático, passando de 10% a 17% (MANOLA et al., 2000; MILLER et al., 2019; ROBERT; GAUTHERET, 2022). A imunoterapia também tem diminuído a taxa de mortalidade. No entanto, muitos pacientes apresentam resistência inerente a essas terapias ou tumores que reaparecem após a ressecção inicial e desenvolvem resistência adquirida devido à heterogeneidade genética dessa doença, o que leva ao aparecimento de subtipos de melanoma (ASCIERTO et al., 2019; BOLICK; GELLER, 2021; PATTON et al., 2021). Portanto, novas estratégias terapêuticas são urgentemente necessárias para o tratamento do melanoma.

***Salmonella enterica* na imunoterapia do câncer**

A imunoterapia teve um impacto substancial na oncologia nas últimas décadas. Seu impacto é evidenciado com a aprovação de medicamentos imunoterápicos pela Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (Inglês: *Food and Drug Administration* – FDA) para o tratamento de diferentes tipos de câncer, como melanoma e câncer de bexiga (GALLUZZI et al., 2014; GAO et al., 2019; HAN et al., 2020; ROBERT; GAUTHERET, 2022). Atualmente, mais de dez medicamentos imunoterapêuticos foram aprovados pela FDA para o tratamento do melanoma (LUKE et al., 2017). O BCG tem sido usado por mais de 30 anos como tratamento imunoterapêutico intravesical em pacientes com câncer de bexiga depois da recessão cirúrgica (HAN et al., 2020). No entanto, alguns desses tratamentos têm sido associados a ausência de efeito, resistência inerente ou reações adversas graves (LUKE et al., 2017; HAN et al., 2020). Portanto,

há uma necessidade urgente de se desenvolver novas estratégias imunoterapêuticas para o tratamento do câncer de bexiga e do melanoma.

A imunoterapia mediada por bactérias é uma estratégia promissora para o tratamento do câncer (GALON; BRUNI, 2019). Diferentes bactérias dos gêneros *Salmonella* (FELGNER et al., 2020) *Escherichia* (KANG et al., 2020), *Clostridium* (STAEDTKE et al., 2016) e *Listeria* (VITIELLO et al., 2019) têm sido foco de pesquisas e têm demonstrado atividade antitumoral, entre elas, *S. enterica* Typhimurium se destaca consideravelmente, sendo a bactéria mais estudada para o tratamento do câncer. *S. enterica* Typhimurium pode atuar como potente adjuvante capaz de ativar a resposta imune inata e adaptativa (FELGNER et al., 2020). Embora *S. enterica* seja um microrganismo causador de salmoneloses, diferentes estudos pré-clínicos mostraram seu potencial antitumoral em tumores sólidos e metastáticos (TOSO et al., 2002; MI et al., 2019). Algumas cepas atenuadas de *S. enterica* têm sido aprovadas pela FDA para testes clínicos (TOSO et al., 2002). *S. enterica* têm propriedades específicas que fazem dela um candidato potencial na imunoterapia do câncer.

Vantagens do uso de *Salmonella* na imunoterapia do câncer

Programabilidade genética versátil

O genoma de *S. enterica* pode ser modificado geneticamente para garantir a segurança e aumentar a eficácia terapêutica. Cepas patogênicas de *S. enterica* têm sido atenuadas pela deleção de genes de virulência (CLAIRMONT et al., 2000; FRAHM et al., 2015), metabólicos (MIYAKE et al., 2019) ou reguladores transcricionais (HIRSCH WERLE et al., 2016). A deleção dos genes *purI* e *msbB* do cromossomo de *S. enterica* Typhimurium14028 resultou na cepa VNP20009, uma cepa com LD₅₀ aumentada em mais de 10.000 vezes em camundongos. O *purI* é um gene essencial para a síntese de adenina. Cepas carentes do gene *purI* precisam de uma fonte exógena de purina. Essa modificação genética faz com que VNP20009 tenha maior capacidade para se acumular em tumores, já que são regiões ricas em purina (CLAIRMONT et al., 2000). A deleção do gene *msbB* induz uma menor resposta inflamatória que uma cepa tipo selvagem, devido à ausência de miristoilação terminal de lipídio A do lipopolissacarídeo (LPS). Portanto, as modificações genéticas em VNP20009 permitem que seja uma cepa com um ótimo perfil de segurança e melhor capacidade de se acumular no tecido tumoral (ZHANG et al., 2016).

Modificações nos genes que codificam para o LPS podem melhorar o perfil de segurança de *S. enterica*. Previamente, foi demonstrado que cepas de *S. enterica* com deleções no LPS têm menos probabilidade de causar sepse e são mais suscetíveis ao sistema imune. O potencial anticancerígeno de diferentes mutantes com deleções no LPS foi testado em modelo murino de câncer de cólon e rim. Alguns mutantes mostraram um ótimo perfil de segurança, no entanto, a eficácia terapêutica foi comprometida. O mutante $\Delta rfaG$ de *S. enterica* Typhimurium, complementado com o gene *rfaG* sob o controle da arabinose, mostrou um bom balanço entre segurança e eficácia terapêutica (FRAHM et al., 2015). Esses resultados indicam que, embora as modificações no LPS representem uma estratégia atraente para a construção de cepas com bom perfil de segurança, o equilíbrio adequado é essencial para que essas modificações não afetem as habilidades antitumorais.

Mutantes com fenótipo de atenuação retardada regulada poderiam proporcionar o equilíbrio adequado entre atenuação e eficácia antitumoral. A deleção do gene *pmi* resulta em uma cepa atenuada devido ao LPS incompleto. O gene *pmi* codifica para a enzima fosfomanose isomerase, uma enzima essencial para a conversão de frutose 6-fosfato em manose 6-fosfato. A manose é um componente principal das cadeias laterais de antígeno O dos LPS e é necessária para a virulência de *S. enterica*. Cepas carentes do gene *pmi* são altamente atenuadas e imunogênicas. Além disso, o mutante Δpmi pode sintetizar o LPS completo quando é cultivado na presença de manose. No entanto, *in vivo* a expressão de LPS é incompleta devido à ausência de manose (COLLINS; ATTRIDGE; HACKETT, 1991). Essa característica confere um fenótipo de atenuação retardada e maior segurança para o hospedeiro, uma vez que linhagens com LPS incompletos são mais suscetíveis ao sistema imunológico.

Cepas deficientes nas biossínteses de aminoácidos também foram construídas para aumentar a eficácia antitumoral e o perfil de segurança. *S. enterica* Typhimurium A1-R (dependente de leucina e arginina) prolifera-se seletivamente em tecidos tumorais sobre tecidos normais, provavelmente devido ao fato de receber esses aminoácidos do microambiente tumoral (MIYAKE et al., 2019). A capacidade antitumoral de A1-R foi demonstrada em diferentes modelos murinos de câncer, incluindo o melanoma, e não foi observada toxicidade grave em tecidos normais, inclusive em doses altas (10^9) (MIWA et al., 2014; KAWAGUCHI et al., 2018; MURAKAMI et al., 2018; MIYAKE et al., 2019). Outras cepas deficientes de genes metabólicos

que foram avaliadas na terapia contra o câncer são as cepas deficientes na biossíntese de aminoácidos aromáticos, como os mutantes *aroA*, *aroC* e *aroD* (GRILLE et al., 2014; YOON et al., 2017; BASCUAS et al., 2018). A atenuação desses mutantes deve-se à sua incapacidade de se replicar e sobreviver em células de mamíferos (YOON et al., 2017), o que melhora consideravelmente seu perfil de segurança para o hospedeiro.

Cepas patogênicas de *S. enterica* Typhimurium também podem ser atenuadas pela deleção de genes reguladores da expressão gênica. Por exemplo, o mutante Δ ppGpp, incapaz de sintetizar o regulador da expressão gênica guanosina 5'-difosfato-3'-difosfato (ppGpp) demonstrou ser atenuado e eficaz na supressão do crescimento de tumores de cólon (PHAN et al., 2015). Cepas mutantes do regulador transcricional IHF (*Integration host fator*) também foram testadas previamente em nosso grupo em modelos murinos de câncer de bexiga e melanoma (HIRSCH WERLE et al., 2016; TIBO, 2019). IHF é uma proteína associada ao nucleóide bacteriano que regula positivamente a expressão de genes de virulência, patogenicidade, flagelares e de quimiotaxia (MANGAN et al., 2006; LEITE et al., 2017); IHF é considerada um regulador da expressão gênica em nível global (MANGAN et al., 2006).

A forma predominantemente ativa de IHF é em heterodímero, formado por uma subunidade IHF- α e uma IHF- β , proteínas codificadas pelos genes *ihfA* e *ihfB* (RICE et al., 1996). No entanto, estudos prévios têm demonstrado que as subunidades também podem formar homodímeros capazes de se unir ao DNA (DILLON; DORMAN, 2010). Os genes *ihfA* e *ihfB* encontram-se em diferentes locais no cromossomo. O IHF liga-se preferencialmente a uma sequência de DNA (WATCAANNNTTTR (W: A ou T, R: purina e N: qualquer base)) e induz a curvatura do DNA em ângulos de até 180° (GOODMAN et al., 1999); a flexão pode influenciar a transcrição, facilitando o contato entre proteínas reguladoras e a RNA polimerase (RICE, 1997). Nosso grupo demonstrou que mutantes simples e duplos para os genes *ihfA* e *ihfB* são atenuados e têm atividade antitumoral (HIRSCH WERLE et al., 2016; TIBO, 2019). A deleção do gene *ihfA* reduz a virulência de *S. enterica* Typhimurium em camundongos sem afetar sua capacidade de invadir e sobreviver em células de mamíferos. Essa cepa foi capaz de inibir o crescimento de tumores de melanoma em um modelo murino (HIRSCH WERLE et al., 2016). O tratamento do duplo mutante de *S. enterica* Typhimurium Δ *ihfA* Δ *ihfB* em combinação com a violaceína inibiu o desenvolvimento de tumores de bexiga, inclusive o efeito foi melhor que o tratamento com BCG

(usado atualmente no tratamento de câncer de bexiga) (TIBO, 2019). Esses resultados sugerem que a inativação de genes que regulam a expressão gênica é uma estratégia atrativa para alcançar a atenuação da virulência de *S. enterica*. A introdução de modificações genéticas adicionais pode aumentar a ação antitumoral de *S. enterica*.

A eficácia terapêutica de *S. enterica* pode ser melhorada quando usada como vetor para a entrega de agentes anticancerígenos (PHAN et al., 2020). Diferentes estudos têm demonstrado maior inibição do crescimento do tumor quando *S. enterica* é usada para entregar agentes anticancerígenos. *S. enterica* tem sido usada para entregar material genético para a expressão eucariótica de agentes antitumorais ou a expressão de RNA de interferência (RNAi) (LEE; WU; SHIAU, 2005; YANG et al., 2008; GUO et al., 2011; YOON et al., 2018; ZHAO et al., 2020), citotóxicos para induzir apoptose de células tumorais (CAMACHO et al., 2016; YANG et al., 2016), imunomoduladores para aumentar a resposta imune antitumoral (PARK et al., 2016; AUGUSTIN et al., 2021) e enzimas de conversão de pró-drogas (NEMUNAITIS et al., 2003; FRIEDLOS et al., 2008). A administração de agentes anticancerígenos devem ser rigorosamente controlada para garantir a segurança e a eficácia do tratamento (CAMACHO et al., 2016). A capacidade natural de *S. enterica* para dirigir-se ao tumor e proliferar-se nele contribui na entrega direcionada de agentes anticancerígenos. No entanto, algumas modificações genéticas podem melhorar a entrega direcionada.

Diversas estratégias têm sido propostas para garantir um controle rigoroso da entrega de agentes anticancerígenos por *S. enterica*. Por exemplo, promotores induzíveis por hipóxia (HIP-1, NirB e FNR), promotor de L-arabinose (pBAD) e promotor de tetraciclina (pTet) têm sido usados (RYAN et al., 2009). Outras estratégias têm sido desenvolvidas com base no uso de um sistema de secreção tipo III (T3SS). O T3SS codificado pela ilha de patogenicidade de *S. enterica* Typhimurium permite a translocação eficiente de agentes anticancerígenos para o citosol das células tumorais (XIONG et al., 2010; XU et al., 2014). Mutantes do gene *sifA* também têm recebido atenção especial (CAMACHO et al., 2016), pois o gene *sifA* é essencial para manter a integridade do vacúolo que protege a *S. enterica* da ação dos lisossomos. A deleção desse gene permite que *S. enterica* escape do endossomo e se localize no citosol (BEUZÓN et al., 2000). Essa mutação é uma abordagem útil, mesmo quando é necessário entregar vetores de expressão eucarióticos (BEUZÓN et al., 2000; CAMACHO et al., 2016). As estratégias mencionadas

permitem que *S. enterica* Typhimurium funcione como uma fábrica intracelular de agentes anticancerígenos que ajudam a aumentar a eficácia terapêutica bacteriana.

Habilidade de se dirigir ao microambiente

Evidência prévia sugere que *S. enterica* tem afinidade com o microambiente tumoral. Os mecanismos pelos quais *S. enterica* se dirige especificamente ao tecido tumoral não estão totalmente elucidados, no entanto está bem estabelecido que no microambiente tumoral existem condições químicas (pH ácido, hipoxia e moléculas únicas altamente expressas) que atraem essa bactéria ao microambiente tumoral (WOJTKOWIAK et al., 2011; SILVA-VALENZUELA et al., 2016). O pH ácido do microambiente tumoral inibe a vigilância imunológica, pois limita a atividade das células citotóxicas e dificulta a secreção de citocinas (MÜLLER; FISCHER; KREUTZ, 2000; FLENTIE et al., 2012). Estudos prévios demonstraram que *S. enterica* Typhimurium pode sobreviver em pH ácido característico do microambiente tumoral e redirecionar as células imunes para o microambiente tumoral (FLENTIE et al., 2012).

O microambiente tumoral é formado em sua maioria por regiões hipóxicas (1% de oxigênio) e anóxicas (0% de oxigênio); os vasos sanguíneos prematuros, altamente irregulares e mal organizados, dão origem a essas regiões com insuficiente suprimento de oxigênio (RYAN et al., 2009). Essas regiões são inacessíveis para os tratamentos convencionais como radioterapia e quimioterapia (ZHANG et al., 2016). *S. enterica* Typhimurium, por ser anaeróbica facultativa, pode superar esse problema, pois essa bactéria pode detectar e se direcionar preferencialmente a regiões hipóxicas de tumores sólidos, inibindo, assim, sua taxa de crescimento ou causando regressão (YU et al., 2012). A cepa *S. enterica* Typhimurium YB1 foi desenhada para sobreviver apenas a condições hipóxicas e inibiu o crescimento de tumores de mama e fígado em modelo murino sem causar danos graves ao tecido normal (YU et al., 2012; LI et al., 2017).

Promotores induzíveis por hipóxia, como HIP-1, NirB e FNR, têm sido usados para a expressão direcionada de genes anticancerígenos no local do tumor, dessa forma a citotoxicidade é reduzida nos tecidos normais e aumentada no microambiente tumoral (RYAN et al., 2009).

No tecido tumoral também existem regiões normóxicas (5% de oxigênio), presentes especialmente próximas aos vasos sanguíneos (CASAZZA et al., 2014). As regiões com níveis normais de oxigênio reduzem a eficiência de bactérias anaeróbicas obrigatórias usadas na terapia do câncer, como *Clostridium spp.* *Clostridium spp* não pode sobreviver ou se replicar em oxigênio.

Os anaeróbios obrigatórios não são adequados para erradicar pequenos tumores metastáticos, devido à sua necessidade de condições anóxicas, o que resulta em colonização bacteriana apenas na área profunda do tumor e em ausência de bactérias na borda do tumor (THEYS et al., 2001), levando à recorrência do tumor. No entanto, bactérias anaeróbicas facultativas, como *S. enterica*, podem ser distribuídas por todo o tecido de tumores pequenos (não hipóxicos), grandes e metastáticos (com suprimento de vasos sanguíneos), incluindo regiões anóxicas, hipóxicas e normóxicas, de tal forma que podem ser usadas para distribuir agentes anticancerígenos em todo o tumor e não apenas em regiões específicas (THEYS et al., 2001).

As células mortas no microambiente tumoral liberam moléculas ou nutrientes, como etanolamina, aminoácidos e açúcares, que aumentam o direcionamento de *S. enterica* ao tumor (ZHAO et al., 2006; FELGNER et al., 2016; SILVA-VALENZUELA et al., 2016; YU et al., 2012; ZHENG et al., 2017). O fosfolipídio etanolamina é utilizado por *S. enterica* como fonte alternativa de carbono e atua como agente quimiotático (SILVA-VALENZUELA et al., 2016). Cepas de *S. enterica* com deleções na via biossintética de aminoácidos aromáticos também são atraídas ao microambiente tumoral. As cepas A1-R e Δ ppGpp de *S. enterica* Typhimurium mostraram orientação tumoral altamente específica (ZHAO et al., 2006; ZHENG et al., 2017). Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que *S. enterica* Typhimurium é atraída para as células tumorais pelos receptores de serina, aspartato e ribose/galactose presentes na membrana das bactérias, que podem detectar esses açúcares secretados pelas células cancerígenas (FELGNER et al., 2016). O microambiente tumoral não apenas fornece condições para *S. enterica* Typhimurium atingir o tumor, mas também fornece um nicho adequado para que *S. enterica* Typhimurium se acumule e se replique nessas regiões imunoprivilegiadas.

Acumulação seletiva no tumor

A eficácia de *S. enterica* para se acumular seletivamente no tumor já foi reportada em diferentes tipos de câncer (CLAIRMONT et al., 2000; GAO et al., 2020). *S. enterica* Typhimurium KST0650 administrada em camundongos portadores de tumor CT26 foi eliminada da circulação e de outros órgãos normais (baço, pulmão, fígado e rim) nos dias 3 e 14, respectivamente; enquanto permaneceu nos tecidos tumorais até o dia 28 após a inoculação. Além disso, essa cepa replicou-se em níveis extraordinariamente altos no tecido tumoral, onde atingiu até 10^9 UFC/g de tecido tumoral no segundo dia após a inoculação, sem causar danos nos camundongos (GAO et al., 2020).

No modelo de tumor pancreático, foi possível acompanhar em tempo real a distribuição e o acúmulo de *S. enterica* TyphimuriumVNP20009 que carrega cDNA de luciferase. O sistema mostrou que *S. TyphimuriumVNP20009* se acumulou e induziu apoptose tanto em regiões periféricas do tumor como em regiões necróticas (ZHOU et al., 2016).

Os tratamentos convencionais geralmente resultam em danos às células e tecidos normais; no entanto, o uso de *S. enterica* pode superar essa limitação. O acúmulo específico de *S. enterica* no microambiente tumoral pode permitir a administração de moléculas mais tóxicas direcionadas ao tumor, sem haver os efeitos colaterais em tecidos adjacentes saudáveis (CASAZZA et al., 2014; BASCUAS et al., 2018;). Para aumentar os efeitos terapêuticos de *S. enterica* Typhimurium e superar as limitações associadas à administração de interferon γ (IFN- γ) para tratamento de melanoma, uma cepa capaz de secretar IFN- γ no citosol das células hospedeiras foi construída usando o T3SS de *S. enterica* Typhimurium BRD509. O IFN- γ é um candidato promissor como agente anticancerígeno. Entretanto, seu uso na terapia do câncer apresenta algumas limitações, como a citotoxicidade associada à sua administração direta e sua meia-vida curta. *S. enterica* Typhimurium BRD509 que secreta IFN- γ mostrou crescimento seletivo em melanoma de camundongo B16F10 quando administrado por três vias de administração (intravenosa, oral e subcutânea), e o tratamento subcutâneo inibiu significativamente o crescimento do tumor (YOON et al., 2017). Além disso, não foram encontrados sinais histopatológicos de danos ou efeitos adversos em tecidos normais. Assim, esses resultados mostram a capacidade de *S. enterica* Typhimurium para atacar preferencialmente células cancerosas sem gerar toxicidade significativa para tecidos normais (YOON et al., 2017).

Penetração intratumoral

A quimioterapia é muitas vezes ineficaz devido à incapacidade de penetrar em regiões pouco vascularizadas e com quantidades crescentes de matriz extracelular que caracterizam o microambiente tumoral (AGARWAL et al., 2013; ZHANG; FORBES, 2015). Os agentes quimioterapêuticos entram no tecido tumoral pela vasculatura; portanto, em regiões com grandes distâncias intercapilares ou fluxo sanguíneo lento, a penetração tende a ser baixa, impedindo que os as drogas atinjam concentrações eficientes (ZHANG; FORBES, 2015). A matriz extracelular atua como uma barreira biofísica contra terapias citotóxicas e em tumores sólidos, sendo composta principalmente por altos níveis de elastina, ácido hialurônico, colágeno fibrilar, fibronectina e

lamininas (EBELT et al., 2020). Tem sido demonstrado que, em tumores, a deposição de matriz extracelular por células tumorais e fibroblastos associados ao câncer é excessiva, resultando na ineficácia da terapia sistêmica na penetração reduzida de quimioterápicos (HENKE; NANDIGAMA; ERGÜN, 2019; ZARGAR et al., 2019).

S. enterica Typhimurium pode superar essa limitação devido à sua capacidade de penetrar em regiões de vasculatura deficiente e alcançar regiões de difícil acesso aos medicamentos administrados sistemicamente (ZHANG; FORBES, 2015; YOON et al., 2018). Trabalhos anteriores usaram *S. enterica* Typhimurium χ 8768 atenuada para expressão induzível estritamente regulada da hialuronidase bacteriana em tumores ortotópicos que expressam altos níveis de ácido hialurônico. *S. enterica* Typhimurium χ 8768 administrada sistemicamente penetrou os tumores dois dias após a inoculação. Uma vez lá, a expressão da hialuronidase foi ativada por uma única injeção de arabinose para degradar o ácido hialurônico específico do tumor e reduzir o risco de degradação da matriz extracelular de tecidos saudáveis. A hialuronidase expressada por *S. enterica* Typhimurium degradou o ácido hialurônico específico do tumor e melhorou significativamente a eficácia do quimioterápico gencitabina. Além disso, a degradação do ácido hialurônico resultou em uma maior penetração de *S. enterica* Typhimurium em todo o tumor (EBELT et al., 2020).

S. enterica Typhimurium pode penetrar profundamente no microambiente tumoral e acumular-se em concentrações altas devido às suas propriedades de autopropulsão (TOLEY; FORBES, 2012; THORNLOW et al., 2015; LI et al., 2017). A análise da velocidade de motilidade em um dispositivo microfluídico mostrou que *S. enterica* Typhimurium (SL1344 e VNP20009) foi mais móvel que *E. coli* (DH5 α e K12); as cepas de motilidade mais rápida mostraram maior acúmulo e penetração intratumoral profunda (TOLEY; FORBES, 2012).

Um estudo recente demonstrou a relação entre motilidade, densidade bacteriana intracelular e colonização tumoral. *S. enterica* Typhimurium penetrou ativamente nas massas tumorais, após a indução da superexpressão do regulador mestre flhDC. *S. enterica* Typhimurium moveu-se muito mais rápido do que o controle não induzido (RAMAN et al., 2019). A superexpressão de flhDC promoveu acúmulo intracelular de *S. enterica* Typhimurium e colonização tumoral. Esses e outros resultados sugerem fortemente que a penetração tumoral e o acúmulo intratumoral são mecanismos influenciados pela motilidade (THORNLOW et al., 2015; RAMAN et al., 2019).

***Salmonella enterica* inibe o crescimento tumoral pela ativação do sistema imune**

A infecção com cepas atenuadas de *S. enterica* leva a regressão do tumor através de vários mecanismos. Alguns estudos apontam a atividade tumoricida direta de *S. enterica* por indução de apoptose ou autofagia das células tumorais (LEE et al., 2014). No entanto, a maioria dos estudos evidenciam que a regressão é devido à ativação do sistema imune (AVOGADRI et al., 2005; CHANG; LEE, 2014; KAIMALA et al., 2014; HIRSCH WERLE et al., 2016). No microambiente tumoral com imunogenicidade pobre, a infiltração de células tumorais é baixa, o que resulta no escape da vigilância imune (ZHENG; MIN, 2016), sendo os melanomas B16F10 um exemplo desse tipo de tumor. O melanoma B16F10 mostra fortes mecanismos de imunoescape (AVOGADRI et al., 2005). A infecção de tumores com *S. enterica* alerta o sistema imunológico de seu estado infectado, levando à ativação de células imunitárias que dirigiram a regressão tumoral (AVOGADRI et al., 2005).

A infecção com *S. enterica* aumenta a antigenicidade do tumor através da ativação de receptores tipo Toll (TLRs) e da infiltração de células imunológicas (KAIMALA et al., 2014). A ativação TLR4 tem um papel fundamental na supressão tumoral. Previamente, foi demonstrado que a *S. enterica* serotipo Choleraesuis inibiu o crescimento de tumores murinos e desencadeou a infiltração de macrófagos, neutrófilos e células T através da sinalização TLR4. A ativação TLR4 leva a expressão e citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-18 (IL-18), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose- α (TNF- α). A secreção dessas citocinas promove a infiltração de células dendríticas, células *natural killer* (NK), macrófagos, neutrófilos, células T e B, que transformam o microambiente tumoral imunossuprimido em imunoativo (Figura 1) (KAIMALA et al., 2014; KIM et al., 2015; LI et al., 2020a).

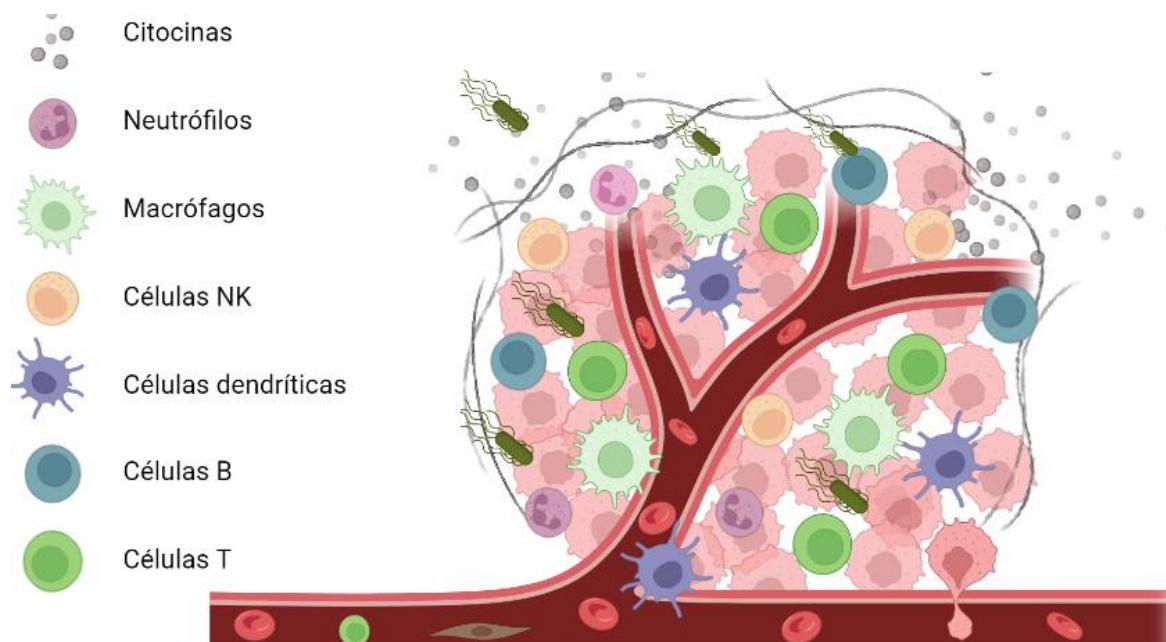


Figura I. Ativação da resposta imune no microambiente tumoral por *Salmonella enterica*.

Fonte: o autor. Criado em Biorender.

Em tumores sólidos imunossuprimidos, há uma população abundante de macrófagos associados ao tumor (TAMs). A maioria dos TAMs no microambiente tumoral é de macrófagos ativados alternativamente, conhecidos também como macrófagos de fenótipo M2, caracterizados por contribuir no crescimento tumoral, em angiogêneses, metástases e resistência a quimioterapêuticos (KAIMALA et al., 2014; PERROTTA et al., 2018; DI MITRI et al., 2019). O fenótipo dos TAMs pode mudar pela exposição a diferentes estímulos (Figura II) (YANG et al., 2018; DI MITRI et al., 2019). Recentemente, foi demonstrado que *S. enterica* Typhimurium YB1 pode reprogramar a polarização de fenótipo M2 a M1, um fenótipo de TAMs conhecido por dirigir a resposta imune antitumoral e a eliminação de células tumorais (YANG et al., 2018). A reprogramação de TAMs por *S. enterica* Typhimurium sugere o uso potencial dessa bactéria para combater a progressão do tumor.

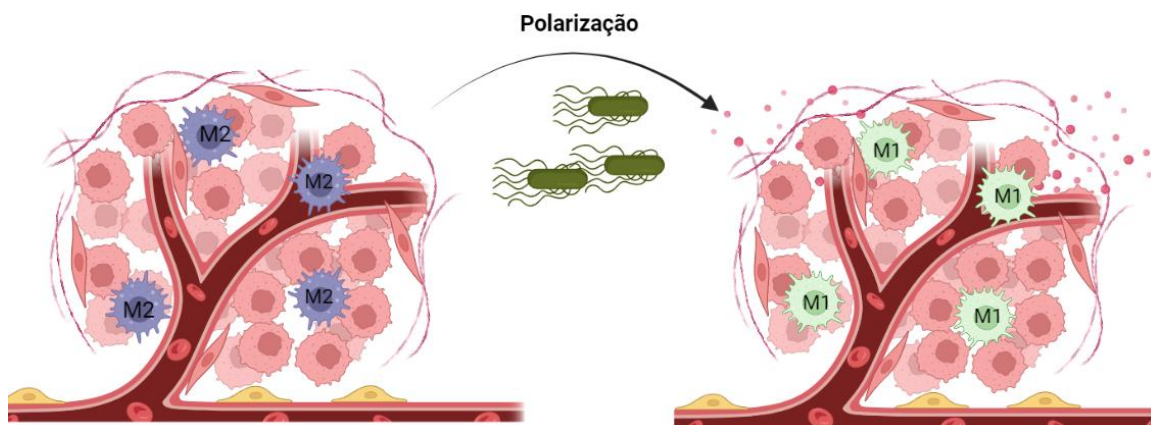


Figura II. Polarização de macrófagos tumorais por *Salmonella enterica* Typhimurium.

Fonte: o autor. Criado em Biorender.

Além dos macrófagos, outras células mieloides, como células NK e células dendríticas (CDs), também estão envolvidas na destruição de células tumorais (Figura I) (SACCHERI et al., 2010; MEHNER et al., 2014; KIM et al., 2015; CHEN; PANGILINAN; LEE, 2019). As CDs apresentam peptídeos antigênicos pelo complexo principal de histocompatibilidade classe I para linfócitos T citotóxicos (LTC) e células NK (SACCHERI et al., 2010). Uma vez ativadas, essas células podem desencadear a destruição de células tumorais (KIM et al., 2015; CHEN; PANGILINAN; LEE, 2019). Vários estudos usando *S. enterica* Typhimurium para tratar tumores murinos também apoiaram o papel das células T e B para a eficácia antitumoral. O tratamento com *S. enterica* Typhimurium VNP20009 em camundongos com leucemia mieloide aguda aumentou em células NK, Th1 e CD8 + e prolongou significativamente a sobrevivência (LI et al., 2020a). Da mesma forma, o tratamento de tumores murinos com *S. enterica* Typhimurium ΔppGpp suprimiu o crescimento tumoral a partir da infiltração de leucócitos, células T e células B (KIM et al., 2015). Esses resultados sugerem que os mecanismos que explicam a eficácia da imunoterapia mediada por *S. enterica* são complexos e pobremente entendidos. No entanto, a evidência sugere que a eficácia é atribuída à habilidade de *S. enterica* de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de células do sistema imune inato e adaptativo, resultando na reprogramação do microambiente tumoral de imunossuprimido a imunocompetente para exercer o efeito anticancerígeno.

OMVs na imunoterapia do câncer

Derivados de *S. enterica*, como OMVs, também têm sido propostos como agentes anticancerígenos. As OMVs são vesículas não replicativas, proteolipossomas esféricos de tamanho nanométrico (10-300 nm), naturalmente secretados pela membrana externa (inglês: Outer Membrane-OM) de bactérias gram-negativas (MACDONALD; KUEHN, 2012). Tem sido demonstrado que as nanovesículas participam em diversos processos celulares como homeostases, comunicação intra e interespecies, competência interespecífica, sobrevivência, transferência horizontal de genes, resistência a antibióticos e resposta a estresse (GERRITZEN et al., 2017; JAN, 2017; SEIKE et al., 2020; BATISTA et al., 2020). As OMVs são compostas por lipopolisacarídeos, fosfolipídios da membrana externa, proteínas (da membrana externa, do periplasma e do citoplasma), ácidos nucleicos (DNA, RNA, microRNA) e fatores de virulência (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015; BITTO et al., 2017; BATISTA et al., 2020). Devido à sua composição, as OMVs têm propriedades imunoestimuladoras intrínsecas e podem ser usadas para carregar e entregar drogas terapêuticas. Essas propriedades convertem as OMVs em uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de vacinas e terapias para diferentes doenças.

Na atualidade, existem duas vacinas comerciais baseadas em OMVs, MeNZB OMV e Bexsero; as duas vacinas são desenhadas contra *Neisseria meningitidis* do sorogrupo B. As vacinas MeNZB OMV e Bexsero são seguras inclusive para crianças maiores de dois meses e têm sido eficientes para controlar epidemias de Meningite B (ARNOLD et al., 2011). Um estudo recente mostrou que MeNZB OMV também tem 31% de eficiência na proteção contra gonorreia (PAYNTER et al., 2019). Esses resultados têm atraído especial atenção para as OMVs como plataformas vacinais e terapêuticas para diferentes doenças, incluindo o câncer.

Na imunoterapia do câncer, os estudos ainda são pioneiros, mas os resultados têm sido promissores. O uso das OMVs na imunoterapia do câncer tem sido proposto como monoterapia (KIM et al., 2017; ALY et al., 2021), terapia combinada com terapia convencional (CHEN et al., 2020) e como nanocargadores de agentes antitumorais (KUERBAN et al., 2020). As OMVs de *S. Typhimurium* ATCC 14028 sozinhas ou em combinação com a quimioterapia (paclitaxel) inibiram o crescimento do carcinoma sólido de Ehrlich em camundongos albinos suíços (ALY et al., 2021). De forma similar, o tratamento combinado de OMVs de *S. enterica* Typhimurium atenuada e o quimioterapêutico Tegafur inibiram a aparição de metástases e o crescimento de melanoma em

camundongos (CHEN et al., 2020). Outros estudos que usaram OMVs bacterianas para entregar doxorubicina também obtiveram resultados interessantes em modelo murino de câncer de pulmão (KIM et al., 2017; KUERBAN et al., 2020). Os estudos citados demonstram a eficácia e a segurança de OMVs na imunoterapia de diferentes tipos de câncer.

As OMVs são similares às bactérias de origem, mas não podem causar infecção ou se replicar (MICOLI; MACLENNAN, 2020). Devido a essa última característica, as OMVs são consideradas mais seguras que suas bactérias atenuadas de origem. Como as OMVs são compostos da maioria dos padrões moleculares associados a micróbios (do inglês Pathogen associated molecular pattern-PAMPs) da OM das bactérias originais, podem atuar como adjuvantes naturais capazes de estimular a resposta imune inata (KAPARAKIS-LIASKOS; FERRERO, 2015). A evidência sugere que os PAMPs presentes nas OMVs podem modular o sistema imune para a imunoterapia do câncer (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015; BONNINGTON; KUEHN, 2016). Os TLR podem reconhecer os PAMPs das OMVs e ativar fatores de transcrição que levam à liberação de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e interferons tipo I (ENGEVIK et al., 2021). Por outra parte, da mesma forma que as bactérias, as OMVs acumulam-se preferencialmente no tecido tumoral (KAPARAKIS-LIASKOS; FERRERO, 2015), portanto poderiam ser ótimos nanocarregadores para a administração dirigida de agentes antitumorais no microambiente tumoral.

Está bem descrito que as OMVs podem transportar metabolitos, pequenas moléculas, proteínas, plasmídeos e RNA de interferência para comunicar-se com seu ambiente, com outras bactérias e com a célula-hóspede (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015; BITTO et al., 2017; BATISTA et al., 2020). Isso as torna ferramentas valiosas para a entrega de moléculas terapêuticas no microambiente tumoral. Alguns autores sugerem que entre as proteínas presentes nas OMVs se encontram proteínas envolvidas na adesão e na invasão, que mediam sua fusão com as células-hóspede e posterior entrega do seu conteúdo no citosol (SHOBERG; THOMAS, 1993; KUEHN; KESTY, 2005). As OMVs podem ser modificadas quimicamente e geneticamente para aproveitar essa característica para carregar agentes terapêuticos tóxicos no interior das células tumorais, diminuindo os efeitos secundários nos tecidos saudáveis. As OMVs carregadas de ectodomínio de morte programada 1 (PD1E) foram obtidas a partir do isolamento de vesículas de uma cepa de *E. coli* $\Delta msbB$ que expressa PD1E (LI et al., 2020b). A evidência sugere que as OMVs podem ser

usadas como nanocarregadores biológicos de quimioterapêuticos que são capazes de induzir respostas antitumorais, portanto têm grande potencial na imunoterapia do câncer.

Produção de OMVs

As bactérias gram-negativas secretam OMVs durante todas as fases de crescimento. Estudos prévios têm demonstrado que as OMVs podem ser produzidas e secretadas em uma ampla variedade de ambientes sólidos, líquidos e biofilmes, inclusive dentro do hospedeiro (KLIMENTOVÁ; STULÍK, 2015). A produção de OMVs aumenta em condições de estresse, como altas temperaturas e meios com baixa concentração de nutrientes (KATSUI et al., 1982; VASILYEVA et al., 2009). Vários genes estão envolvidos na produção de OMVs. A produção de OMVs tem sido analisada em diferentes mutantes, algumas deleções (*ypjA* e *nlpA*) resultam em fenótipos de baixa produção de OMVs ou hipovesiculados (MCBROOM et al., 2006), outras deleções (nos genes *hns* ou *ompA* ou no sistema Tol-Pal) resultam em fenótipo de sua produção incrementada ou também chamados hipervesiculados (DALEKE-SCHERMERHORN et al., 2014). No entanto, até agora nenhuma das deleções analisadas produziu fenótipos incapazes de produzir OMVs. Portanto, tem sido sugerido que a produção de OMVs representa uma vantagem para as bactérias, sendo uma característica fundamental para o crescimento e a sobrevivência de bactérias gram-negativas (MCBROOM et al., 2006; SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015).

O rendimento na produção de OMVs por cepas de tipo selvagem não é suficientemente alto para sua aplicação na fabricação de vacinas ou terapias anticancerígenas. Para superar essa desvantagem, as bactérias podem ser manipuladas geneticamente para gerar cepas com fenótipos hipervesiculados, capazes de incrementar o rendimento de OMVs. A produção de OMVs pode aumentar pela deleção de genes implicados no sistema Tol-Pal (DEATHERAGE et al., 2009; NEVERMANN et al., 2019). O sistema Tol-Pal foi descrito na maioria das bactérias gram-negativas (BERNADAC et al., 1998; DALEKE-SCHERMERHORN et al., 2014; TURNER et al., 2015). Esse sistema é um complexo multiproteico transmembrana de importação de moléculas benéficas que não podem passar facilmente pela membrana externa (LAZZARONI; DUBUISSON; VIANNEY, 2002). O complexo é codificado por um cluster de sete genes, *orf1-tolQRAB-pal-orf2* (LAZZARONI; DUBUISSON; VIANNEY, 2002; REIMER et al., 2021). Mutações nos genes *tol* são associadas a mudanças na permeabilidade da membrana externa e ao

aumento na produção de OMVs (LAZZARONI; DUBUISSON; VIANNEY, 2002; DALEKE-SCHERMERHORN et al., 2014).

Violaceína

Conforme mencionado anteriormente, os derivados bacterianos, como metabolitos secundários, também têm sido estudados no tratamento do câncer (BROMBERG et al., 2010; HASHIMI; XU; WEI, 2015; GONÇALVES et al., 2016; KIM et al., 2021). A violaceína é um metabólito secundário produzido naturalmente por várias bactérias gram-negativas filogeneticamente distintas. Esse metabólito é hidrofóbico, de cor púrpura escuro e alcaloide membro da família indocarbazole (DURÁN; MENCK, 2001; PANTANELLA et al., 2007; YANG et al., 2007; YADA et al., 2008; HAKVÅG et al., 2009; ARANDA; MONTES-BORREGO; LANDA, 2011; BERTI et al., 2019). A violaceína é formada pela dimerização oxidativa de duas moléculas de triptofano (FÜLLER et al., 2016). Cinco genes são responsáveis pela produção da violaceína (*vioA*, *vioB*, *vioC*, *vioD* e *vioE*) e são encontrados em um operon designado como *vioABCDE*, esses genes são transcritos na mesma direção (DURÁN et al., 2016). A violaceína tem sido superexpressa em algumas bactérias de interesse terapêutico, como a *E. coli* e a *S. enterica* Typhimurium, pela clonagem do operon *vioABCDE* (HASHIMI; XU; WEI, 2015). Uma ampla gama de atividades biológicas e farmacológicas foi relatada para violaceína, incluindo atividade anticancerígena (HASHIMI; XU; WEI, 2015; BILSLAND et al., 2018; CAUZ et al., 2019).

Dentre todas as propriedades farmacológicas reportadas para a violaceína, sua atividade anticancerígena é a mais promissora. A eficácia antitumoral da violaceína foi demonstrada *in vitro* e *in vivo* a concentrações nano e micromolares. *In vitro*, a atividade citotóxica da violaceína foi demonstrada em células de melanoma, leucemia, câncer de cólon, mama, cabeça e pescoço (FERREIRA et al., 2004; HASHIMI; XU; WEI, 2015; LEAL et al., 2015; VERINAUD et al., 2015; ALSHATWI; SUBASH-BABU; ANTONISAMY, 2016; GONÇALVES et al., 2016; KIM et al., 2021). A eficácia da violaceína também foi demonstrada *in vivo* em modelos murinos de tumor ascítico de Ehrlich e tumores de cabeça e pescoço (BROMBERG et al., 2010; HASHIMI; XU; WEI, 2015). O mecanismo pelo qual a violaceína exerce sua atividade anticancerígena ainda não está muito bem esclarecido, mas as evidências apontam a indução da parada do ciclo celular e apoptose através da regulação negativa de mdm2, AKT e ERK e regulação positiva de Bax, p53 e p21 (ALSHATWI; SUBASH-BABU; ANTONISAMY, 2016; KIM et al., 2021). Apesar dos

resultados promissores obtidos com a violaceína, sua aplicação terapêutica é limitada, em parte devido à sua alta hidrofobicidade (BERTI et al., 2019), o que dificulta a entrega dessa possível molécula anticancerígena.

O uso de OMVs como nanocargadores para entregar violaceína nas células tumorais poderia superar a limitação de administração do composto. Vários sistemas de entrega de drogas, como nanopartículas e microesferas, foram propostos para melhorar a administração de violaceína nas células tumorais (MARTINS et al., 2010; BERNI et al., 2013; BERTI et al., 2019). Porém, os sistemas de entrega de violaceína explorados até agora apresentam algumas limitações relacionadas com a carência de especificidade. As OMVs são uma opção atraente que pode superar essas limitações devido à sua acumulação preferencial no tecido tumoral. Além disso, a imunogenicidade natural das OMVs e seus efeitos anticancerígenos poderiam aumentar a eficácia terapêutica da violaceína.

Referências

AGARWAL, S. et al. Function of the Blood-Brain Barrier and Restriction of Drug Delivery to Invasive Glioma Cells: Findings in an Orthotopic Rat Xenograft Model of Glioma. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 41, n. 1, p. 33–39, jan. 2013.

ALSHATWI, A. A.; SUBASH-BABU, P.; ANTONISAMY, P. Violacein induces apoptosis in human breast cancer cells through up regulation of BAX, p53 and down regulation of MDM2. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 68, n. 1, p. 89–97, 1 jan. 2016.

ALY, R. G. et al. Antineoplastic activity of *Salmonella* Typhimurium outer membrane nanovesicles. **Experimental Cell Research**, v. 399, n. 1, p. 112423, 1 fev. 2021.

ARANDA, S.; MONTES-BORREGO, M.; LANDA, B. B. Purple-pigmented violacein-producing *Duganella spp.* inhabit the rhizosphere of wild and cultivated olives in southern Spain. **Microbial Ecology**, v. 62, n. 2, p. 446–459, ago. 2011.

ARNOLD, R. et al. Effectiveness of a vaccination programme for an epidemic of meningococcal B in New Zealand. **Vaccine**, v. 29, n. 40, p. 7100–7106, 16 set. 2011.

ASCIERTO, P. A. et al. Perspectives in melanoma: meeting report from the Melanoma Bridge (November 29th-1 December 1st, 2018, Naples, Italy). **Journal of Translational Medicine**, v. 17, n. 1, p. 234, 22 jul. 2019.

AUGUSTIN, L. B. et al. Virulence-attenuated *Salmonella* engineered to secrete immunomodulators reduce tumour growth and increase survival in an autochthonous mouse model of breast cancer. **Journal of Drug Targeting**, v. 29, n. 4, p. 430–438, abr. 2021.

AVOGADRI, F. et al. Cancer immunotherapy based on killing of *Salmonella*-infected tumor cells. **Cancer Research**, v. 65, n. 9, p. 3920–3927, 1 maio 2005.

BASCUAS, T. et al. *Salmonella* Immunotherapy Improves the Outcome of CHOP Chemotherapy in Non-Hodgkin Lymphoma-Bearing Mice. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 7, 2018.

BATISTA, J. H. et al. Interplay between two quorum sensing-regulated pathways, violacein biosynthesis and VacJ/Yrb, dictates outer membrane vesicle biogenesis in *Chromobacterium violaceum*. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 2432–2442, jun. 2020.

BERNADAC, A. et al. *Escherichia coli* tol-pal mutants form outer membrane vesicles. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 18, p. 4872–4878, set. 1998.

BERNI, E. et al. Violacein/poly(epsilon-caprolactone)/chitosan nanoparticles against bovine mastitis: Antibacterial and ecotoxicity evaluation. v. 429, p. 012030, 1 abr. 2013.

BERTI, I. R. et al. Development of biocarrier for violacein controlled release in the treatment of cancer. **Reactive and Functional Polymers**, v. 136, p. 122–130, 1 mar. 2019.

BEUZÓN, C. R. et al. *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. **The EMBO journal**, v. 19, n. 13, p. 3235–3249, 3 jul. 2000.

BILSLAND, E. et al. Antiplasmodial and trypanocidal activity of violacein and deoxyviolacein produced from synthetic operons. **BMC biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 22, 11 abr. 2018.

BITTO, N. J. et al. Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. **Scientific Reports**, v. 7, p. 7072, 1 ago. 2017.

BOLICK, N. L.; GELLER, A. C. Epidemiology of Melanoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, Melanoma. v. 35, n. 1, p. 57–72, 1 fev. 2021.

BONNINGTON, K. E.; KUEHN, M. J. Outer Membrane Vesicle Production Facilitates LPS Remodeling and Outer Membrane Maintenance in *Salmonella* during Environmental Transitions. **mBio**, v. 7, n. 5, p. e01532-16, 18 out. 2016.

BRANCHU, P.; BAWN, M.; KINGSLEY, R. A. Genome Variation and Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* Seroovar Typhimurium Pathovariants. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 8, p. e00079-18, ago. 2018.

BROMBERG, N. et al. Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. **Chemico-Biological Interactions**, v. 186, n. 1, p. 43–52, 7 jun. 2010.

CAMACHO, E. M. et al. Engineering *Salmonella* as intracellular factory for effective killing of tumour cells. **Scientific Reports**, v. 6, p. 30591, 28 jul. 2016.

CASAZZA, A. et al. Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment. **Oncogene**, v. 33, n. 14, p. 1743–1754, 3 abr. 2014.

CAUZ, A. C. G. et al. Violacein Targets the Cytoplasmic Membrane of Bacteria. **ACS infectious diseases**, v. 5, n. 4, p. 539–549, 12 abr. 2019.

CHALASANI, V.; CHIN, J. L.; IZAWA, J. I. Histologic variants of urothelial bladder cancer and nonurothelial histology in bladder cancer. **Canadian Urological Association Journal**, v. 3, n. 6 Suppl 4, p. S193–S198, dez. 2009.

CHANG, W.-W.; LEE, C.-H. *Salmonella* as an innovative therapeutic antitumor agent. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 8, p. 14546–14554, 21 ago. 2014.

CHEN, M.-C.; PANGILINAN, C. R.; LEE, C.-H. *Salmonella* Breaks Tumor Immune Tolerance by Downregulating Tumor Programmed Death-Ligand 1 Expression. **Cancers**, v. 12, n. 1, p. E57, 24 dez. 2019.

CHEN, Q. et al. Bioengineering Bacterial Vesicle-Coated Polymeric Nanomedicine for Enhanced Cancer Immunotherapy and Metastasis Prevention. **Nano Letters**, v. 20, n. 1, p. 11–21, 8 jan. 2020.

CHIN'OMBE, N. Recombinant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium as a Vaccine Vector for HIV-1 Gag. **Viruses**, v. 5, n. 9, p. 2062–2078, 28 ago. 2013.

CLAIRMONT, C. et al. Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of *Salmonella typhimurium*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 6, p. 1996–2002, jun. 2000.

COBB, J. et al. Oral *Salmonella* msbB Mutant as a Carrier for a *Salmonella*-Based Vaccine for Prevention and Reversal of Type 1 Diabetes. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 1928, 2021.

COLLINS, L. V.; ATTRIDGE, S.; HACKETT, J. Mutations at *rfc* or *pmi* attenuate *Salmonella* typhimurium virulence for mice. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 3, p. 1079–1085, mar. 1991.

DALEKE-SCHERMERHORN, M. H. et al. Decoration of Outer Membrane Vesicles with Multiple Antigens by Using an Autotransporter Approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 18, p. 5854–5865, set. 2014.

DEATHERAGE, B. L. et al. Biogenesis of bacterial membrane vesicles. **Molecular Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 1395–1407, jun. 2009.

DI MITRI, D. et al. Re-education of Tumor-Associated Macrophages by CXCR2 Blockade Drives Senescence and Tumor Inhibition in Advanced Prostate Cancer. **Cell Reports**, v. 28, n. 8, p. 2156–2168.e5, 20 ago. 2019.

DILLON, S. C.; DORMAN, C. J. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 185–195, mar. 2010.

DURÁN, N. et al. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 1030–1045, 1 set. 2016.

DURÁN, N.; MENCK, C. F. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 201–222, 2001.

EBELT, N. D. et al. Hyaluronidase-Expressing *Salmonella* Effectively Targets Tumor-Associated Hyaluronic Acid in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 19, n. 2, p. 706–716, fev. 2020.

EHUWA, O.; JAISWAL, A. K.; JAISWAL, S. Salmonella, Food Safety and Food Handling Practices. **Foods**, v. 10, n. 5, p. 907, 21 abr. 2021.

ENGEVIK, M. A. et al. *Fusobacterium nucleatum* Secretes Outer Membrane Vesicles and Promotes Intestinal Inflammation. **mBio**, v. 12, n. 2, p. e02706-20, 2 mar. 2021.

FELGNER, S. et al. *aroA*-Deficient *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Is More Than a Metabolically Attenuated Mutant. **mBio**, v. 7, n. 5, p. e01220-16, 6 set. 2016.

FELGNER, S. et al. The immunogenic potential of bacterial flagella for *Salmonella*-mediated tumor therapy. **International Journal of Cancer**, v. 147, n. 2, p. 448–460, 15 jul. 2020.

FERREIRA, C. V. et al. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. **Blood**, v. 104, n. 5, p. 1459–1464, 1 set. 2004.

FLENTIE, K. et al. A bioluminescent transposon reporter-trap identifies tumor-specific microenvironment-induced promoters in *Salmonella* for conditional bacterial-based tumor therapy. **Cancer Discovery**, v. 2, n. 7, p. 624–637, jul. 2012.

FRAHM, M. et al. Efficiency of Conditionally Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Bacterium-Mediated Tumor Therapy. **mBio**, 14 abr. 2015.

FRIEDLOS, F. et al. Attenuated *Salmonella* targets prodrug activating enzyme carboxypeptidase G2 to mouse melanoma and human breast and colon carcinomas for effective suicide gene therapy. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 14, n. 13, p. 4259–4266, 1 jul. 2008.

FÜLLER, J. J. et al. Biosynthesis of Violacein, Structure and Function of l-Tryptophan Oxidase VioA from *Chromobacterium violaceum**. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 38, p. 20068–20084, 16 set. 2016.

GALLUZZI, L. et al. Classification of current anticancer immunotherapies. **Oncotarget**, v. 5, n. 24, p. 12472–12508, 30 dez. 2014.

GALON, J.; BRUNI, D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 18, n. 3, p. 197–218, mar. 2019.

GAO, S. et al. Development of Oxytolerant *Salmonella typhimurium* Using Radiation Mutation Technology (RMT) for Cancer Therapy. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3764, 28 fev. 2020.

GAO, X. et al. Construction of a novel DNA vaccine candidate targeting F gene of genotype VII Newcastle disease virus and chicken IL-18 delivered by *Salmonella*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1362–1372, maio 2019.

GARAI, P.; GNANADHAS, D. P.; CHAKRAVORTTY, D. *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi as model organisms: revealing paradigm of host-pathogen interactions. **Virulence**, v. 3, n. 4, p. 377–388, 1 jul. 2012.

GERLACH, R. G. et al. Salmonella pathogenicity island 4-mediated adhesion is coregulated with invasion genes in Salmonella enterica. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 10, p. 4697–4709, out. 2007.

GERRITZEN, M. J. H. et al. Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 5, p. 565–574, set. 2017.

GONÇALVES, P. R. et al. Violacein induces death of RAS-mutated metastatic melanoma by impairing autophagy process. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 37, n. 10, p. 14049–14058, out. 2016.

GOODMAN, S. D. et al. In Vitro Selection of Integration Host Factor Binding Sites. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 10, p. 3246–3255, maio 1999.

GRILLE, S. et al. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium immunotherapy for B-cell lymphoma induces broad anti-tumour immunity with therapeutic effect. **Immunology**, v. 143, n. 3, p. 428–437, nov. 2014.

GROISMAN, E. A.; DUPREY, A.; CHOI, J. How the PhoP/PhoQ System Controls Virulence and Mg²⁺ Homeostasis: Lessons in Signal Transduction, Pathogenesis, Physiology, and Evolution. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 85, n. 3, p. e0017620, 18 ago. 2021.

GUO, H. et al. Targeting tumor gene by shRNA-expressing *Salmonella*-mediated RNAi. **Gene Therapy**, v. 18, n. 1, p. 95–105, jan. 2011.

GUT, A. M. et al. Salmonella infection - prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. **Microbiology (Reading, England)**, v. 164, n. 11, p. 1327–1344, nov. 2018.

HAKVÅG, S. et al. Violacein-producing *Collimonas* sp. from the sea surface microlayer of costal waters in Trøndelag, Norway. **Marine Drugs**, v. 7, n. 4, p. 576–588, 12 nov. 2009.

HAN, J. et al. Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 129, p. 110393, set. 2020.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.

HASHIMI, S. M.; XU, T.; WEI, M. Q. Violacein anticancer activity is enhanced under hypoxia. **Oncology Reports**, v. 33, n. 4, p. 1731–1736, 1 abr. 2015.

HASSAN, A. S. et al. Vaccination against the digestive enzyme Cathepsin B using a YS1646 *Salmonella enterica* Typhimurium vector provides almost complete protection against *Schistosoma mansoni* challenge in a mouse model. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 12, p. e0007490, dez. 2019.

HENKE, E.; NANDIGAMA, R.; ERGÜN, S. Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 6, p. 160, 2019.

HEWAWADUGE, C.; SENEVIRATHNE, A.; LEE, J. H. Enhancement of host infectivity, immunity, and protective efficacy by addition of sodium bicarbonate antacid to oral vaccine formulation of live attenuated *Salmonella* secreting *Brucella* antigens. **Microbial Pathogenesis**, v. 138, p. 103857, jan. 2020.

HIRSCH WERLE, C. et al. Antimelanoma effect of *Salmonella* Typhimurium integration host factor mutant in murine model. **Future Oncology (London, England)**, v. 12, n. 20, p. 2367–2378, out. 2016.

HULVAT, M. C. Cancer Incidence and Trends. **Surgical Clinics of North America**, Surgical Oncology for the General Surgeon. v. 100, n. 3, p. 469–481, 1 jun. 2020.

HUME, P. J. et al. Swiss Army Pathogen: The *Salmonella* Entry Toolkit. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 348, 2017.

- ILYAS, B.; TSAI, C. N.; COOMBES, B. K. Evolution of Salmonella-Host Cell Interactions through a Dynamic Bacterial Genome. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 428, 2017.
- JAJERE, S. M. A review of *Salmonella* enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. **Veterinary World**, v. 12, n. 4, p. 504–521, 2019.
- JAN, A. T. Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1053, 2017.
- JENNINGS, E.; THURSTON, T. L. M.; HOLDEN, D. W. *Salmonella* SPI-2 Type III Secretion System Effectors: Molecular Mechanisms And Physiological Consequences. **Cell Host & Microbe**, v. 22, n. 2, p. 217–231, 9 ago. 2017.
- JIANG, T. et al. Enhanced therapeutic effect of cisplatin on the prostate cancer in tumor-bearing mice by transfecting the attenuated *Salmonella* carrying a plasmid co-expressing p53 gene and mdm2 siRNA. **Cancer Letters**, v. 337, n. 1, p. 133–142, 28 ago. 2013.
- KAIMALA, S. et al. *Salmonella*-mediated tumor regression involves targeting of tumor myeloid suppressor cells causing a shift to M1-like phenotype and reduction in suppressive capacity. **Cancer immunology, immunotherapy: CII**, v. 63, n. 6, p. 587–599, jun. 2014.
- KANG, S.-R. et al. Imaging of tumor colonization by *Escherichia coli* using 18F-FDS PET. **Theranostics**, v. 10, n. 11, p. 4958–4966, 2020.
- KAPARAKIS-LIASKOS, M.; FERRERO, R. L. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. **Nature Reviews. Immunology**, v. 15, n. 6, p. 375–387, jun. 2015.
- KATSUI, N. et al. Heat-induced blebbing and vesiculation of the outer membrane of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 151, n. 3, p. 1523–1531, set. 1982.
- KAWAGUCHI, K. et al. Combination therapy of tumor-targeting *Salmonella* typhimurium A1-R and oral recombinant methioninase regresses a BRAF-V600E-negative melanoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 503, n. 4, p. 3086–3092, 18 set. 2018.

KIM, J.-E. et al. *Salmonella* typhimurium Suppresses Tumor Growth via the Pro-Inflammatory Cytokine Interleukin-1 β . **Theranostics**, v. 5, n. 12, p. 1328–1342, 2015.

KIM, O. Y. et al. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 626, 20 set. 2017.

KIM, Y. J. et al. The Natural Pigment Violacein Potentially Suppresses the Proliferation and Stemness of Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 10731, jan. 2021.

KLIMENTOVÁ, J.; STULÍK, J. Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. **Microbiological Research**, v. 170, p. 1–9, jan. 2015.

KNODLER, L. A. et al. Salmonella effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 1089–1103, mar. 2002.

KONG, N. et al. Synthetic mRNA nanoparticle-mediated restoration of p53 tumor suppressor sensitizes p53-deficient cancers to mTOR inhibition. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 523, 18 dez. 2019.

KONG, W. et al. Turning self-destructing *Salmonella* into a universal DNA vaccine delivery platform. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 47, p. 19414–19419, 20 nov. 2012.

KUEHN, M. J.; KESTY, N. C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. **Genes & Development**, v. 19, n. 22, p. 2645–2655, 15 nov. 2005.

KUERBAN, K. et al. Doxorubicin-loaded bacterial outer-membrane vesicles exert enhanced anti-tumor efficacy in non-small-cell lung cancer. **Acta Pharmaceutica Sinica. B**, v. 10, n. 8, p. 1534–1548, ago. 2020.

KURTZ, J. R.; GOGGINS, J. A.; MCLACHLAN, J. B. *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. **Immunology Letters**, v. 190, p. 42–50, 1 out. 2017.

LAZZARONI, J.-C.; DUBUISSON, J.-F.; VIANNEY, A. The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the translocation of group A colicins. **Biochimie**, v. 84, n. 5–6, p. 391–397, jun. 2002.

LEAL, A. M. DE S. et al. Violacein induces cell death by triggering mitochondrial membrane hyperpolarization in vitro. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 115, 6 jun. 2015.

LEE, A. Y.; BRADY, M. S. Neoadjuvant immunotherapy for melanoma. **Journal of Surgical Oncology**, v. 123, n. 3, p. 782–788, 2021.

LEE, C.-H. et al. Salmonella induce autophagy in melanoma by the downregulation of AKT/mTOR pathway. **Gene Therapy**, v. 21, n. 3, p. 309–316, mar. 2014.

LEE, C.-H.; WU, C.-L.; SHIAU, A.-L. Systemic administration of attenuated *Salmonella* choleraesuis carrying thrombospondin-1 gene leads to tumor-specific transgene expression, delayed tumor growth and prolonged survival in the murine melanoma model. **Cancer Gene Therapy**, v. 12, n. 2, p. 175–184, fev. 2005.

LEITE, B. et al. Integration host factor is important for biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 6, p. ftx074, 31 ago. 2017.

LI, C.-X. et al. “Obligate” anaerobic *Salmonella* strain YB1 suppresses liver tumor growth and metastasis in nude mice. **Oncology Letters**, v. 13, n. 1, p. 177–183, jan. 2017.

LI, M. et al. Inhibition of acute leukemia with attenuated *Salmonella* typhimurium strain VNP20009. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 129, p. 110425, set. 2020a.

LI, Y. et al. Bacterial Outer Membrane Vesicles Presenting Programmed Death 1 for Improved Cancer Immunotherapy via Immune Activation and Checkpoint Inhibition. **ACS nano**, 24 nov. 2020b.

LUKE, J. J. et al. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 14, n. 8, p. 463–482, ago. 2017.

MACDONALD, I. A.; KUEHN, M. J. Offense and defense: microbial membrane vesicles play both ways. **Research in Microbiology**, Microbial devices for cell-cell and cell-surface interactions. v. 163, n. 9, p. 607–618, 1 nov. 2012.

MANGAN, M. W. et al. The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1831–1847, 2006.

MANOLA, J. et al. Prognostic factors in metastatic melanoma: a pooled analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 18, n. 22, p. 3782–3793, 15 nov. 2000.

MARTINS, D. et al. Antitumoral activity of L-ascorbic acid-poly- D,L-(lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 77–85, 2 fev. 2010.

MBONGUE, J. C. et al. Tracking of an Oral *Salmonella*-Based Vaccine for Type 1 Diabetes in Non-obese Diabetic Mice. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

MCBROOM, A. J. et al. Outer Membrane Vesicle Production by *Escherichia coli* Is Independent of Membrane Instability. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 15, p. 5385–5392, ago. 2006.

MEHNER, C. et al. Tumor cell-produced matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) drives malignant progression and metastasis of basal-like triple negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 9, p. 2736–2749, 15 maio 2014.

MI, Z. et al. *Salmonella*-Mediated Cancer Therapy: An Innovative Therapeutic Strategy. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 20, p. 4765–4776, 20 ago. 2019.

MICOLI, F.; MACLENNAN, C. A. Outer membrane vesicle vaccines. **Seminars in Immunology, Challenges in Vaccinology**. v. 50, p. 101433, 1 ago. 2020.

MILLER, K. D. et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 69, n. 5, p. 363–385, set. 2019.

MIWA, S. et al. Tumor-targeting *Salmonella* typhimurium A1-R prevents experimental human breast cancer bone metastasis in nude mice. **Oncotarget**, v. 5, n. 16, p. 7119–7125, 30 ago. 2014.

MIYAKE, K. et al. Tumor-targeting *Salmonella* typhimurium A1-R overcomes nab-paclitaxel resistance in a cervical cancer PDOX mouse model. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 299, n. 6, p. 1683–1690, jun. 2019.

MÜLLER, B.; FISCHER, B.; KREUTZ, W. An acidic microenvironment impairs the generation of non-major histocompatibility complex-restricted killer cells. **Immunology**, v. 99, n. 3, p. 375–384, mar. 2000.

MURAKAMI, T. et al. Tumor-Targeting *Salmonella* typhimurium A1-R Promotes Tumoricidal CD8⁺ T Cell Tumor Infiltration and Arrests Growth and Metastasis in a Syngeneic Pancreatic-Cancer Orthotopic Mouse Model. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 634–639, jan. 2018.

NEMUNAITIS, J. et al. Pilot trial of genetically modified, attenuated *Salmonella* expressing the E. coli cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. **Cancer Gene Therapy**, v. 10, n. 10, p. 737–744, out. 2003.

NEVERMANN, J. et al. Identification of Genes Involved in Biogenesis of Outer Membrane Vesicles (OMVs) in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 104, 2019.

PAGLIARO, L. C. et al. Repeated intravesical instillations of an adenoviral vector in patients with locally advanced bladder cancer: a phase I study of p53 gene therapy. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 21, n. 12, p. 2247–2253, 15 jun. 2003a.

PAGLIARO, L. C. et al. Adenoviral p53 gene transfer in human bladder cancer cell lines: cytotoxicity and synergy with cisplatin. **Urologic Oncology**, v. 21, n. 6, p. 456–462, dez. 2003b.

PANTANELLA, F. et al. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 4, p. 992–999, abr. 2007.

PARK, S.-H. et al. RGD Peptide Cell-Surface Display Enhances the Targeting and Therapeutic Efficacy of Attenuated *Salmonella*-mediated Cancer Therapy. **Theranostics**, v. 6, n. 10, p. 1672–1682, 2016.

PATTON, E. E. et al. Melanoma models for the next generation of therapies. **Cancer Cell**, v. 39, n. 5, p. 610–631, 10 maio 2021.

PAYNTER, J. et al. Effectiveness of a Group B Outer Membrane Vesicle Meningococcal Vaccine in Preventing Hospitalization from Gonorrhea in New Zealand: A Retrospective Cohort Study. **Vaccines**, v. 7, n. 1, p. E5, 5 jan. 2019.

PERROTTA, C. et al. Nitric Oxide Generated by Tumor-Associated Macrophages Is Responsible for Cancer Resistance to Cisplatin and Correlated With Syntaxin 4 and Acid Sphingomyelinase Inhibition. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1186, 2018.

PHAM, O. H.; MCSORLEY, S. J. Protective host immune responses to *Salmonella* infection. **Future microbiology**, v. 10, p. 101–110, jan. 2015.

PHAN, T. et al. *Salmonella*-mediated therapy targeting indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 (IDO) activates innate immunity and mitigates colorectal cancer growth. **Cancer Gene Therapy**, v. 27, n. 3–4, p. 235–245, abr. 2020.

PHAN, T. X. et al. Activation of inflammasome by attenuated *Salmonella* typhimurium in bacteria-mediated cancer therapy. **Microbiology and Immunology**, v. 59, n. 11, p. 664–675, nov. 2015.

RAHIB, L. et al. Estimated Projection of US Cancer Incidence and Death to 2040. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 4, p. e214708, 7 abr. 2021.

RAMAN, V. et al. The motility regulator flhDC drives intracellular accumulation and tumor colonization of *Salmonella*. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 7, n. 1, p. 44, 12 fev. 2019.

REIMER, S. L. et al. Comparative Analysis of Outer Membrane Vesicle Isolation Methods With an *Escherichia coli* tolA Mutant Reveals a Hypervesiculating Phenotype With Outer-Inner Membrane Vesicle Content. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 628801, 2021.

RICE, P. A. et al. Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. **Cell**, v. 87, n. 7, p. 1295–1306, 27 dez. 1996.

RICE, P. A. Making DNA do a U-turn: IHF and related proteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 7, n. 1, p. 86–93, fev. 1997.

RINK, M. et al. Predictors of cancer-specific mortality after disease recurrence following radical cystectomy. **BJU international**, v. 111, n. 3 Pt B, p. E30-36, mar. 2013.

ROBERT, C.; GAUTHERET, D. Multi-omics prediction in melanoma immunotherapy: A new brick in the wall. **Cancer Cell**, v. 40, n. 1, p. 14–16, 10 jan. 2022.

RYAN, M. P.; O'DWYER, J.; ADLEY, C. C. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 3782182, 2017.

RYAN, R. M. et al. Bacterial delivery of a novel cytolysin to hypoxic areas of solid tumors. **Gene Therapy**, v. 16, n. 3, p. 329–339, mar. 2009.

SACCHERI, F. et al. Bacteria-induced gap junctions in tumors favor antigen cross-presentation and antitumor immunity. **Science Translational Medicine**, v. 2, n. 44, p. 44ra57, 11 ago. 2010.

SALINAS-SÁNCHEZ, A. S. et al. Implications of p53 gene mutations on patient survival in transitional cell carcinoma of the bladder: a long-term study. **Urologic Oncology**, v. 26, n. 6, p. 620–626, dez. 2008.

SANA, T. G. et al. *Salmonella* Typhimurium utilizes a T6SS-mediated antibacterial weapon to establish in the host gut. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 34, p. E5044-5051, 23 ago. 2016.

SCHWECHHEIMER, C.; KUEHN, M. J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 605–619, out. 2015.

SEIKE, S. et al. Outer Membrane Vesicles Released From *Aeromonas* Strains Are Involved in the Biofilm Formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 613650, 2020.

SENGA, S. S.; GROSE, R. P. Hallmarks of cancer—the new testament. **Open Biology**, v. 11, n. 1, p. 200358, 20 jan. 2021.

SHOBERG, R. J.; THOMAS, D. D. Specific adherence of *Borrelia burgdorferi* extracellular vesicles to human endothelial cells in culture. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 9, p. 3892–3900, set. 1993.

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

STAEDTKE, V. et al. *Clostridium novyi*-NT in cancer therapy. **Genes & Diseases**, v. 3, n. 2, p. 144–152, 6 fev. 2016.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TASDOGAN, A. et al. Metabolic heterogeneity confers differences in melanoma metastatic potential. **Nature**, v. 577, n. 7788, p. 115–120, jan. 2020.

THEYS, J. et al. Improvement of *Clostridium* tumour targeting vectors evaluated in rat rhabdomyosarcomas. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 30, n. 1, p. 37–41, fev. 2001.

THORNLOW, D. N. et al. Persistent enhancement of bacterial motility increases tumor penetration. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 11, p. 2397–2405, nov. 2015.

TIBO, L. H. Imunomodulação intravesical com *Salmonella* enterica e violaceína para o tratamento do câncer de bexiga urinária não músculo (CBNMI). Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 2019.

TOLEY, B. J.; FORBES, N. S. Motility is critical for effective distribution and accumulation of bacteria in tumor tissue. **Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro**, v. 4, n. 2, p. 165–176, fev. 2012.

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 25, n. 1, p. 16–27, jan. 2016.

TOSO, J. F. et al. Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella* typhimurium to patients with metastatic melanoma. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 20, n. 1, p. 142–152, 1 jan. 2002.

TURNER, L. et al. Increased Outer Membrane Vesicle Formation in a *Helicobacter pylori* tolB Mutant. **Helicobacter**, v. 20, n. 4, p. 269–283, ago. 2015.

VAN LEEUWEN, F. N. Therapeutic targeting of mutated p53 in acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 105, n. 1, p. 10–11, jan. 2020.

VASILYEVA, N. V. et al. Outer membrane vesicles of *Lysobacter* sp. **Doklady. Biochemistry and Biophysics**, v. 426, p. 139–142, jun. 2009.

VERINAUD, L. et al. Violacein Treatment Modulates Acute and Chronic Inflammation through the Suppression of Cytokine Production and Induction of Regulatory T Cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0125409, 4 maio 2015.

VITIELLO, M. et al. Antitumoral effects of attenuated *Listeria monocytogenes* in a genetically engineered mouse model of melanoma. **Oncogene**, v. 38, n. 19, p. 3756–3762, maio 2019.

WOJTKOWIAK, J. W. et al. Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 6, p. 2032–2038, 5 dez. 2011.

XIONG, G. et al. Novel Cancer Vaccine Based on Genes of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 126, n. 11, p. 2622–2634, 1 jun. 2010.

XU, X. et al. Effective cancer vaccine platform based on attenuated *Salmonella* and a type III secretion system. **Cancer Research**, v. 74, n. 21, p. 6260–6270, 1 nov. 2014.

XYLIA, P. et al. *Salmonella* Enteritidis survival in different temperatures and nutrient solution pH levels in hydroponically grown lettuce. **Food Microbiology**, v. 102, p. 103898, 1 abr. 2022.

YADA, S. et al. Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. **Marine Biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 10, n. 2, p. 128–132, abr. 2008.

YANG, L. H. et al. Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 625–630, jun. 2007.

YANG, M. et al. An obligatory anaerobic *Salmonella* typhimurium strain redirects M2 macrophages to the M1 phenotype. **Oncology Letters**, v. 15, n. 3, p. 3918–3922, mar. 2018.

YANG, N. et al. Oral administration of attenuated *S. typhimurium* carrying shRNA-expressing vectors as a cancer therapeutic. **Cancer Biology & Therapy**, v. 7, n. 1, p. 145–151, jan. 2008.

YANG, Y.-W. et al. Tumor-targeted delivery of a C-terminally truncated FADD (N-FADD) significantly suppresses the B16F10 melanoma via enhancing apoptosis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 34178, 21 out. 2016.

YOON, W. et al. Application of genetically engineered *Salmonella* typhimurium for interferon-gamma-induced therapy against melanoma. **European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)**, v. 70, p. 48–61, jan. 2017.

YOON, W. et al. Therapeutic advantage of genetically engineered *Salmonella* typhimurium carrying short hairpin RNA against inhibin alpha subunit in cancer treatment. **Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology**, v. 29, n. 9, p. 2010–2017, 1 set. 2018.

YU, B. et al. Explicit hypoxia targeting with tumor suppression by creating an “obligate” anaerobic *Salmonella* Typhimurium strain. **Scientific Reports**, v. 2, p. 436, 2012.

ZARGAR, A. et al. Overcoming the challenges of cancer drug resistance through bacterial-mediated therapy. **Chronic Diseases and Translational Medicine**, v. 5, n. 4, p. 258–266, dez. 2019.

ZHA, L.; GARRETT, S.; SUN, J. *Salmonella* Infection in Chronic Inflammation and Gastrointestinal Cancer. **Diseases**, v. 7, n. 1, p. 28, 10 mar. 2019.

ZHANG, M.; FORBES, N. S. Trg-deficient *Salmonella* colonize quiescent tumor regions by exclusively penetrating or proliferating. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 199, p. 180–189, 10 fev. 2015.

ZHANG, X. et al. *Salmonella* VNP20009-mediated RNA interference of ABCB5 moderated chemoresistance of melanoma stem cell and suppressed tumor growth more potently. **Oncotarget**, v. 7, n. 12, p. 14940–14950, 22 mar. 2016.

ZHANG, X.-L.; JEZA, V. T.; PAN, Q. *Salmonella* Typhi: from a Human Pathogen to a Vaccine Vector. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 5, n. 2, p. 91–97, abr. 2008.

ZHAO, M. et al. Targeted therapy with a *Salmonella* typhimurium leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice. **Cancer Research**, v. 66, n. 15, p. 7647–7652, 1 ago. 2006.

ZHAO, T. et al. Combination of attenuated *Salmonella* carrying PD-1 siRNA with nifuroxazide for colon cancer therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 121, n. 2, p. 1973–1985, fev. 2020.

ZHENG, J. H. et al. Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered *Salmonella* typhimurium secreting heterologous flagellin. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 376, p. eaak9537, 8 fev. 2017.

ZHENG, J. H.; MIN, J.-J. Targeted Cancer Therapy Using Engineered *Salmonella* typhimurium. **Chonnam Medical Journal**, v. 52, n. 3, p. 173–184, set. 2016.

ZHOU, S. et al. Suppression of pancreatic ductal adenocarcinoma growth by intratumoral delivery of attenuated *Salmonella* typhimurium using a dual fluorescent live tracking system. **Cancer Biology & Therapy**, v. 17, n. 7, p. 732–740, 18 abr. 2016.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito antitumoral de novos mutantes atenuados de *Salmonella enterica* Typhimurium e de vesículas de membrana externa carregadas de violaceína *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos específicos

Capítulo I

- Clonar as sequências codificadoras da proteína p53 no vetor de expressão eucariota pYA4545.
- Caracterizar o crescimento, a habilidade de invasão e a sobrevivência do mutante atenuado *S. enterica* Typhimurium UK-1 χ 11218 pYA4545p53.
- Analisar a expressão da proteína p53 em células tumorais.
- Avaliar o efeito antitumoral de *S. enterica* Typhimurium UK-1 χ 11218 pYA4545p53 em células de carcinoma de bexiga humana 5637 e RT4.

Capítulo II

- Construir novos mutantes atenuados de *S. enterica* Typhimurium com potencial antitumoral.
- Caracterizar o crescimento, a habilidade de invasão e a sobrevivência dos mutantes construídos.
- Analisar a virulência dos novos mutantes no modelo de *Galleria mellonella*.
- Analisar a citotoxicidade dos novos mutantes em células de carcinoma de bexiga humana 5637 e em células de melanoma murino B16F10.
- Avaliar a toxicidade dos tratamentos com mutantes em modelo murino.
- Avaliar o efeito antitumoral de mutantes atenuados de *S. enterica* Typhimurium no modelo murino de melanoma.

Capítulo III

- Isolar OMVs carregadas de violaceína a partir de mutante atenuado e hipervesiculado e produtor de violaceína
- Caracterizar OMVs carregadas de violaceína por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (do inglês: Nanoparticle-Tracking Analysis – NTA); quantificar o conteúdo total de proteínas por Bradford, microscopia eletrônica de transmissão e cromatografia líquida de alta afinidade (do inglês: High Performance Liquid Chromatography – HPLC).
- Avaliar o efeito antitumoral de OMVs carregadas de violaceína em culturas 2D e 3D de células de melanoma murino B16F10.
- Analisar a toxicidade do tratamento com OMVs carregadas de violaceína no modelo murino.
- Avaliar o efeito antitumoral de OMVs carregadas de violaceína no modelo murino de melanoma.

CAPÍTULO I

A entrega do gene p53 por Salmonella enterica Typhimurium recombinante leva à morte de células de carcinoma da bexiga humana in vitro

CAPÍTULO I: A entrega do gene *p53* através de *Salmonella enterica* Typhimurium recombinante leva à morte de células de carcinoma da bexiga humana *in vitro*

Este capítulo foi publicado no periódico *Letters in Applied Microbiology* (ISSN: 0266-8254) com o título “*p53* gene delivery via a recombinant *Salmonella enterica* Typhimurium leads to human bladder carcinoma cell death *in vitro*”

Resumo

Numerosos estudos tentaram restaurar a função do supressor tumoral *p53* como uma estratégia anticancerígena por meio da entrega de genes. No entanto, a maioria dos estudos empregou vetores não bacterianos para entregar *p53*. Várias bactérias anaeróbicas facultativas e obrigatórias têm sido propostas como vetores devido à sua capacidade intrínseca de direcionamento do tumor e à atividade antitumoral. *Salmonella enterica* Typhimurium é o vetor bacteriano mais estudado na terapia anticâncer. Neste estudo, usamos a cepa previamente desenhada χ 11218 de *S. enterica* Typhimurium, que exibe lise retardada regulada, como um vetor para entregar *p53* a células de carcinoma de bexiga humano, restaurando a função da proteína *p53* de tipo selvagem. Clonamos *p53* em pYA4545 (contendo um sistema de expressão eucariótico) para gerar a cepa χ 11218 pYA4545p53. A clonagem de *p53* não afetou o crescimento, nem interferiu na capacidade invasiva e replicativa da bactéria χ 11218 em células tumorais. Células de carcinoma da bexiga humana (expressando *p53* mutado) transfectadas com pYA4545p53 mostraram um aumento significativo na expressão da proteína *p53*. Demonstramos que *p53* entregue por χ 11218 diminuiu significativamente a viabilidade de células cancerígenas da bexiga humana de maneira dose-dependente. Este estudo demonstra a aplicabilidade da cepa χ 11218 atenuada como vetor para plasmídeos de DNA que expressam genes supressores de tumor.

Palavras-chave: supressor tumoral; *Salmonella enterica* Typhimurium; terapia de genes; carcinoma de bexiga.

I.1 Introdução

Várias bactérias anaeróbicas facultativas e obrigatórias têm sido propostas como vetores de terapia gênica devido à sua capacidade intrínseca de direcionamento ao tumor e à atividade antitumoral. Por exemplo, a bactéria anaeróbica facultativa e flagelada *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium é um vetor bacteriano bem estudado na terapia anticâncer (ZHOU et al., 2018). Há inúmeras vantagens na entrega de agentes anticancerígenos em comparação com outros vetores não bacterianos atualmente usados (JIANG et al., 2013). Essas vantagens incluem fácil manipulação genética, direcionamento intrínseco ao tumor, colonização preferencial de tecidos tumorais, atividade antitumoral e custo-benefício (HIRSCH WERLE et al., 2016; ZHOU et al., 2018).

A *S. enterica* Typhimurium foi desenhada para fornecer moléculas terapêuticas, incluindo vacinas de DNA (KONG et al., 2012; GAO et al., 2019). Por exemplo, a tecnologia foi desenvolvida para entregar eficientemente construções de DNA terapêuticas usando a cepa recombinante de *S. enterica* Typhimurium χ 11218 (KONG et al., 2012). A cepa χ 11218 é uma cepa atenuada e hiperinvasiva que é otimizada para transportar DNA heterólogo. Além disso, na ausência de arabinose e ácido diaminopimélico (DAP), sofre lise celular. A cepa χ 11218 foi usada anteriormente para entregar vacinas de DNA contra vírus (KONG et al., 2012; GAO et al., 2019). Esses achados demonstram que a cepa χ 11218 pode ser uma ferramenta valiosa para a entrega de genes terapêuticos para tratar outras doenças, como o câncer.

A segurança do vetor *S. enterica* Typhimurium χ 11218, desenvolvido pelo Laboratório do Prof. Roy Curtiss (KONG et al., 2012), baseia-se na deleção ou interrupção de genes envolvidos na produção de estruturas bacterianas ou compostos metabólicos essenciais para sobrevivência, que não são encontrados no ambiente ou em tecidos de mamíferos. Uma das mutações mais exploradas é a mutação Δasd , gene necessário para formar o ácido diaminopimélico (DAP), um componente essencial da parede celular bacteriana. Como resultado, as células sofrem lise devido à sua incapacidade de produzir peptidoglicano. Além disso, as mutações $\Delta araBAD$ e $\Delta araE$ impedem o uso de arabinose, prolongando o tempo de lise em uma ou duas divisões celulares (CLARK-CURTISS; CURTISS, 2018). O mesmo é válido para a mutação $\Delta murA$. Ao contrário do tipo selvagem, em um experimento com diferentes cepas de RASV (χ 9354, χ 11214, χ 11215 e

χ 11218), todos os camundongos sobreviveram e não apresentaram sinais de doença (KONG et al., 2012).

O câncer de bexiga é um dos cânceres mais comuns em todo o mundo, com 573.278 novos casos relatados e mais de 212.530 mortes em 2020 (SUNG et al., 2021). Aproximadamente 90% dos casos de câncer de bexiga são classificados como carcinomas de células uroteliais (CHALASANI; CHIN; IZAWA, 2009). O tratamento padrão para o câncer de bexiga envolve a ressecção transuretral de tumores de bexiga e a cistectomia radical, acompanhada de terapia adjuvante (quimioterapia ou terapia intravesical com *Bacillus Calmette-Guérin*, ou BCG). No entanto, as taxas de recorrência são altas e a progressão da doença é comum (RINK et al., 2013). A progressão do tumor e o mau prognóstico têm sido associados a mutações no gene *p53* em pacientes com carcinoma urotelial (SALINAS-SÁNCHEZ et al., 2008).

O fator de transcrição *p53* é uma proteína supressora de tumor essencial, e mutações em *p53* são observadas em aproximadamente 50% dos cânceres humanos diagnosticados (VAN LEEUWEN, 2020). Estudos anteriores demonstraram que a restauração funcional de *p53* é uma terapia promissora para o tratamento de diferentes tipos de câncer, incluindo câncer de bexiga (PAGLIARO et al., 2003a, 2003b). No entanto, a maioria dos estudos sobre a restauração funcional do *p53* usa vírus (PAGLIARO et al., 2003a) ou nanopartículas (KONG et al., 2019) para a entrega de genes. Poucos estudos exploraram o uso potencial de vetores bacterianos para a entrega de *p53* a células cancerígenas da bexiga (JIANG et al., 2013). Considerando que o BCG é amplamente utilizado na terapia do câncer de bexiga, o uso de cepas atenuadas de *S. enterica* Typhimurium para a mesma finalidade é uma opção atraente, principalmente porque essa bactéria é um vetor adequado para moléculas terapêuticas ou imunogênicas (GAO et al., 2020).

Aqui, exploramos o potencial da cepa χ 11218 como um vetor para entregar *p53* funcional a células 5637 de carcinoma de bexiga. Os resultados demonstram a capacidade de χ 11218 de entregar eficientemente *p53* às células de câncer de bexiga e de reduzir sua viabilidade, um resultado também observado para células de papiloma de bexiga RT4, estabelecendo um procedimento atraente e encorajador para a terapia do câncer de bexiga.

I.2 Materiais e métodos

I. 2.1 Bactérias, plasmídeos, cepas celulares e condições de crescimento

As cepas de *Escherichia coli* χ 6212 e *S. enterica* Typhimurium UK-1 χ 11218 (KONG et al., 2012) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Roy Curtiss III (Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade da Flórida, EUA). Essas cepas foram cultivadas com agitação a 150 rpm, 37 °C em caldo Luria Bertani (LB) e em placas de ágar LB suplementadas com DAP (50 μ g/mL) e L-arabinose 0,2%, sempre que necessário. A χ 6212 foi usada como cepa hospedeira para clonagem de DNA e χ 11218 foi usada como cepa transportadora para *p53*.

O plasmídeo pYA4545 (dependente de arabinose), gentilmente cedido pelo Prof. Roy Curtiss III, foi utilizado para a expressão eucariótica da proteína *p53*. O gene que codifica a *p53* humana de tipo selvagem foi clonado a partir do plasmídeo pcDNA3p53WT (LOUGHERY et al., 2014). O plasmídeo pYA4685 (pYA4545 codificando a proteína verde fluorescente, gentilmente cedido pelo Prof. Roy Curtiss III) foi utilizado como controle de expressão.

Células 5637 de carcinoma de bexiga humana (expressando uma versão mutante e não funcional da proteína *p53*), células de papiloma de bexiga humana RT4 (*p53* tipo selvagem) e células de adenocarcinoma de próstata humana PC-3 (que não expressam a proteína *p53*) foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor a 37 °C e em uma atmosfera de 5% de CO₂. A solução antibiótica (1% penicilina-estreptomicina) foi adicionada para inibir contaminantes bacterianos.

I.2.2 Manipulação de DNA

O DNA de plasmídeos foi extraído e purificado como descrito previamente (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Os plasmídeos pYA4545 (KONG et al., 2012) e pcDNA3p53WT (LOUGHERY et al., 2014) foram digeridos a 37 °C com enzimas de restrição KpnI e XhoI (New England Biolabs Inc). O fragmento que codifica *p53* (com sequência Kozak) foi visualizado sob a luz UV após eletroforese em gel de agarose a 1% e corado com brometo de etídio (0,5 mg/ml). O fragmento de DNA foi purificado com o kit GFX PCR DNA e Gel Band Purification (Illustra GFX, GE Healthcare, Chicago, IL, EUA). O fragmento de *p53* purificado foi ligado ao vetor pYA4545 (a jusante do promotor de CMV) usando o kit Quick Ligation (New England Biolabs Inc), o que gerou pYA4545p53. O plasmídeo pYA4545p53 foi amplificado na cepa de *E. coli*

χ 6212, purificado e subsequentemente transformado por eletroporação na cepa de *S. enterica* Typhimurium χ 11218 para obter a cepa recombinante χ 11218 pYA4545p53.

I.2.3 Crescimento *in vitro*

As curvas de crescimento das cepas recombinantes foram realizadas conforme descrito anteriormente (MILANEZ et al., 2018). Resumidamente, as cepas χ 11218 pYA4545p53 e χ 11218 pYA4545 foram semeadas em placas de LB ágar suplementadas com arabinose (0,2%) e incubadas a 37 °C por 16 horas. No dia seguinte, uma única colônia foi ressuspensa em 3 ml de LB suplementado com arabinose (0,2%) e cultivada durante a noite (16 horas) em uma incubadora com agitação (37 °C, 150 rpm). No dia seguinte, 0,5 ml de cultura foi inoculado em 50 ml de caldo LB fresco suplementado com arabinose (0,2%). O crescimento bacteriano foi monitorado por 12 horas a 37 °C com agitação a 150 rpm, medindo a densidade óptica (OD₆₀₀) a cada 2 horas, e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram determinadas por plaqueamento de diluições seriadas em placas de LB ágar suplementadas com arabinose. O experimento de crescimento *in vitro* foi realizado em triplicado.

I.2.4 Análise de invasão e replicação bacteriana

Para avaliar a capacidade invasiva e de sobrevivência das cepas χ 11218 pYA4545 e χ 11218 pYA4545p53 em células 5637, utilizou-se um ensaio de gentamicina, para eliminar bactérias extracelulares, adaptado de um protocolo padrão (ELSINGHORST, 1994).

Resumidamente, 3×10^5 células eucarióticas por poço em RPMI com 10% SFB sem antibióticos foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO₂ por 20 horas. Em seguida, as células foram infectadas por 1 horas com culturas bacterianas em diferentes MOIs (Multiplicidade de infecção, do inglês: *multiplicities of infection*). As células 5637 foram lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato 1X (PBS) e incubadas por 2 horas em RPMI com gentamicina (100 µg/ml) para eliminar as bactérias extracelulares. Para o teste de sobrevivência, os poços foram lavados com PBS, foi adicionado RPMI com gentamicina (20 µg/ml) e a placa foi incubada por 5 horas. Em seguida, as células foram lisadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS, diluídas e semeadas em LB-agar para calcular as unidades formadoras de colônias (UFC). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

I.2.5 Determinando a síntese de EGFP por microscopia de fluorescência

As células 5637 (1×10^4 por poço) foram cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C e 5% de CO₂ por 20 horas. No dia seguinte, as células foram transfectadas com 100 ng do plasmídeo pYA4685, utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Após 48 horas do início da transfecção, o RPMI foi substituído por solução Hoechst 33342 (1 µM, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) em FluoroBrite Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA) e incubados por 30 minutos a 37 °C. As imagens foram capturadas com uma objetiva de 10x sob filtros GFP e DAPI, usando um Cytation™ Cell Imaging Multi-Mode Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). Os experimentos foram realizados em triplicado.

I.2.6 Western blotting para detectar a expressão de p53

As células tumorais foram transfectadas com 1 µg de plasmídeos pYA4545 ou pYA4545p53 usando Lipofectamine 2000. Após 48 horas, as células foram lisadas com tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA) (Merck, Temecula, CA, EUA) suplementado com um coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As proteínas foram obtidas após centrifugação ($12000 \times g$ por 20 minutos, 4°C) de lisados celulares e coleta de sobrenadantes. Trinta microgramas de proteína foram quantificados usando o Bradford, ensaio de proteína (BRADFORD, 1976), e separados por gel SDS-PAGE a 12%. Após a eletroforese, as proteínas foram eletricamente transferidas para membranas de nitrocelulose. Em seguida, as membranas foram bloqueadas com BSA a 3%, diluídas em PBS e incubadas com um anticorpo p53 (10442-1-AP, 1:2000, Protein Tech, Rosemont, IL, EUA); β-actina (SC47778, 1:1000, Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, EUA) foi usada como controle endógeno. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com IgG anticamundongo conjugado com peroxidase de rábano (HRP) (A2304, 1:10.000, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) por 2 horas. Seguida por lavagens, a atividade da peroxidase foi detectada por incubação com uma solução de 3,3'-diaminobenzidina. A intensidade da banda foi quantificada por densitometria usando o software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

I.2.7 Ensaio de viabilidade celular de calceína AM

As células 5637 e RT4 foram transfectadas com plasmídeos ou infectadas com bactérias recombinantes por 1 hora. As células infectadas foram lavadas com RPMI suplementado com 100µg/ml de gentamicina por 1 hora e depois incubadas com RPMI contendo 20 µg/ml de

gentamicina. A viabilidade celular foi avaliada após 24, 48 e 72 horas de transfecção ou infecção, usando FluoroBrite™ DMEM (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA) contendo calceína-AM (1 μ M, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA), Hoechst 33342 (1 μ M, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e homodímero-1 de etídio (EthD-1, 1 μ M, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA). A viabilidade celular foi medida após 30 minutos de incubação a 37 °C medindo a fluorescência da calceína AM (492/517 nm, excitação/emissão). A viabilidade celular foi normalizada para as células 5637 não tratadas. As imagens das células foram capturadas com uma objetiva de 10x sob filtros GFP, PI e DAPI, usando um leitor multimodo Cytation™ Cell Imaging (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). Os experimentos foram realizados em triplicado.

I.2.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism (versão 7.0, San Diego, CA, EUA). Os resultados são apresentados como a média $\pm$ desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada por análise de variância (ANOVA), seguida de post-hoc de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

I.3 Resultados e discussão

Neste estudo, examinamos o potencial de *S. enterica* Typhimurium recombinante com lise retardada regulada como um vetor para restaurar a função de tipo selvagem da proteína *p53* na linhagem de células de câncer de bexiga humano 5637. O vetor pYA4545 foi clonado para transportar DNA codificador da proteína *p53* com a sequência Kozak a jusante do promotor de CMV, gerando o vetor pYA4545*p53* (Figura I.1.A). Portanto, a expressão de *p53* é guiada por um sistema de expressão eucariótico. A clonagem bem-sucedida de *p53* no vetor pYA4545 foi confirmada por digestão de DNA com enzimas de restrição KpnI e XhoI e subsequente análise do perfil eletroforético (dados não mostrados). Analisamos se a clonagem de *p53* em pYA4545 interferiu no tempo de geração da cepa χ 11218 ou afetou suas capacidades invasiva e replicativa na linhagem de células de carcinoma de bexiga humano 5637. Observamos que a clonagem de *p53* não afetou o crescimento (Figura I.1.B) ou interferiu com o invasivo e a capacidade replicativa da bactéria χ 11218 em 5637 células (Figura. I.1.C).

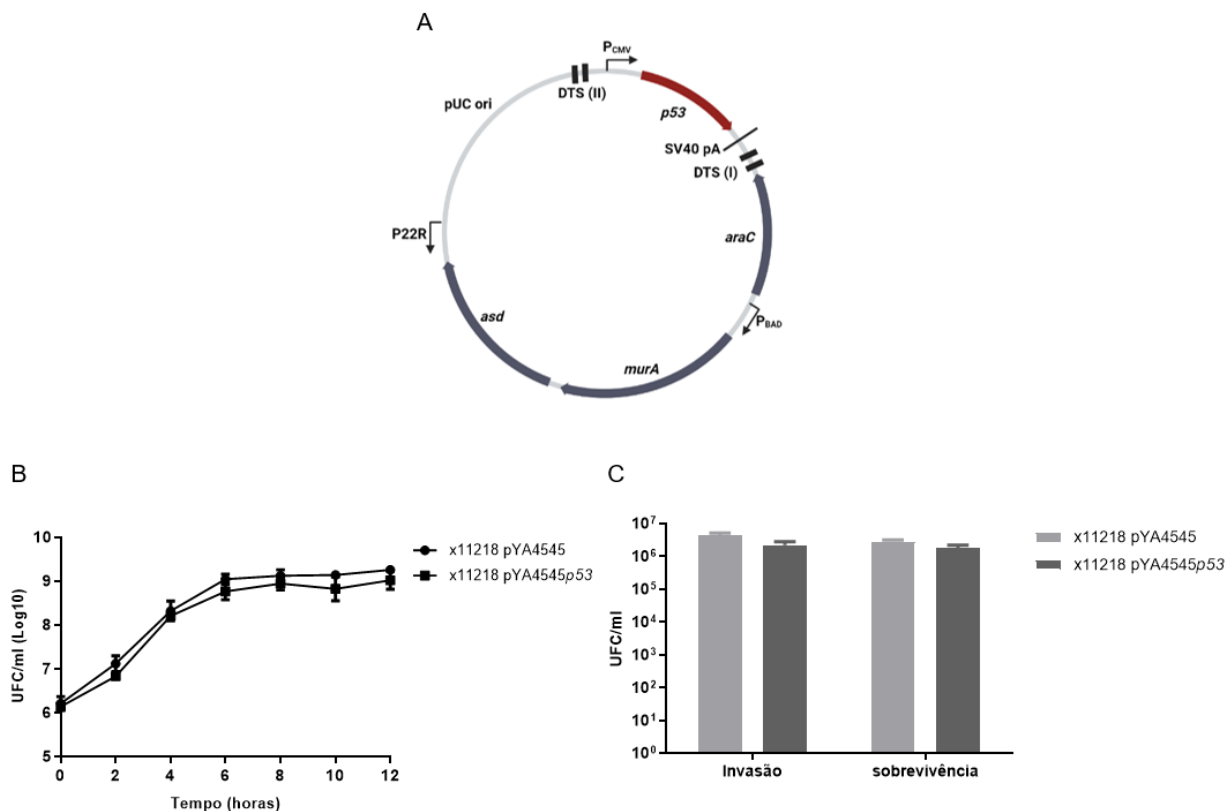


Figura I.1. Caracterização do crescimento, da invasão celular e da sobrevivência de *Salmonella enterica* Typhimurium χ 11218 pYA4545p53. A. Mapa do vetor pYA4545p53. O plasmídeo inclui os promotores P_{CMV}, P_{BAD} e P22R; os genes *p53*, *araC*, *murA* e *asd*; e SV40 poli A tardio, DTS (I) e DTS (II) (Com base em Kong et al., 2012). B. Curva de crescimento bacteriano. O crescimento de *S. enterica* Typhimurium UK-1 χ 11218 pYA4545p53 e de *S. enterica* Typhimurium UK-1 χ 11218 pYA4545 foram monitorados por 12 horas em intervalos de 2 horas determinando UFC. Os dados são os resultados de três experimentos independentes. C. Capacidade de invasão e sobrevivência de χ 11218 pYA4545p53 e χ 11218 pYA4545 na linha celular de carcinoma da bexiga humana 5637. São fornecidos os resultados da contagem de UFC/ml recuperada após lise celular. Os resultados são representados como a média $\pm$ SD de três experimentos independentes realizados em poços em triplicado. A significância estatística foi determinada usando ANOVA de uma via.

Além disso, não encontramos diferenças significativas entre os números de UFC/ml recuperados de células 5637 infectadas com χ 11218 pYA4545p53 ou χ 11218 pYA4545 em vários MOIs (entre 20-50). A Figura I.1.C mostra resultados representativos obtidos em um MOI de aproximadamente 50. As bactérias χ 11218 carregando o gene *p53* foram capazes de invadir e replicar em células 5637 com eficiência semelhante à de sua cepa original, que foi previamente

descrita como hiperinvasiva (KONG et al., 2012). Esses resultados concordam com as capacidades invasiva e replicativa relatadas anteriormente de *S. enterica* Typhimurium atenuada recombinante em células de carcinoma cervical (MOI: 50:1) (KONG et al., 2012).

A capacidade de invasão melhorada da cepa χ 11218 é atribuída à substituição do promotor do gene *hila* pelo promotor constitutivo *trc* (Δ *phlA::Ptrc* Δ *lacO888hila*) (KONG et al., 2012), que produz uma cepa de *S. enterica* Typhimurium com um fenótipo hiperinvasivo que não requer sinais ambientais para expressar *hila*. A replicação aumentada do citosol da cepa χ 11218 é atribuída à deleção cromossômica irreversível de *sifA* (BEUZÓN et al., 2000; KONG et al., 2012). A deleção de *sifA* permite que *S. enterica* Typhimurium escape dos endossomos e seja liberada no citosol antes da lise (BEUZÓN et al., 2000). As capacidades invasivas e replicativas de uma cepa vetor são essenciais para garantir a entrega eficiente de genes às células em quantidades suficientes para a modulação subsequente da transcrição de genes nucleares (GRILLOT-COURVALIN et al., 1998).

Após invadir as células tumorais, a cepa de *S. enterica* Typhimurium χ 11218 escapa do compartimento endossomal e sofre lise no citoplasma devido à ausência de arabinose. A lise de χ 11218 libera o plasmídeo pYA4545p53 que contém sequências de direcionamento nuclear de DNA DTS (I) e DTS (II) (KONG et al., 2012). Essas sequências facilitam a translocação nuclear do plasmídeo para a produção subsequente da proteína p53. Demonstramos que os plasmídeos pYA4685 e pYA4545p53 podem expressar eficientemente as proteínas verde fluorescente (EGFP) e p53, respectivamente, sob o controle do promotor CMV em células 5637 transfectadas (Figura I.2), demonstrando o sucesso da translocação nuclear dos plasmídeos.

A transfecção de células 5637 com pYA4545p53 foi correlacionada com um aumento significativo na expressão da proteína p53 quando comparada à sua expressão em células 5637 transfectadas com pYA4545 (Figura I.2). Resultados semelhantes foram observados quando as células foram infectadas com χ 11218 pYA4545p53 ou χ 11218pYA4545 em um MOI de 50 (dados não mostrados). As células 5637 expressam uma versão mutante e não funcional da proteína p53. No entanto, o anticorpo p53 neste estudo não distinguiu entre proteínas p53 mutadas e p53 de tipo selvagem. Para confirmar nossos resultados para a expressão de p53, avaliamos a expressão dessa proteína em células PC-3 (células de câncer de próstata), que não expressam naturalmente a proteína p53 (p53 nulo). Para tanto, a expressão de p53 foi comparada entre células PC-3

transfectadas com pYA4545 ou pYA4545p53 e células não transfectadas. Como esperado, observamos apenas a expressão da proteína *p53* em células transfectadas com pYA4545p53 (Figura I.2). Nossos resultados corroboram estudos anteriores (KONG et al., 2012; GAO et al., 2019; JIANG et al., 2019). Esses resultados indicam que a expressão eucariótica do plasmídeo pYA4545 é um vetor de entrega de genes eficaz para uso em *S. enterica* Typhimurium recombinante.

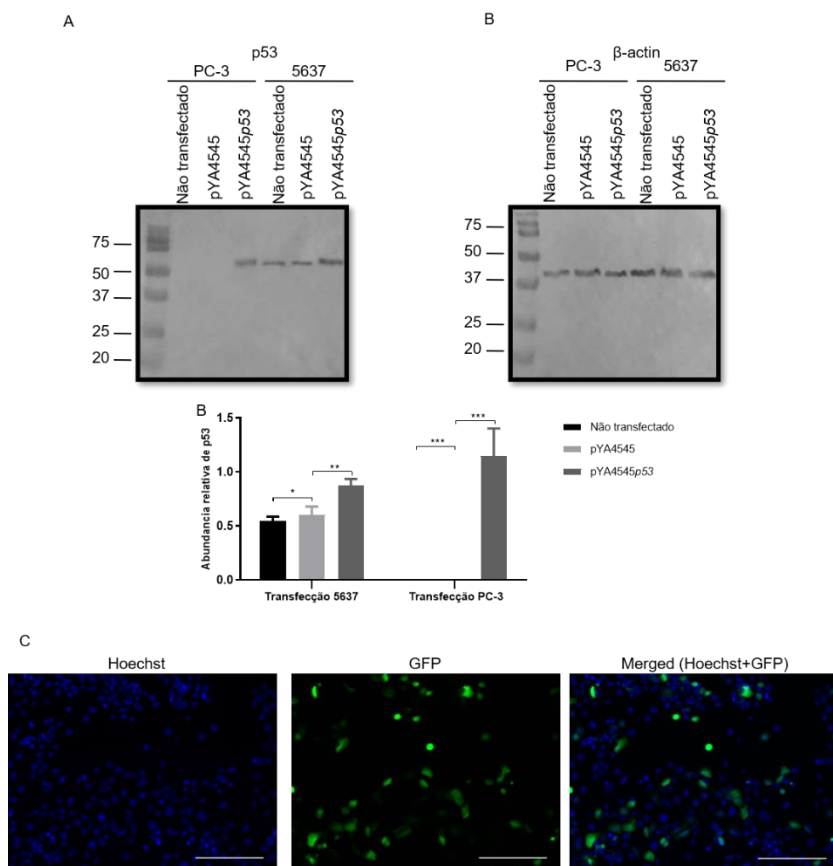


Figura I.2. Análise da expressão de *p53* e EGFP em células tumorais. A. Western blot mostrando os níveis de expressão da proteína *p53* nas células de adenocarcinoma de próstata humano PC-3 (*p53* nulo) e nas células de carcinoma de bexiga humano 5637 (*p53* mutado e não funcional) após transfecção com 1μg de pYA4545p53 ou pYA4545. Os lisados celulares foram preparados após 48 horas de transfecção. B. Determinação semiquantitativa usando ImageJ de níveis de proteína *p53* comparados e normalizados com controle endógeno (β-actina). Os resultados são apresentados como a média ± SD de três experimentos. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ vs. grupo não transfectado. C. Imagens mostrando fluorescência de EGFP em células 5637. A transfecção de EGFP foi realizada usando o vetor plasmidial pYA4685 (pYA4545-EGFP). O DNA nuclear foi corado com Hoechst (fluorescência azul). Barra de escala: 200 μm.

O *p53* é um fator de transcrição que induz apoptose ou parada do ciclo celular (KRUISWIJK; LABUSCHAGNE; VOUSDEN, 2015). Portanto, avaliamos a viabilidade de células 5637 após infecção com a cepa χ 11218 pYA4545*p53* ou transfecção com pYA4545*p53*. Nossos resultados demonstraram que tanto o tratamento com χ 11218 pYA4545*p53* quanto a transfecção com lipofectamina de pYA4545*p53* em células de carcinoma de bexiga humana diminuíram significativamente ($p < 0,05$) sua viabilidade (Figura I.3). Estudos anteriores demonstraram que a entrega de *p53* de tipo selvagem por vetores virais inibe o crescimento de células de câncer de bexiga *in vivo* e *in vitro* (PAGLIARO et al., 2003a, 2003b; RUIFA et al., 2006; JI et al., 2011). Por exemplo, a entrega de *p53* pelo vetor adenoviral de replicação deficiente, Ad5CMV*p53*, diminuiu a viabilidade de três linhagens celulares de câncer de bexiga (PAGLIARO et al., 2003b). A entrega de *p53* por vetores adenovirais em um ensaio clínico de fase I revelou que essa estratégia de tratamento é bem tolerada e tem efeitos antitumorais em carcinomas de células transicionais da bexiga (PAGLIARO et al., 2003a). No entanto, os vetores virais não podem migrar ativamente para todos os nichos tumorais, uma deficiência que pode ser superada usando vetores baseados em *S. enterica* Typhimurium (RAMAN et al., 2019).

Além disso, o uso da cepa χ 11218 como um vetor para entrega de *p53* é mais atraente do que o uso de vetores virais ou *p53* transfectado com lipofectamina devido à atividade antitumoral intrínseca de *S. enterica* Typhimurium (Fig. 3D-E). Observamos que a cepa χ 11218 possui atividade anticancerígena intrínseca em células 5637 (Fig. 3). Quando infectamos células 5637 em um MOI de 50, observamos uma diminuição na viabilidade das células infectadas com χ 11218 pYA4545*p53*. Entretanto, nenhum efeito antitumoral intrínseco de χ 11218 pYA4545 foi observado. Já quando as células foram infectadas em um MOI de 100, foi evidente um efeito antitumoral inerente de χ 11218 pYA4545. Observamos uma diminuição na viabilidade celular quando infectadas com χ 11218 pYA4545 e uma diminuição mais pronunciada quando as células foram infectadas com χ 11218 pYA4545*p53*. Resultados semelhantes foram observados em um MOI de 200 (Figura I.3.A-C). Também avaliamos a viabilidade de células de papiloma de bexiga RT4 após infecção com a cepa χ 11218 pYA4545*p53* (Figura I.4). Resultados semelhantes foram observados nos três MOIs avaliados (50, 100 e 200). Esses resultados indicam um efeito melhorado entre a restauração funcional ou superexpressão de *p53* e a atividade antitumoral intrínseca de *S. enterica* Typhimurium χ 11218. Assim, os dados apresentados neste estudo

demonstram que *S. enterica* Typhimurium χ 11218 pode fornecer uma plataforma de entrega eficiente para supressores tumorais na terapia do câncer de bexiga, com a vantagem adicional de atividade antitumoral intrínseca.

A entrega do gene *p53* às células 5637 e RT4 diminuiu sua viabilidade entre 14-64% e 26,8-82% respectivamente (Figura I.3-4). O efeito observado foi dependente da dose, com a redução mais significativa na viabilidade observada quando as células tumorais foram tratadas com χ 11218 pYA4545p53 a um MOI de 200. Além disso, χ 11218 pYA4545p53 induziu mais eficientemente a morte celular em comparação com χ 11218 pYA4545, como demonstrado pela predominância de células coradas com homodímero de etídio, um marcador de morte celular (Figura I.3.F e Figura I.4.D). Estudos anteriores usando adenovírus para superexpressar *p53* (MOI: 200) relataram diminuição da viabilidade somente após 72 horas (RUIFA et al., 2006). No entanto, nossos dados mostraram viabilidade diminuída após 24 horas, com um MOI 4 vezes menor (50), e essa redução também foi observada após 48 horas e 72 horas. Contudo, o nível de redução da viabilidade não foi significativamente diferente entre os três tempos avaliados (24, 48 e 72 horas) em nenhum dos tratamentos (infecção com χ 11218pYA4545p53 ou transfecção com pYA4545p53). Esses achados são semelhantes aos relatados em estudos anteriores de superexpressão ou restauração da função de *p53* usando vetores virais (diminuição da viabilidade entre 20-59,7%) (PAGLIARO et al., 2003b; RUIFA et al., 2006; JI et al., 2011).

Até onde sabemos, este estudo é o primeiro a relatar a entrega de *p53* de tipo selvagem de um vetor de DNA para células de carcinoma de bexiga humano usando *S. enterica* Typhimurium atenuada. Estudos anteriores demonstraram que a cepa nula *S. enterica* Typhimurium phoP/phoQ carregando *p53* e MDM2 siRNA diminuiu o crescimento de células de câncer de próstata (JIANG et al., 2013). No entanto, esse método tinha algumas desvantagens, incluindo o uso de um plasmídeo com um gene de resistência a antibióticos. Apesar da atenuação, a cepa nula de *S. enterica* Typhimurium phoP/phoQ exibe colonização de longo prazo em humanos (ANGELAKOPOULOS; HOHMANN, 2000), o que é considerado uma característica indesejável para vetores de entrega de bactérias vivas devido a questões de segurança.

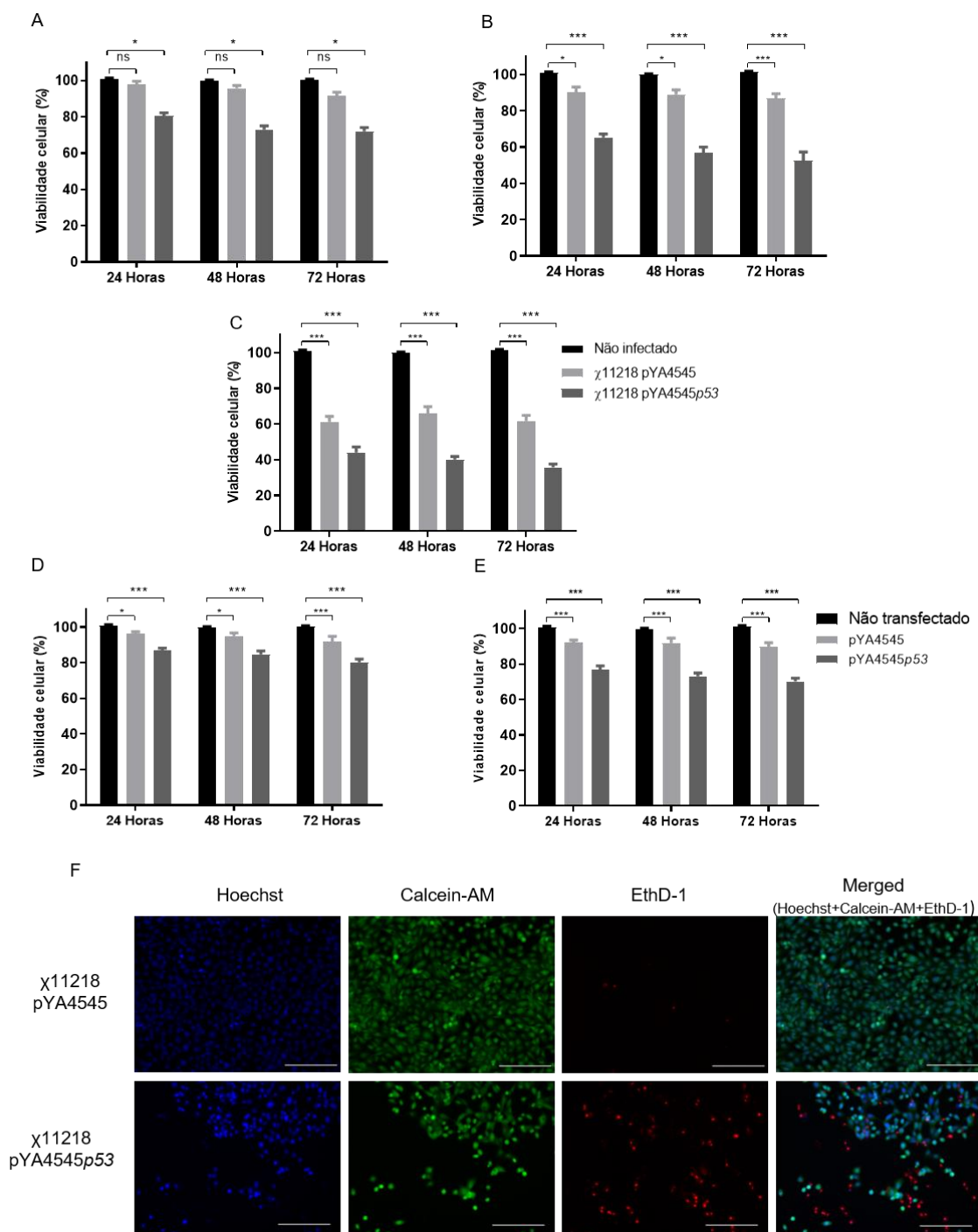


Figura I.3. Viabilidade da linha celular de carcinoma da bexiga humana 5637 infectada com bactérias recombinantes (MOI: 50, 100 ou 200) ou transfectadas com plasmídeos (0,5 μ g ou 1 μ g). A. As células 5637 foram infectadas (MOI: 50) por incubação com χ 11218 pYA4545p53 ou a cepa parental por 1 hora. B. As células 5637 foram infectadas (MOI: 100) com χ 11218 pYA4545p53 ou a cepa parental por incubação por 1 hora. C. As células 5637 foram infectadas (MOI: 200) com χ 11218 pYA4545p53 ou a cepa parental por incubação por 1 hora. D. As células 5637 foram

transfectadas com 0,5 µg de pYA4545p53 ou pYA4545. E. As células 5637 foram transfectadas com 1 µg de pYA4545p53 ou pYA4545. A viabilidade celular foi determinada após 24, 48 e 72 horas de infecção ou transfecção e avaliada por fluorescência de calceína AM (492/517 nm, excitação/emissão). Os resultados foram normalizados para os das células 5637 não tratadas. Observamos um efeito dose-resposta: quanto maior o número de bactérias utilizadas (MOI: 200) ou a quantidade de plasmídeo utilizado (1 µg), maior a quantidade de morte celular. O valor representa a média ± SD dos dados obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicata. A significância estatística foi determinada usando ANOVA, seguida pelo teste post-hoc de Tukey, e $p < 0,05$ foi usado como ponto de corte para determinar a significância. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. F. Imagens representativas obtidas do ensaio Calceína AM para células 5637 tratadas com $\chi 11218$ pYA4545 ou $\chi 11218$ pYA4545p53 por 72 horas, MOI: 200. Os canais exibidos correspondem a fluorescência vermelha (EthD-1), fluorescência verde (calceína) e fluorescência azul (Hoechst). Barra de escala: 200 µm.

As cepas de *S. enterica* Typhimurium propostas na terapia do câncer devem apresentar um equilíbrio ideal entre imunogenicidade e segurança para os pacientes. A cepa WT é altamente imunogênica e causaria septicemia. No entanto, cepas não otimizadas altamente atenuadas perderiam sua capacidade de estimular o sistema imunológico e invadir células tumorais para eliminação do tumor. Foi demonstrado em estudos *in vivo* que *S. enterica* Typhimurium $\chi 11218$ é uma cepa atenuada e segura quando inoculada em camundongos (KONG et al., 2012); deleções de genes-chave, que levam à lise bacteriana retardada, conferem contenção biológica para que as bactérias não persistam *in vivo* ou sobrevivam no caso de serem excretadas.

A $\chi 11218$ é uma cepa geneticamente programada para exibir um fenótipo de atenuação retardada regulado por arabinose. No momento da inoculação, essa bactéria apresenta um fenótipo imunogênico, porém *in vivo*, devido à falta de arabinose, sua capacidade imunoestimuladora é fortemente reduzida, e posteriormente as bactérias são conduzidas à lise (Kong et al., 2012). Isso resolve a preocupação de eliminação de bactérias após o tratamento, aumentando, assim, a segurança da terapia bacteriana. Experimentos *in vivo* mostraram que cepas *S. enterica* Typhimurium atingem seletivamente o tecido tumoral e se acumulam nele, que é um microambiente rico em nutrientes (Zhou et al., 2018; Gao et al., 2020). Essa característica natural de *S. enterica* Typhimurium permite que cepas usadas como vetores para moléculas terapêuticas tenham como alvo preferencial os tumores, entregando-lhes moléculas terapêuticas.

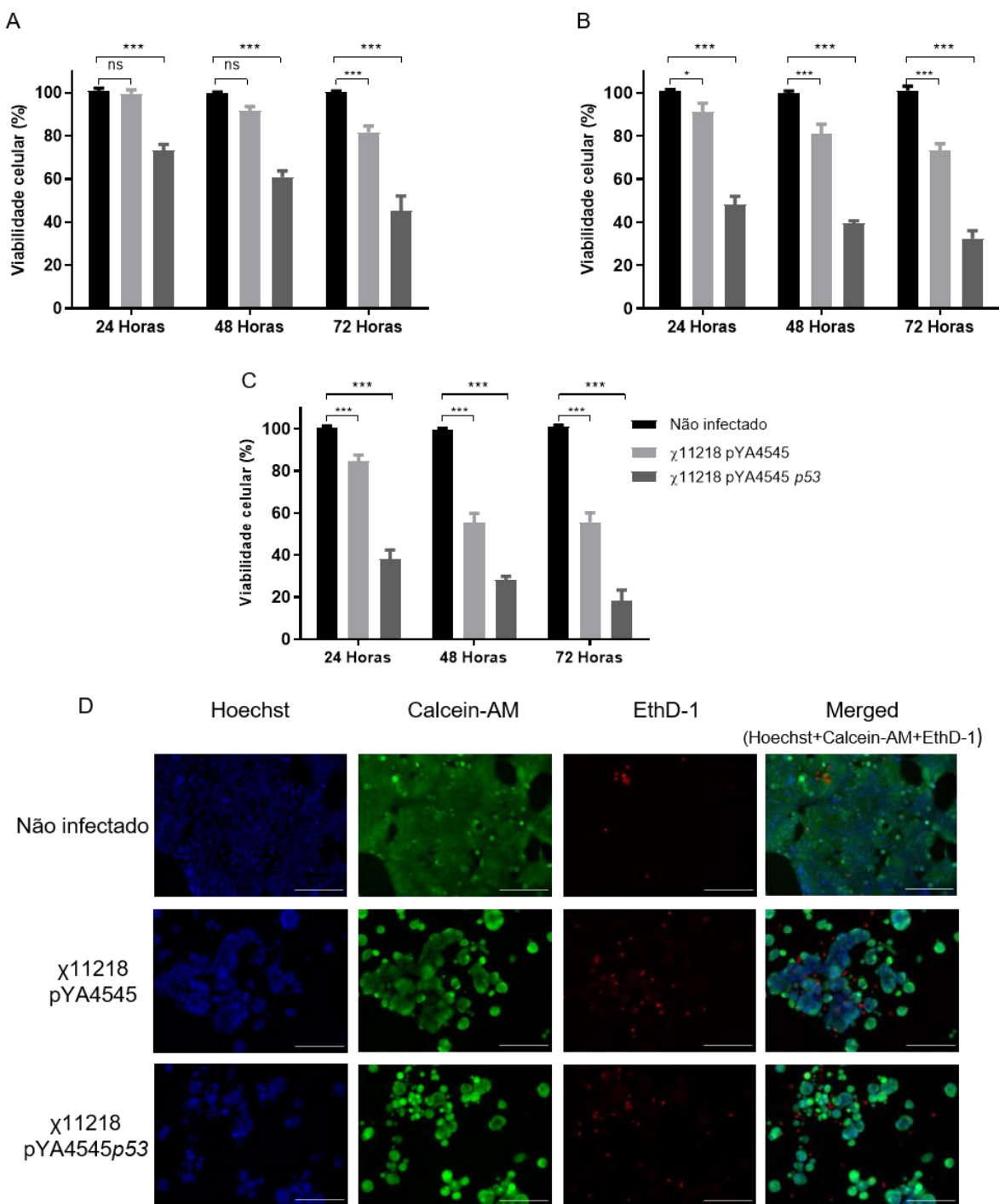


Figura I.4. Viabilidade da linha celular de papiloma de bexiga humana RT4 infectada com bactérias recombinantes (MOI: 50, 100 ou 200) A. As células RT4 foram infectadas (MOI: 50) por incubação com $\chi 11218$ pYA4545p53 ou a cepa parental por 1 h. B. As células RT4 foram infectadas (MOI: 100) com $\chi 11218$ pYA4545p53 ou a cepa parental por incubação por 1 h. C. As células RT4 foram infectadas (MOI: 200) com $\chi 11218$ pYA4545p53 ou a cepa parental por incubação por 1 h. A viabilidade celular foi determinada após 24 h, 48 h e 72 h de infecção e avaliada por fluorescência

de calceína AM (492/517 nm, excitação/emissão). Os resultados foram normalizados aos das células RT4 não infectadas. Observamos um efeito dose-resposta: quanto maior o número de bactérias utilizadas (MOI: 200), maior a quantidade de morte celular. O valor representa a média $\pm$ SD dos dados obtidos de duas experiências independentes realizadas em triplicado. A significância estatística foi determinada usando ANOVA, seguida pelo teste post-hoc de Tukey, e $p < 0,05$ foi usado como ponto de corte para determinar a significância. $*P < 0,05$, $***P < 0,001$. D. Imagens representativas obtidas do ensaio calceína AM para células RT4 tratadas com χ 11218 pYA4545 ou χ 11218 pYA4545p53 por 72 h, MOI: 200. Os canais exibidos correspondem a fluorescência vermelha (EthD-1), fluorescência verde (calceína) e fluorescência azul (Hoechst). Barra de escala: 200 μ m.

Neste estudo, usamos uma cepa de *S. enterica* Typhimurium atenuada recombinante para expressar p53 sob um promotor de CMV eucariótico. Os plasmídeos aqui utilizados não possuíam genes de resistência a antibióticos. Além disso, *S. enterica* Typhimurium atenuada recombinante possui diversas mutações em diversas regiões cromossômicas que garantem sua atenuação e sua segurança, não necessitando de nenhum indutor para funcionar (Kong et al., 2012).

A reatogenicidade é uma preocupação primária ao usar cepas de vetores recombinantes vivos, e diferentes cepas atenuadas de *S. enterica* Typhimurium exibem perfis de virulência indesejáveis em ensaios clínicos humanos, apesar da atenuação. Isso foi observado para as cepas de vacina mutantes *S. enterica* Typhimurium *phoP/phoQ* e *aroC/ssaV* que mostraram persistência indesejável em longo prazo e outros efeitos colaterais (ANGELAKOPOULOS; HOHMANN, 2000; HINDLE et al., 2002). A cepa *S. enterica* Typhimurium χ 11218 é um vetor altamente atenuado, mas imunogênico, tornando-se um transportador de genes heterólogos desejável em humanos (KONG et al., 2012).

Este estudo demonstrou que a cepa χ 11218 de *S. enterica* Typhimurium, que apresenta lise retardada regulada, é uma ferramenta adequada para entregar p53 para terapia anticâncer. Nossos dados apoiam o princípio de que a restauração funcional do p53 é uma estratégia anticancerígena potencial contra as células cancerígenas da bexiga. A cepa χ 11218 é uma cepa nova e altamente atenuada de *S. enterica* Typhimurium com várias melhorias, como o sistema de entrega de genes. Nossos achados enfatizam que *S. enterica* Typhimurium deve ser explorada como um veículo para o tratamento do câncer de bexiga.

Referências

ANGELAKOPOULOS, H.; HOHMANN, E. L. Pilot Study of phoP/phoQ-Deleted *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Expressing *Helicobacter pylori* Urease in Adult Volunteers. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 2135–2141, abr. 2000.

BEUZÓN, C. R. et al. *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. **The EMBO journal**, v. 19, n. 13, p. 3235–3249, 3 jul. 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 7 maio 1976.

CHALASANI, V.; CHIN, J. L.; IZAWA, J. I. Histologic variants of urothelial bladder cancer and nonurothelial histology in bladder cancer. **Canadian Urological Association Journal**, v. 3, n. 6 Suppl 4, p. S193–S198, dez. 2009.

CLARK-CURTISS, J. E.; CURTISS, R. *Salmonella* Vaccines: Conduits for Protective Antigens. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 200, n. 1, p. 39–48, 1 jan. 2018.

ELSINGHORST, E. A. Measurement of invasion by gentamicin resistance. **Methods in Enzymology**, v. 236, p. 405–420, 1994.

GAO, S. et al. Development of Oxytolerant *Salmonella* typhimurium Using Radiation Mutation Technology (RMT) for Cancer Therapy. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3764, 28 fev. 2020.

GAO, X. et al. Construction of a novel DNA vaccine candidate targeting F gene of genotype VII Newcastle disease virus and chicken IL-18 delivered by *Salmonella*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1362–1372, maio 2019.

GRILLOT-COURVALIN, C. et al. Functional gene transfer from intracellular bacteria to mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 862–866, set. 1998.

HINDLE, Z. et al. Characterization of *Salmonella enterica* derivatives harboring defined *aroC* and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system (*ssaV*) mutations by immunization of healthy volunteers. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3457–3467, jul. 2002.

HIRSCH WERLE, C. et al. Antimelanoma effect of *Salmonella* Typhimurium integration host factor mutant in murine model. **Future Oncology (London, England)**, v. 12, n. 20, p. 2367–2378, out. 2016.

JI, K. et al. Synergistic suppression of prostatic cancer cells by coexpression of both murine double minute 2 small interfering RNA and wild-type p53 gene in vitro and in vivo. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 338, n. 1, p. 173–183, jul. 2011.

JIANG, T. et al. Enhanced therapeutic effect of cisplatin on the prostate cancer in tumor-bearing mice by transfecting the attenuated *Salmonella* carrying a plasmid co-expressing p53 gene and mdm2 siRNA. **Cancer Letters**, v. 337, n. 1, p. 133–142, 28 ago. 2013.

JIANG, Y. et al. A Novel Cre Recombinase-Mediated In Vivo Minicircle DNA (CRIM) Vaccine Provides Partial Protection against Newcastle Disease Virus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 14, 15 jul. 2019.

KONG, N. et al. Synthetic mRNA nanoparticle-mediated restoration of p53 tumor suppressor sensitizes p53-deficient cancers to mTOR inhibition. **Science Translational Medicine**, v. 11, n. 523, 18 dez. 2019.

KONG, W. et al. Turning self-destructing *Salmonella* into a universal DNA vaccine delivery platform. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 47, p. 19414–19419, 20 nov. 2012.

KRUISWIJK, F.; LABUSCHAGNE, C. F.; VOUSDEN, K. H. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 7, p. 393–405, jul. 2015.

LOUGHERY, J. et al. Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 12, p. 7666–7680, jul. 2014.

MILANEZ, G. P. et al. HU-Lacking Mutants of *Salmonella enterica* Enteritidis Are Highly Attenuated and Can Induce Protection in Murine Model of Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1780, 2018.

PAGLIARO, L. C. et al. Repeated intravesical instillations of an adenoviral vector in patients with locally advanced bladder cancer: a phase I study of p53 gene therapy. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 21, n. 12, p. 2247–2253, 15 jun. 2003a.

PAGLIARO, L. C. et al. Adenoviral p53 gene transfer in human bladder cancer cell lines: cytotoxicity and synergy with cisplatin. **Urologic Oncology**, v. 21, n. 6, p. 456–462, dez. 2003b.

RAMAN, V. et al. The motility regulator flhDC drives intracellular accumulation and tumor colonization of *Salmonella*. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 7, n. 1, p. 44, 12 fev. 2019.

RINK, M. et al. Predictors of cancer-specific mortality after disease recurrence following radical cystectomy. **BJU international**, v. 111, n. 3 Pt B, p. E30–36, mar. 2013.

RUIFA, H. et al. Additional gene therapy with rAAV-wt-p53 enhanced the efficacy of cisplatin in human bladder cancer cells. **Urologia Internationalis**, v. 77, n. 4, p. 355–361, 2006.

SALINAS-SÁNCHEZ, A. S. et al. Implications of p53 gene mutations on patient survival in transitional cell carcinoma of the bladder: a long-term study. **Urologic Oncology**, v. 26, n. 6, p. 620–626, dez. 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. third ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, jul. 2012.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

VAN LEEUWEN, F. N. Therapeutic targeting of mutated p53 in acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 105, n. 1, p. 10–11, jan. 2020.

ZHOU, S. et al. Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 18, n. 12, p. 727–743, dez. 2018.

CAPITULO II

Atividade antitumoral de mutantes atenuados de *Salmonella enterica* Typhimurium

Capítulo II: Atividade antitumoral de mutantes atenuados de *Salmonella enterica* Typhimurium

Resumo

O aumento significativo dos casos de câncer e a carência de um tratamento eficiente criam a urgente necessidade de novas opções de tratamento. O tratamento imunoterápico mediado por *Salmonella enterica* Typhimurium representa uma solução promissora para o tratamento do câncer. Essa bactéria tem habilidades intrínsecas, como a ativação do sistema imunológico. No entanto, as cepas candidatas para a terapia do câncer devem apresentar equilíbrio entre atenuação e atividade antitumoral. Aqui, avaliamos a atenuação e a eficácia antitumoral em modelo de melanoma murino de dois novos mutantes de *S. enterica* Typhimurium: $\Delta tolRA$ e $\Delta ihfABpmi$. O mutante $\Delta tolRA$ mostrou ser altamente atenuado no modelo de *Galleria mellonella* e manteve sua capacidade de invadir e sobreviver em células tumorais, porém o efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo* foi fraco. Por outro lado, o mutante $\Delta ihfABpmi$ mostrou menor atenuação que o mutante $\Delta tolRA$, mas causou a regressão completa do melanoma em todos os camundongos aproximadamente seis dias depois da primeira inoculação de bactérias. A resposta terapêutica bem-sucedida induzida por $\Delta ihfABpmi$ foi acompanhada pela polarização de macrófagos ao fenótipo antitumoral, M1. A alteração de M2 a M1 também foi acompanhada pelo aumento significativo de mRNA de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6), iNOS e Bax. Nossos resultados sugerem que $\Delta ihfABpmi$ tem equilíbrio entre atenuação e eficácia antitumoral e que exerce sua atividade antitumoral induzindo a infiltração de macrófagos e a reprogramação do microambiente tumoral imunossuprimido a imunoativo. Portanto, nosso estudo proporciona evidências de que as cepas atenuadas de *S. enterica* Typhimurium desenvolvidas neste estudo podem ser usadas como imunoterapêuticos contra o câncer.

Palavras-chave: *Salmonella enterica* Typhimurium, melanoma, terapia, câncer, imunoterapia, macrófagos.

II. 1 Introdução

O câncer é um fardo social e econômico de nível global, uma doença maligna que carece de tratamento eficiente (SUNG et al., 2021). Apesar dos grandes avanços no tratamento do câncer (cirurgia, quimioterapia, radioterapia e imunoterapia com anticorpos), as taxas de mortalidade e recidiva ainda são altas, devido à alta complexidade da doença e às múltiplas limitações dos tratamentos atualmente disponíveis (EGGERMONT et al., 2020; BACON et al., 2021; SUNG et al., 2021). A ressecção cirúrgica do tumor com tecido saudável circundante representa a principal e mais favorável opção para o tratamento de pacientes com câncer em estágio inicial (quando o tumor é pequeno e localizado). Entretanto, devido à natureza silenciosa da oncogênese, a maioria dos pacientes é frequentemente diagnosticada em estágios avançados da doença, em que a ressecção cirúrgica não é uma opção de tratamento (MANSOURI et al., 2021). Por outro lado, a quimioterapia e a radioterapia, utilizadas como tratamento padrão para o câncer, apresentam baixa especificidade e alta toxicidade, resultando em graves efeitos colaterais (BOARDMAN et al., 2018). Os tratamentos baseados em anticorpos monoclonais também apresentaram resposta imune e penetração limitadas. Além disso, só uma minoria de pacientes respondem ao tratamento (ZAHAVI; WEINER, 2020). Portanto, há uma necessidade urgente de uma nova abordagem farmacêutica para desenvolver um tratamento eficiente para pacientes com câncer. Nesse contexto, o tratamento imunoterápico mediado por *Salmonella enterica* Typhimurium representa uma solução viável para o tratamento do câncer.

Cepas de *S. enterica* Typhimurium estão sendo intensamente exploradas na imunoterapia do câncer devido a várias características inatas. *S. enterica* Typhimurium possui direcionamento intrínseco ao tumor e pode penetrar uniformemente em áreas hipóxicas (MATEOS-CHÁVEZ et al., 2019; MI et al., 2019). Essa bactéria também tem atividade antitumoral intrínseca e pode ativar o sistema imunológico (FELGNER et al., 2020; PÉREZ JORGE et al., 2022). A atividade antitumoral de *S. enterica* Typhimurium é atribuída principalmente à ativação do sistema imune (AVOGADRI et al., 2005; CHANG; LEE, 2014; KAIMALA et al., 2014; CHEN et al., 2021;). A infecção no microambiente tumoral por *S. enterica* Typhimurium alerta o sistema imunológico, levando à ativação de mecanismos oncolíticos como o aumento da expressão de interferon γ , óxido nítrico sintase induzível (iNOS), interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necroses tumoral α (TNF- α) (KAIMALA et al., 2014); assim como a diminuição do fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e citocinas anti-inflamatórias. Da

mesma forma, *S. enterica* Typhimurium pode promover o recrutamento de células imunitárias como macrófagos. Em conjunto, esses mecanismos modificam o microambiente antitumoral imunossuprimido em um ambiente imunoativo que favorece a destruição das células tumorais.

No microambiente tumoral há uma população abundante de macrófagos associados ao tumor (TAMs). Os TAMs ativados alternativamente ou macrófagos do tipo M2 participam na promoção da imunossupressão e são caracterizados pela diminuição na expressão de iNOS e TNF- α , além de influenciarem positivamente no crescimento tumoral, nas metástases e na angiogênese e remodelação da matriz extracelular, enquanto os TAMs classicamente ativos ou macrófagos do tipo M1 têm atividade fagocítica, podem promover uma resposta Th1 e estão associados com a supressão do crescimento de tumores (KAIMALA et al., 2014; PERROTTA et al., 2018; DI MITRI et al., 2019). O LPS pode induzir a mudança fenotípica dos TAMs (YANG et al., 2018; DI MITRI et al., 2019). Previamente, foi demonstrado que mutantes de *S. enterica* Typhimurium podem reprogramar a polarização de fenótipo M2 a M1 (KAIMALA et al., 2014; YANG et al., 2018; CHEN et al., 2021). A reprogramação de TAMs por *S. enterica* Typhimurium sugere o uso potencial dessa bactéria para combater a progressão do tumor.

Diferentes cepas de *S. enterica* Typhimurium têm mostrado resultados promissores *in vitro* e *in vivo* (FELGNER et al., 2016; HIRSCH WERLE et al., 2016, p. 53; LI et al., 2017; MIYAKE et al., 2019; PÉREZ JORGE et al., 2022). Porém, as cepas avaliadas até agora em ensaios clínicos não demonstraram eficácia antitumoral (TOSO et al., 2002; HEIMANN; ROSENBERG, 2003; GNIADK et al., 2020). Por isso, é essencial explorar novas cepas de *S. enterica* Typhimurium com potencial antitumoral. Um bom candidato para a terapia do câncer deve apresentar equilíbrio entre atenuação e atividade antitumoral. Cepas de *S. enterica* Typhimurium de tipo selvagem não são adequadas na terapia contra o câncer porque podem causar uma sepse grave no hospedeiro, e cepas altamente atenuadas também não são bons candidatos porque não serão capazes de estimular o sistema imunológico para eliminar o tumor (FRAHM et al., 2015).

Considerando a necessidade de desenvolver cepas seguras com eficácia antitumoral, neste trabalho construímos dois mutantes de *S. enterica* Typhimurium e avaliamos sua eficácia terapêutica, assim como o mecanismo pelo qual exercem sua atividade antitumoral. O mutante $\Delta tolRA$ é uma cepa carente de duas proteínas de envelope celular, e o mutante $\Delta ihfABpmi$ é deficiente da 6-fosfomanose isomerase e do fator de integração ao hospedeiro (IHF), uma proteína

associada ao nucleóide. Os mutantes $\Delta tolRA$ e $\Delta ihfABpmi$ nunca tinham sido avaliados quanto a sua atividade antitumoral. Os mutantes aqui avaliados mostraram atenuação da virulência e potencial antitumoral no modelo de melanoma murino. Além disso, a eficácia antitumoral do mutante $\Delta ihfABpmi$ está associada à reprogramação de macrófagos do fenótipo pro-tumoral para o fenótipo antitumoral.

II. 2 Materiais e Métodos

II.2.1. Cepas bacterianas, plasmídeos, primers e meios de cultivo

As cepas bacterianas, plasmídeos e primers usados neste estudo estão descritos na Tabela II.1. As bactérias foram cultivadas aerobicamente a 37 °C em LB ágar, caldo LB, MacConkey e *Salmonella-Shigella* (SS). Ampicilina (100 µg/mL), Canamicina (50 µg/mL), cloranfenicol (25 µg/mL) ou manose (0,5%) foram usados quando necessário. As linhagens bacterianas usadas neste estudo foram estocadas a -80 °C em 20% de glicerol em meio LB.

II.2.2. Condições de crescimento

As bactérias foram semeadas em LB ágar e incubadas a 37 °C por 16-18 horas. As colônias crescidas em LB ágar foram inoculadas em caldo LB e cultivadas por 16-18 horas a 37 °C sob agitação (150 rpm). No dia seguinte, a cultura foi diluída 1:100 em caldo LB fresco e crescidas até a fase exponencial (~ 10⁸ UFC/ml), nas condições descritas acima. A cultura foi então centrifugada a 4000 × g por 5 minutos, e o sedimento foi suspenso em PBS. Posteriormente as bactérias foram diluídas até a concentração adequada para os experimentos *in vitro* e *in vivo*.

II.2.3. Construção de mutantes

O novo mutante triplo $\Delta ihfABpmi$ foi construído usando o sistema recombinação λ Red seguido por tradução com fago p22. Construímos inicialmente o mutante $\Delta pmi:Kan$ através da troca alélica do gene *pmi* pelo cassete de recombinação de canamicina. A deleção do gene *pmi* foi verificada por PCR utilizando os primers de detecção descritos na Tabela II.1. Posteriormente, $\Delta pmi: Kan$ foi usado como cepa doadora para a transdução com fago p22 e o mutante $\Delta ihfAB$ foi usado como cepa receptora, resultando no mutante $\Delta ihfABpmi$.

O novo mutante duplo $\Delta tolRA$ foi construído usando o sistema λ Red. Excluímos os genes *tolR* e *tolA* do cromossomo ATCC 14028 em uma única etapa, com a troca alélica dos genes *tolR* e *tolA* pelo de recombinação contendo o gene de resistência à canamicina. A deleção dos genes foi confirmada por PCR utilizando os primers tolRADT-F e tolRADT-R descritos na Tabela II.1.

Tabela II.1. Cepas, plasmídeos e primers usados para a construção dos mutantes

Cepas, plasmídeos e primers	Descrição	Fonte
Cepas		
14028	ATCC 14028 Linhagem selvagem	(JARVIK et al., 2010)
$\Delta ihfAB$	$\Delta ihfA \Delta ihfB$: <i>cat</i> mutante de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	Coleção do Lab
Δpmi	Δpmi : <i>Kan</i> mutante de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	Este estudo
$\Delta ihfABpmi$	$\Delta ihfA \Delta ihfB$: <i>cat</i> Δpmi : <i>Kan</i> mutante de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	Este estudo
$\Delta tolRA$	$\Delta tolR \Delta tolA$: <i>Kan</i> mutante de <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	Este estudo
Plasmídeos		
pKD4	Ampr, Kanr, acessório de sistema λ Red para amplificação <i>Kan</i>	(DATSENKO; WANNER, 2000)
pKD46	Ampr, expressa γ , β e <i>exo</i> , acessório do sistema λ Red	(DATSENKO; WANNER, 2000)
Primers		
<i>pmiP1</i>	5=-TTA CGT CTG TTA TAA GCT TAG CAA GAG TTG TTA AAA AAT TCA GTA CGT TGA TGG GAA T-3=	Este estudo
<i>pmiP2</i>	5=-TCT TGG TTT AAT ACC TCC CAT TGA TCT CCA CAT TGA AAC AGG GCT TGA TAG TGT AGG-3=	Este estudo
<i>pmiDT-F</i>	5=-CCC GAC TCA AAG CGA GTA AC-3=	Este estudo
<i>pmiDT-R</i>	5=-ATT AAA CCG CCT GGA GGA GT-3=	Este estudo
<i>tolRAP1</i>	5=-TGC ACC GCC AGG CGT TTA CCG TAA GCG AAA GCA ACA AGG GGT AAG CCA TGA TTC CGG GGA TCC GTC GAC C-3=	(DALEKE-SCHERMERHORN et al., 2014b)
<i>tolRAP2</i>	5=-ACT GCT CTA ACT TCC ATA AAG AAA AGT ATC TAC AGT TTA AAG TCT AGT TTG GCT GTA GGC TGG AGC TGC TTC G-3=	(DALEKE-SCHERMERHORN et al., 2014b)
<i>tolRADT-F</i>	5=-CGTAAGCGAAAGCAACAAGG-3=	(DALEKE-SCHERMERHORN et al., 2014b)
<i>tolRADT-R</i>	5=-CCACCAGGACCAGTA ACA AC-3=	(DALEKE-SCHERMERHORN et al., 2014b)

II.2.4. Linhagem de células cancerígenas

As linhas celulares B16F10 (melanoma de camundongo) e 5637 (câncer de bexiga humana) foram usadas neste estudo. As células foram cultivadas a 37 °C em ar umidificado com 5% de CO₂, em meio Dulbecco's Modified Eagle (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA) (DMEM) (B16F10) ou RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA) (5637) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml).

II.2.5. Curva de crescimento

O crescimento *in vitro* dos mutantes foi avaliado em caldo LB como descrito anteriormente (MILANEZ et al., 2018). Em breve, uma cultura de 16-18 horas foi diluída em caldo LB fresco

(1: 1000) e incubada a 37 °C e 150 rpm. O crescimento foi monitorado por 12 horas, por meio de leituras a cada hora da densidade óptica e determinação de UFC por plaqueamento em LB-ágar. Três experimentos independentes foram realizados.

II.2.6. Virulência no modelo *Galleria mellonella*

A atenuação da virulência dos mutantes construídos de *S. enterica* Typhimurium foi avaliada *in vivo* no modelo de infecção de *Galleria mellonella*. A quantidade de 10 µl contendo 1×10^6 UFC/ml de mutantes ou bactérias do tipo selvagem foram inoculados na última pata falsa (pró-leg) de larvas entre 200-250 mg. Foram utilizadas 10 larvas por grupo. A sobrevivência das larvas foi observada por 96 horas após a inoculação. O experimento foi realizado três vezes.

II.2.7. Extração de LPS e análise por SDS-PAGE (do inglês: SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

A integridade do LPS, associada com a imunogenicidade bacteriana, também foi analisada por análise do perfil de LPS em gel de poliacrilamida. O LPS dos mutantes e da cepa de tipo selvagem foi extraído a partir do crescimento em placas com LB-ágar conforme previamente descrito (HITCHCOCK; BROWN, 1983). Brevemente, colônias foram homogeneizadas em água deionizada até atingir uma DO_{600} entre 0,4-0,5. A suspensão bacteriana foi logo centrifugada a 10000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi homogeneizado em buffer Laemmli (Tris-HCl, pH 6,8 0,625 M, SDS 2%, glicerol 25% e azul de bromofenol 0,01%) e incubado a 100 °C por 10 minutos. Depois foram adicionados 10 µl de solução de Proteinase K (2,5 mg/ml) e a suspensão foi homogeneizada e incubada a 60 °C por 1 hora. As amostras de LPS foram analisados por SDS-PAGE. A eletroforese de poliacrilamida foi realizada em gel de empilhamento a 5% e a 12% em gel de separação, submetido a uma voltagem constante de 100V por 2 horas. O LPS separado foi corado com coloração de prata (TSAI; FRASCH, 1982). Para isso, inicialmente o gel foi incubado em solução fixadora (etanol 40% e ácido acético 5%) por 16 horas, seguido de incubação em solução oxidante por 10 minutos. Após três lavagens em água deionizada, o gel foi corado por 10 minutos com solução de prata (NaOH 0,02M, hidróxido de amônio 1,5% e nitrato de prata 0,7%); em seguida, o gel foi novamente lavado em água deionizada três vezes e as bandas foram reveladas em solução de formaldeído 0,02% e ácido acético 0,005%). Depois da revelação das bandas, o gel foi lavado em água deionizada e fotografado. *Pseudomonas aeruginosa* (gentilmente doada pela Dra. Regina Lúcia Baldini – Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo) contendo deleção do gene *wzz* foi usada como

controle da ausência de LPS (o gene *wzz* é essencial para a biossíntese do LPS. Em *Pseudomonas aeruginosa*, cepas com deleção desse gene são incapazes de produzir LPS.

II.2.8. Ensaio de Invasão e Sobrevivência

As capacidades de invasão e de sobrevivência dos mutantes foram medidas pela resistência à gentamicina, conforme descrito anteriormente com algumas modificações (ELSINGHORST, 1994). Resumidamente, 1×10^5 células por poço foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas a 37 °C, 5% CO₂ por 20 horas; duas placas de 24 poços foram preparadas, uma para ensaio de invasão e outra para o ensaio de sobrevivência. No dia seguinte, 2×10^6 UFC de bactérias foram adicionadas sobre as células, para atingir a multiplicidade de infecção (MOI) de 10:1 e incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ por 1 hora. Após três lavagens com PBS, meio (RMPI ou DMEM) contendo 100 µg/mL de gentamicina foi adicionado a cada poço e incubado por 1 h para matar as bactérias extracelulares. Em seguida, cada poço foi lavado novamente com PBS. Para o ensaio de invasão, as células de uma das placas foram imediatamente lisadas com solução de Triton X-100 a 0,5% em PBS, seguido de determinação de UFC por plaqueamento em meio LB-ágar. Para o ensaio de sobrevivência, a outra placa foi incubada com meio (RMPI ou DMEM) contendo 20 µg/ml de gentamicina e incubada por 4 horas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e lisadas para a determinação de UFC. Realizamos três experimentos independentes, com três repetições de cada linhagem.

II.2.9. Ensaios de toxicidade *in vitro*

O efeito citotóxico dos mutantes foi avaliado pelo ensaio MTT com algumas modificações. Um total de 1×10^4 de células foram semeadas em placas de 96 poços. As células foram incubadas por 20 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, tratadas com 2×10^6 UFC de bactérias para atingir a MOI de 100:1. A placa foi incubada a 37 °C sob 5% CO₂ por 1 hora. As células foram lavadas novamente com PBS e incubadas com meio (RMPI ou DMEM) contendo 100 µg/ml de gentamicina por 2 horas a 37 °C sob 5% de CO₂. Em seguida, as células foram lavadas novamente e incubadas com meio (RMPI ou DMEM) contendo 20 µg/ml de gentamicina por 24 horas em condições de cultura adequadas. Após o tempo de incubação, o meio foi removido, e as células foram reincubadas por 4 horas com MTT (5 mg/ml) diluído em meio RPMI ou DMEM. O MTT diluído em meio foi eliminado e os cristais foram dissolvidos com dimetilsulfóxido (DMSO-Sigma, Saint Louis, MO, EUA). A absorbância foi lida a 570 nm. A viabilidade das células tratadas com os mutantes foi comparada com a viabilidade das células não

tratadas (controle). Realizamos três experimentos independentes, com três repetições de cada linhagem.

II.2.10. Animais

Fêmeas C57BL/6JUnib de seis semanas de idade foram usadas neste estudo. Todos os experimentos com camundongos foram aprovados pelo comitê de cuidados com animais da Universidade Estadual de Campinas sob os protocolos de número 5769-1/2021 e 5895-1/2021. Todos os animais foram obtidos no Centro Multidisciplinar de Pesquisa Biológica (CEMIB – UNICAMP). Os animais foram mantidos em condições específicas livres de patógenos. Os camundongos foram aclimatados por duas semanas antes do início dos experimentos. Dois dias antes de iniciados os experimentos, os camundongos foram depilados no flanco direito para facilitar as inoculações subcutâneas.

II.2.11. Ensaios de segurança dos tratamentos

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de cinco e injetados por via subcutânea com 60 µL no flanco direito. Grupo I: os camundongos receberam 10^5 UFC de *ΔihfABpmi* semanalmente por duas semanas, duas inoculações no total. Grupo II: os animais receberam 10^6 UFC de *ΔtolRA* semanalmente por duas semanas. Grupo III: os animais receberam 10^7 UFC de *ΔtolRA* semanalmente por duas semanas. Grupo IV: os camundongos receberam solução salina tamponada com fosfato (PBS) semanalmente por duas semanas. Durante o experimento, os animais foram pesados três vezes por semana, e foi analisado o aparecimento de quaisquer sinais de doença (secreção ocular, piloereção, letargia). Eles foram eutanasiados duas semanas após a última inoculação.

Para quantificar a distribuição e a persistência bacterianas no final do experimento, parte do fígado, do sangue e do baço foram coletados assepticamente e homogeneizados em PBS com ajuda de um homogeneizador de tecidos. Os tecidos homogeneizados foram plaqueados em LB-ágar, MacConkey e SS para a determinação de UFC. Este experimento foi realizado duas vezes.

II.2.12. Eficácia antitumoral *in vivo*

A eficácia antitumoral dos mutantes foi avaliada em modelo de melanoma murino. Células B16F10 (3×10^6) foram inoculadas por via subcutânea no flanco direito de camundongos C57BL/6JUnib. Quando o tumor atingiu aproximadamente 100 mm³, os animais portadores de tumor foram distribuídos aleatoriamente em três grupos de sete camundongos (denominados PBS, *ΔihfABpmi* e *ΔtolRA*). Os camundongos foram inoculados por via intratumoral uma vez por

semana, por duas semanas, com 60 µl de mutantes (10^5 UFC de *ΔihfABpmi* ou 10^6 UFC de *ΔtolRA*) ou PBS. O tamanho do tumor foi medido a cada 2-3 dias e o volume do tumor calculado como descrito anteriormente (HIRSCH WERLE et al., 2016). Camundongos portadores de tumor que atingiram 3000 mm³ ou que mostraram sinais de dor foram submetidos a eutanásia para evitar o sofrimento. O peso corporal dos camundongos também foi medido a cada 2-3 dias, e os camundongos foram observados ao longo do período de tratamento quanto ao aparecimento de quaisquer sinais de doença. O experimento foi repetido duas vezes.

II.2.13. Mecanismos envolvidos na resposta antitumoral

Para compreender os mecanismos envolvidos na resposta antitumoral mediada pelo mutante *ΔihfABpmi*, camundongos portadores de tumores de aproximadamente 100 mm³ foram inoculados por via intratumoral com 10^5 UFC de *ΔihfABpmi* ou PBS. Quatro dias depois, os camundongos foram eutanasiados. O sangue foi coletado para análise de citocinas, e a massa tumoral foi dividida em duas partes, uma parte para análise de macrófagos por citometria de fluxo e outra parte para análise de expressão de genes envolvidos na resposta antitumoral.

II.2.13.1. Análise de macrófagos por citometria de fluxo

A partir do tecido tumoral foi preparada a suspensão de células isoladas. O tecido tumoral foi cortado em pequenos fragmentos e macerado, seguido de passagem por um filtro de células de 70 µm. As amostras foram incubadas com anticorpos marcados com fluorocromos (CD80-Pe, CD206-APC, CD11b-Percp, F4/80-Fitc (Elabscience. Houston, USA)) por 20 minutos a 4 °C e 50000 eventos foram analisados usando o citometro de fluxo NovoCyte. Os dados foram analisados com o software NovoExpress 1.5.0.

II.2.13.2. RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) para a detecção da expressão gênica

A expressão de mRNA foi analisada por qRT-PCR. A extração total de RNA de tecido tumoral foi realizada com kit *Direct-zol RNA MiniPrep Plus* (Zymo Research. Irvine, CA, USA) e *Trizol reagente* (Invitrogen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do RNA foi confirmada por gel de agarose seguida de coloração com brometo de etídio. A pureza e a concentração do ARN foram verificadas em NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, USA). O RNA foi tratado com *DNase I Amplification grade* (Sigma-Aldrich. Louis, MO, USA) para eliminar qualquer contaminação com ADN genômico. Além disso, como controle de contaminação, foi realizado PCR de todas as amostras para verificar a ausência de ADN gnômico. A transcrição reversa foi realizada para sintetizar cADN usando o kit *High Capacity cDNA Reverse*

Transcription (Applied Biosystems. USA). Em seguida, a reação de PCR em tempo real foi realizada usando o kit *2x qPCRBio SyGreen Mix Separate-Rox* (PCRBIO SYSTEMS. Wayne, Pennsylvania, USA), de acordo com as instruções do fabricante, em microplaca *MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate* (Thermo Scientific, USA), usando o equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, USA). A Curva de dissociação foi feita para verificar a especificidade e a qualidade dos primers usados. A expressão dos mRNA foi normalizada para a expressão de β -actina e GAPDH, os quais foram usados como controle endógeno. Os níveis de expressão relativa de mRNA foram calculados pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. As sequências dos primers utilizados são mostrados na tabela II.2.

Tabela II.2. Primers utilizados para qRT-PCR.

Gene alvo	Tamanho do amplicon	Sequência de primers (5' – 3')
β -actina	154 pb	F:GGCTGTATTCCCCTCCATCG R:CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
GAPDH	133 pb	F: GCGAGACCCCACTAACATCA R: GGCGGAGATGATGACCCTTT
TNF- α	139 pb	F:GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT R:GCCATAGAACTGATGAGAGGGAG
IL-6	129 pb	F: ACGGCCTTCCCTACTTCACA R:CATTTCACGATTTCCTCAGA
Ki-67	104 pb	F: CCTTTGCTGTCCCCGAAGA R: GGCTTCTCATCTGTTGCTTCCT
VEGF	105 pb	F: GCACATAGAGAGAATGAGCTTCC R:CTCCGCTCTGAACAAGGCT
Bax	187 pb	F:AGGCCTCCTCTCCTACTTCG R:AAATGCCTTTCCCTTCCCC
iNOS	127 pb	F:GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA R:GTGGACGGGTCGATGTCAC

II.2.14 Análises estatísticas

Os dados foram analisados com o programa *GraphPad Prism version 8*. (GraphPad, San Diego, CA, USA). Em experimentos com três ou mais grupos experimentais, foi utilizado o ANOVA de uma via seguida do teste de Dunnett. O teste t de Student foi utilizado para analisar os dados de experimentos de dois grupos experimentais. Os dados foram representados como a média $\pm$ Desvio Padrão da média (SEM), e p % 0,05 foi considerado estatisticamente significativo

II.3. Resultados

II.3.1. Crescimento *in vitro* de mutantes e atenuação da virulência no modelo

Galleria mellonella

Mutantes ($\Delta ihfABpmi$ e $\Delta tolRA$) foram comparados com a cepa parental 14028 WT em termos de crescimento *in vitro* em caldo LB (37°C, 150 rpm). As leituras de OD₆₀₀ foram semelhantes entre mutantes e cepa parental (Figura II.1.A). No entanto, a análise das contagens do número de UFC mostrou que a taxa de crescimento da cepa $\Delta ihfABpmi$ é menor que a taxa de crescimento da cepa parental 14028 WT na fase estacionária (Figura II.1B). Observamos um número menor de UFCs na fase estacionária de $\Delta ihfABpmi$ quando comparado a 14028 WT. Em contraste, o mutante $\Delta tolRA$ mostrou um padrão de crescimento semelhante ao da cepa parental 14028 WT (Figura II.1.B).

Para investigar se os genes deletados poderiam afetar a virulência de 14028 WT, larvas de *G. mellonella* foram inoculadas com 1×10^6 UFC de $\Delta ihfABpmi$, $\Delta tolRA$ e cepa 14028 WT (Figura 1C). Observamos menor mortalidade das larvas inoculadas com os mutantes do que com a cepa parental, sendo que 96 horas após a inoculação, 90% das larvas inoculadas com $\Delta tolRA$ e 50% das larvas inoculadas com $\Delta ihfABpmi$ sobreviveram, enquanto todas as larvas inoculadas com 14028 WT morreram 24 horas após a inoculação. Esses resultados sugerem que os mutantes $\Delta ihfABpmi$ e $\Delta tolRA$ são atenuados.

A eletroporação, usada para a construção de mutantes, pode resultar na seleção de colônias mutantes com LPS incompleto, porém o LPS é importante para a imunogenicidade bacteriana. Por isso, a integridade do LPS dos mutantes foi confirmada após corrida de preparações de LPS em gel de poliacrilamida seguido de oxidação com ácido periódico e coloração com prata. O perfil de LPS dos mutantes e da cepa de tipo selvagem foi muito semelhante, sugerindo que os mutantes construídos permaneceram com a camada LPS completa (Figura II.1.D).

II.3.2. Capacidades de invasão e sobrevivência de mutantes em células cancerígenas

Para avaliar se a deleção dos genes afeta as capacidades de invasão e sobrevivência em células tumorais, infectamos duas linhagens de células cancerígenas com as linhagens bacterianas mutantes e com 14028 WT por 2 e 6 horas; o número de UFC intracelular foi determinado após a lise de células tumorais. Em células de melanoma murino B16F10, $\Delta tolRA$ apresentou um perfil de invasão e sobrevivência muito semelhante ao perfil da cepa parental (sem diferenças estatísticas). No entanto, o mutante $\Delta ihfABpmi$ apresentou uma redução estatisticamente

significativa na capacidade de invasão e sobrevivência. Resultados semelhantes foram observados com células de carcinoma humano 5637 (Figura II.2.A-B).

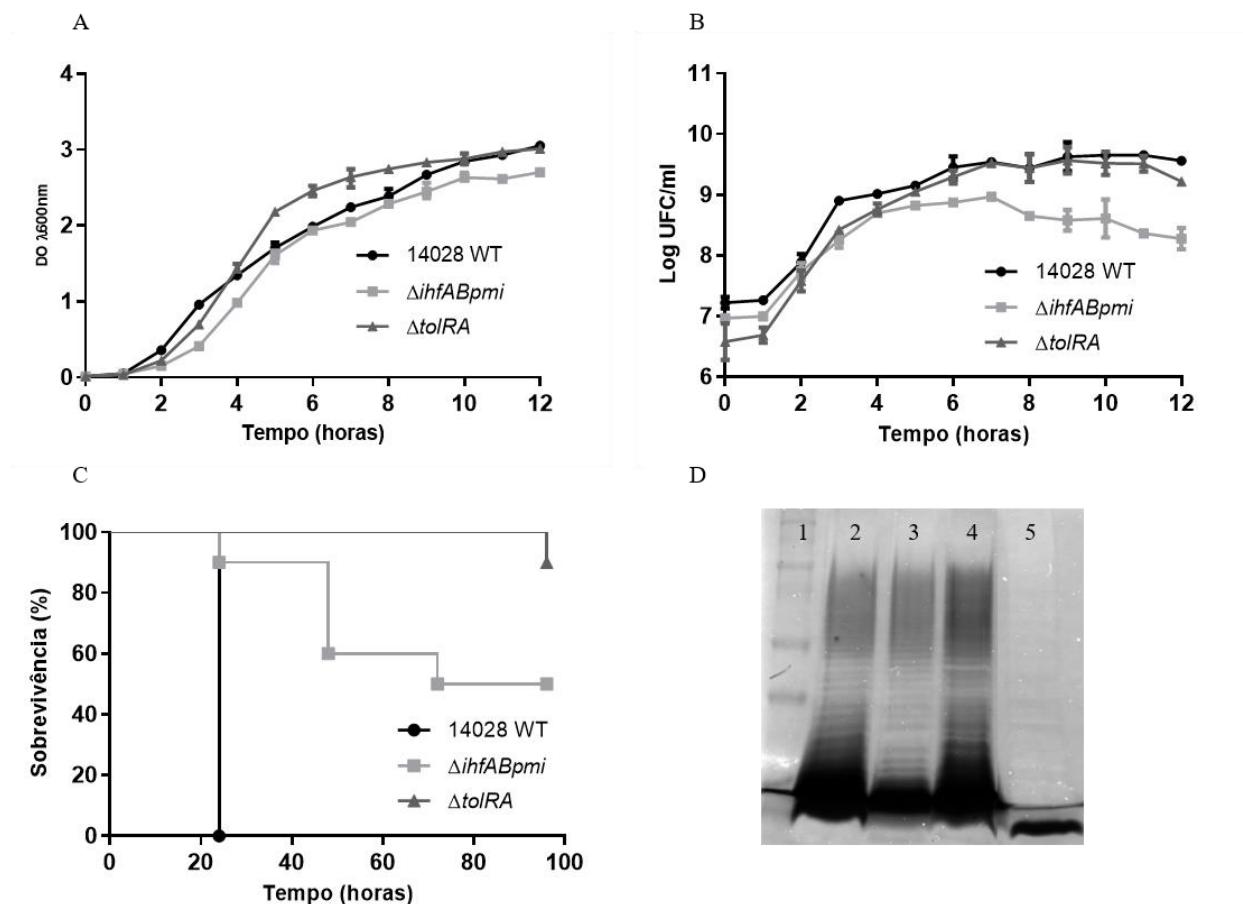


Figura II.1. Crescimento bacteriano e virulência dos mutantes. O crescimento de mutantes e cepa selvagem foi monitorado durante 12 horas, medindo a contagem de UFC (A) e OD (λ 600 nm) (B) a cada hora. As curvas de crescimento foram realizadas três vezes. O gráfico mostra os resultados de um experimento independente. (C) virulência de mutantes e cepa selvagem no modelo de *Galleria mellonella*. As larvas foram inoculadas com 10^4 UFC na última pata falsa (*proleg*) e a sobrevivência foi observada por 96 horas. Os gráficos mostram os valores representativos de três experimentos independentes. (D) perfil eletroforético de LPS. Gel de poliacrilamida corado com solução de prata para a confirmação da integridade do LPS bacteriano. 1. Padrão de peso molecular Dual color (Bio-rad); 2. *S. enterica* Typhimurium 14028; 3. *S. enterica* Typhimurium 14028 $\Delta ihfABpmi$; 3. *S. enterica* Typhimurium 14028 $\Delta tolRA$. 4. *Pseudomonas aeruginosa* (Δwzz).

II.3.4. Citotoxicidade de mutantes de *S. enterica* Typhimurium em células tumorais

O ensaio colorimétrico com MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] permitiu a determinação da citotoxicidade de cepas mutantes em células de melanoma B16F10 e carcinoma de bexiga 5637 (Fig. 2.C-D). Células cancerígenas sem adição de bactérias foram usadas como controle negativo (100% de viabilidade), enquanto células tratadas com 14028 WT foram utilizadas como controle positivo. Os resultados mostraram que os mutantes diminuem significativamente a viabilidade das duas linhagens de células cancerígenas avaliadas; *ΔihfABpmi* apresentou maior toxicidade que *ΔtolRA* nas duas linhagens de células cancerígenas avaliadas. Observamos também que as células de melanoma B16F10 são mais resistentes ao efeito citotóxico, tanto dos mutantes quanto da cepa parental, provavelmente devido ao seu fenótipo agressivo e metastático.

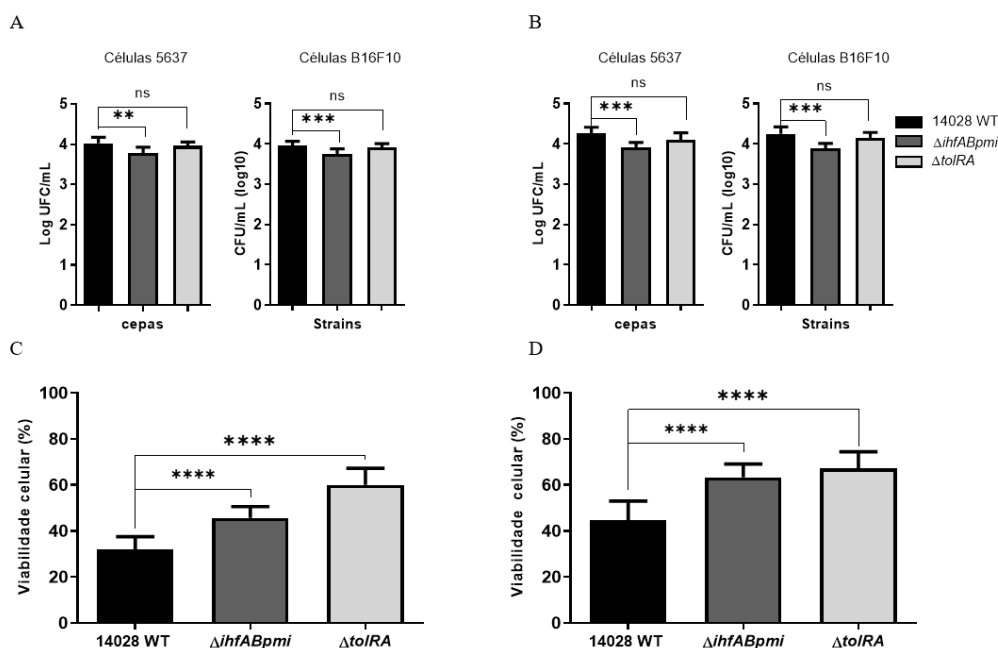


Figura II.2. Capacidade dos mutantes para invadir, sobreviver e toxicidade em células cancerígenas. As células cancerígenas foram infectadas *in vitro* com cepas mutantes por 2 e 6 horas em uma MOI de 10:1, em seguida, a capacidade das cepas mutantes de invasão (A) e a sobrevivência (B) em células cancerígenas foram determinadas pela contagem de UFC intracelular. A cepa 14028 WT foi usada como controle positivo. Porcentagem de células cancerígenas viáveis 5637 (C) e B16F10 (D) após 24 h de infecções por cepas bacterianas. Resultados representados como média $\pm$ SD de valores representativos de três experimentos independentes. A significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$.

II.3.5. Análise da segurança do tratamento com mutantes atenuados de *S. enterica* Typhimurium

Para avaliar a tolerância do tratamento com mutantes atenuados de *S. enterica* Typhimurium, inoculamos camundongos com os mutantes por via subcutânea, uma vez por semana, por duas semanas, totalizando duas doses (o desenho experimental é mostrado na Figura II.3.A). A dose utilizada do mutante $\Delta ihfABpmi$ (10^5 UFC) foi escolhida baseada em estudos prévios feitos em nosso laboratório em modelo murino e estudos feitos neste trabalho no modelo de *G. mellonella*. Previamente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o duplo mutante $\Delta ihfAB$ é uma cepa atenuada, e sua eficácia foi avaliada no modelo murino de câncer de bexiga. Os resultados prévios de nosso grupo demonstraram que 10^5 UFC do mutante $\Delta ihfAB$ é uma dose segura e eficiente para tratar o câncer de bexiga em camundongos (TIBO, 2019). Além disso, o triplo mutante $\Delta ihfABpmi$ mostrou ser mais atenuado que o duplo mutante $\Delta ihfAB$ no modelo de *G. mellonella* (dados não mostrados). Baseado nesses resultados, escolhemos 10^5 UFC do triplo mutante $ihfABpmi$ como dose para nossos testes em camundongos. Com relação ao mutante $\Delta tolRA$, a literatura reporta que é altamente atenuado (DALEKE-SCHERMERHORN et al., 2014a), e nossos resultados em *G. mellonella* também demonstraram essa atenuação (Figura II.1.C). Assim, nos experimentos de segurança dos tratamentos com mutantes, testamos duas doses de 10^6 e 10^7 UFC do mutante $\Delta tolRA$.

O peso corporal dos camundongos foi medido como indicador do estado geral de saúde. Após a primeira inoculação, observamos que os camundongos inoculados com 10^7 UFC do mutante $\Delta tolRA$ perderam ± 2 gramas (12% do peso corporal) e apresentaram sinais de doença, como secreção ocular, piloereção e letargia. No entanto, depois de uma semana da primeira inoculação, os camundongos recuperaram o peso e os sintomas de doença desapareceram (Figura II.3.B). Nos camundongos inoculados com PBS, 10^6 UFC do mutante $\Delta tolRA$ ou 10^5 UFC do mutante $\Delta ihfABpmi$, não observamos perda de peso ou sinais de doença sistêmica ao longo do experimento (Figura II.3.B). Nenhuma mortalidade foi observada ao longo do experimento nos camundongos (Tabela II.3).

Vinte e um dias após a primeira inoculação dos mutantes, os camundongos foram eutanasiados e os órgãos foram coletados para análise da persistência bacteriana. O exame macroscópico dos órgãos mostrou hepatomegalia e esplenomegalia no grupo inoculado com 10^7 UFC do mutante $\Delta tolRA$. Diferenças significativas foram observadas no peso do baço e do fígado

dos camundongos inoculados com 10^7 UFC do mutante *AtolRA* quando comparado com o grupo inoculado com PBS (Figura II.3.C-D). Não observamos diferenças significativas entre o peso dos órgãos de camundongos inoculados com 10^6 UFC do mutante *AtolRA* ou 10^5 UFC do mutante *ΔihfABpmi* quando comparados com os camundongos inoculados com PBS.

Com relação à análise de distribuição e de persistência bacteriana no final do experimento, amostras homogeneizadas de sangue ou maceradas de fígado e baço foram diluídas e plaqueadas em LB ágar, SS e MacConkey para posterior contagem de UFC. Porém, não foram detectadas colônias bacterianas em nenhum dos três meios testados e em nenhum dos grupos analisados, inclusive quando as amostras foram plaqueadas sem diluição. O não isolamento dos mutantes sugere que as bactérias não conseguem persistir nesses órgãos após 21 dias da primeira inoculação e 15 dias da segunda inoculação.

Tabela II.3. Ensaio de segurança do tratamento com mutantes atenuados por via subcutânea em camundongos C57BL/6JUnib (5 por grupo).

Grupos	UFC	Sobreviventes/Inoculados
PBS		5/5
<i>ΔihfABpmi</i>	10^5	5/5
<i>AtolRA</i>	10^7	5/5
<i>AtolRA</i>	10^6	5/5

II.3.6. Eficácia antitumoral de mutantes atenuados de *S. enterica* Typhimurium no modelo de melanoma murino

Baseado nos experimentos de segurança dos tratamentos, escolhemos fazer os testes de eficácia antitumoral com 10^6 UFC do mutante *AtolRA* e 10^5 UFC do mutante *ΔihfABpmi*, visto que nessas concentrações não foram observados sinais de doença, perda de peso, esplenomegalia ou hepatomegalia, o que sugere que camundongos toleram bem os mutantes nessas concentrações. A eficácia antitumoral dos mutantes foi avaliada quanto à taxa de sobrevivência dos camundongos e quanto à capacidade de redução da massa tumoral. Camundongos portadores de tumores B16F10 foram tratados por via intratumoral com 10^6 UFC do mutante *AtolRA* ou 10^5 UFC do mutante *ΔihfABpmi*. Camundongos inoculados com PBS foram utilizados como controle negativo. Como podemos observar na Figura II.4.A, C-F, tanto o mutante *AtolRA* quanto o mutante *ΔihfABpmi* foram capazes de reduzir o crescimento do tumor, quando comparados com o grupo tratado com

PBS (controle), não obstante o mutante *ΔihfABpmi* foi mais eficiente para reduzir os tumores de melanoma.

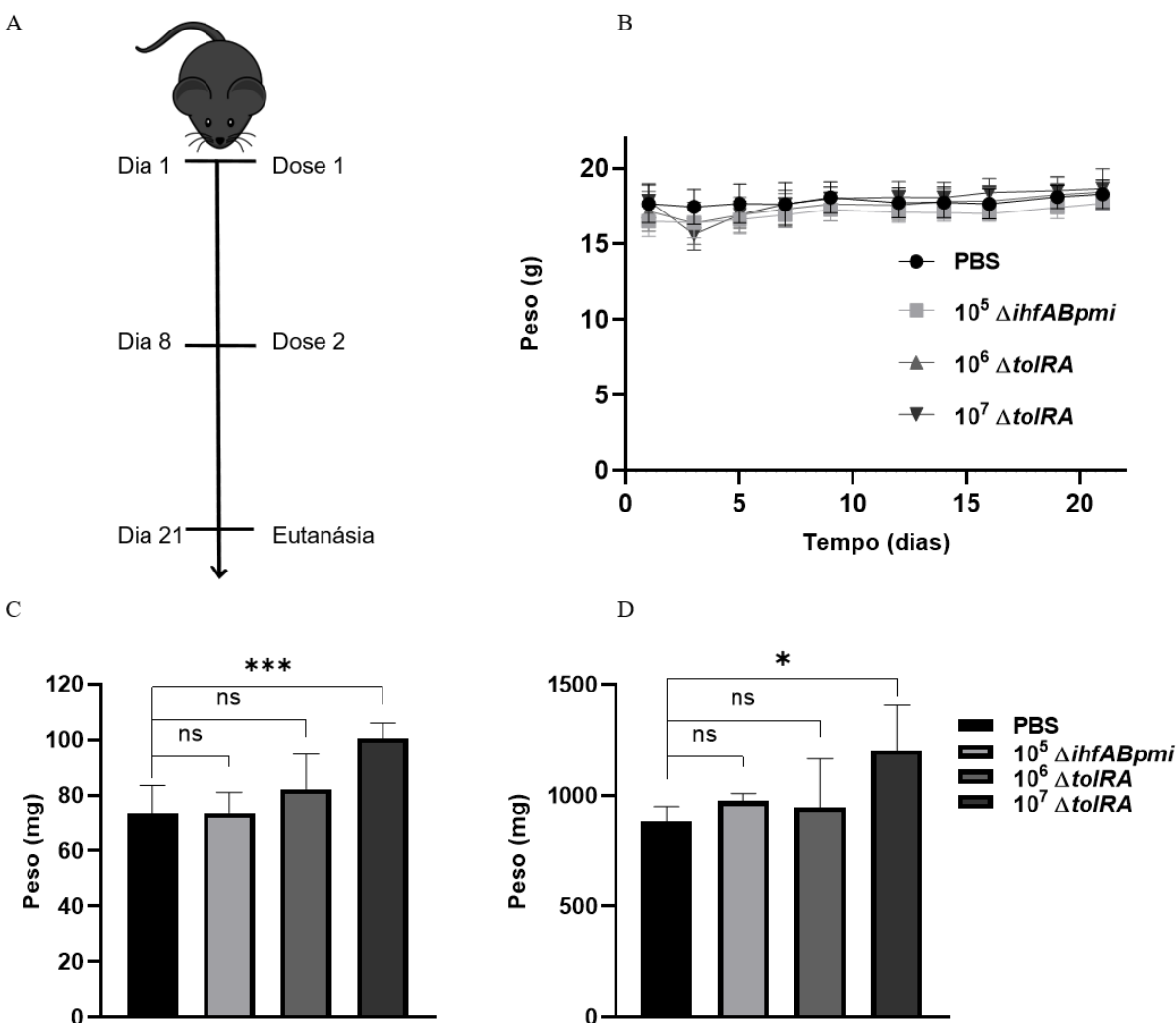


Figura II.3. Avaliação da segurança do tratamento com mutantes atenuados de *S. enterica* Typhimurium (A)

Desenho experimental para testar a toxicidade e a segurança dos mutantes em camundongos inoculados por via subcutânea. (B) Peso corporal de camundongos inoculados com mutantes atenuados ao longo do experimento. Peso dos baços (C) e fígados (D) de camundongos inoculados com mutantes atenuados (n=5). O experimento foi repetido duas vezes. Os gráficos mostram os dados de um experimento representativo. A significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$.

A Figura II.4.C mostra o tamanho do tumor no ponto final do experimento (21 dias após a primeira inoculação das bactérias). Podemos observar que o tratamento com o mutante *ΔihfABpmi* foi capaz de induzir a redução completa da massa tumoral de todos os camundongos, deixando só

uma cicatriz no local do tumor. Também foi possível observar que, seis dias depois da primeira inoculação, o tratamento com o mutante *ΔihfABpmi* reduziu completamente os tumores de todos os camundongos, os quais não voltaram a crescer nos 15 dias seguintes (Figura II.4.E). Por outro lado, observamos que, embora o mutante *ΔtolRA* tenha inibido o crescimento tumoral quando comparado ao controle negativo, não foi capaz de eliminar completamente os tumores dos camundongos.

Com relação à taxa de sobrevivência, todos os camundongos inoculados com mutantes sobreviveram até o ponto final do experimento, entretanto os camundongos do grupo PBS foram eutanasiados uma semana antes do ponto final do experimento para evitar maiores sofrimentos causados pelo grande crescimento tumoral. Não observamos diferenças significativas entre o peso dos camundongos inoculados com os mutantes e com o grupo PBS; também não observamos sinais de doença nos camundongos inoculados com o mutante *ΔihfABpmi* (Figura II.4.B.).

A esplenomegalia e a hepatomegalia (aumento do tamanho do baço e do fígado, respectivamente) são traços característicos de ratos portadores de melanoma (KAMRAN et al., 2018). Ao comparar o peso do fígado e do baço dos camundongos tratados com mutantes com os do grupo controle, observamos diminuição significativa do peso do fígado e do baço em camundongos tratados com o mutante *ΔihfABpmi* em comparação com o controle PBS (Figura II.4.G-H.). Esses resultados indicam que o mutante *ΔihfABpmi* inibe a esplenomegalia e a hepatomegalia produzidas por tumores B16F10.

Amostras de sangue, fígado, baço e tumor foram homogeneizadas ou maceradas e plaqueadas em LB ágar, SS e MacConkey para posterior contagem de UFC, mas não foram detectadas colônias bacterianas nos grupos analisados (camundongos tratados com PBS, *ΔihfABpmi* ou *ΔihfABpmi*), inclusive quando as amostras foram plaqueadas sem diluição. O não isolamento dos mutantes sugere que as bactérias não conseguem persistir nesses órgãos ou que são eliminados pelo sistema imune dos camundongos.

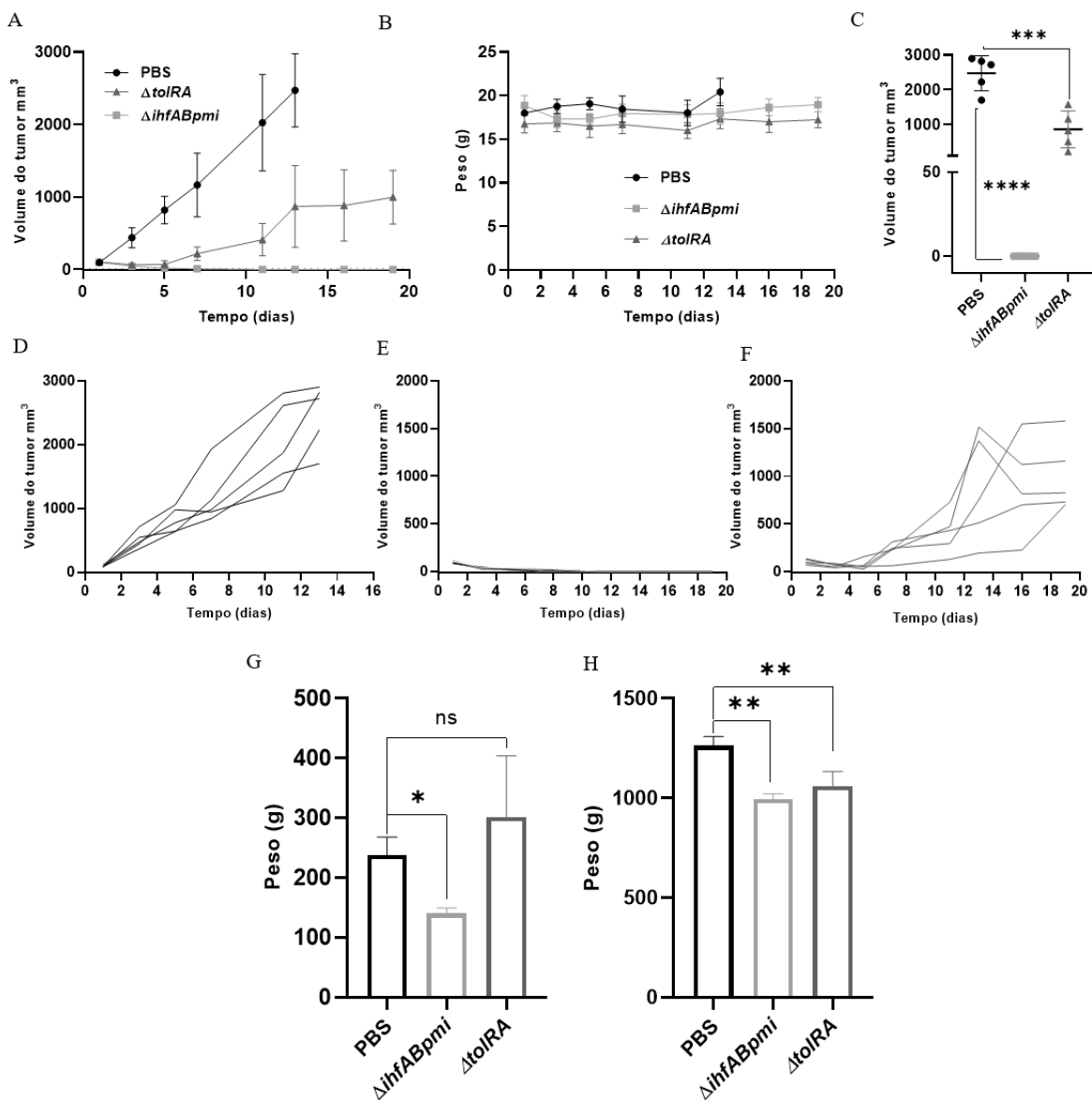


Figura II.4. Eficácia antitumoral de mutantes atenuados de *S. enterica* Typhimurium em modelo de tumor subcutâneo B16F10. Camundongos C57BL/6JUnif foram inoculados com células B16F10 (3×10^6) no dia 0. Quando o tumor atingiu $\sim 100 \text{ mm}^3$, 10^6 UFC do mutante $\Delta tolRA$, 10^5 UFC do mutante $\Delta ihfABpmi$ ou PBS foi injetado por via intratumoral uma vez por semana por duas semanas ($n = 7$). A. Crescimento tumoral depois de iniciados os tratamentos. B. Peso dos camundongos durante os tratamentos. C. Tamanho do tumor no ponto final do experimento. D-F. Cinética do crescimento do tumor individual nos grupos inoculados com PBS, com mutante $\Delta ihfABpmi$ e com mutante $\Delta tolRA$, respectivamente. G. Peso de baço após os tratamentos. H. Peso de fígado após os tratamentos. Foram feitos dois experimentos independentes, usando sete camundongos por grupo. Os gráficos mostram os dados de um experimento representativo. A significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$.

II.3.7. Análise dos mecanismos envolvidos na resposta antitumoral

Os mecanismos imunológicos pelos quais *S. enterica* Typhimurium exerce sua atividade antitumoral ainda não são bem compreendidos. A evidência sugere que células do sistema imune inato, como macrófagos, e a produção de citocinas pró-inflamatórias estão envolvidas na eliminação de tumores (AZEVEDO et al., 2018; DI MITRI et al., 2019). Neste estudo, o mutante $\Delta ihfABpmi$ foi escolhido para a análise dos mecanismos envolvidos na resposta antitumoral porque mostrou maior inibição tumoral que o mutante $\Delta tolRA$. Os camundongos foram eutanasiados, e o tecido tumoral foi coletado quatro dias depois da primeira inoculação, já que o mutante $\Delta ihfABpmi$ inibiu rapidamente o crescimento de tumores.

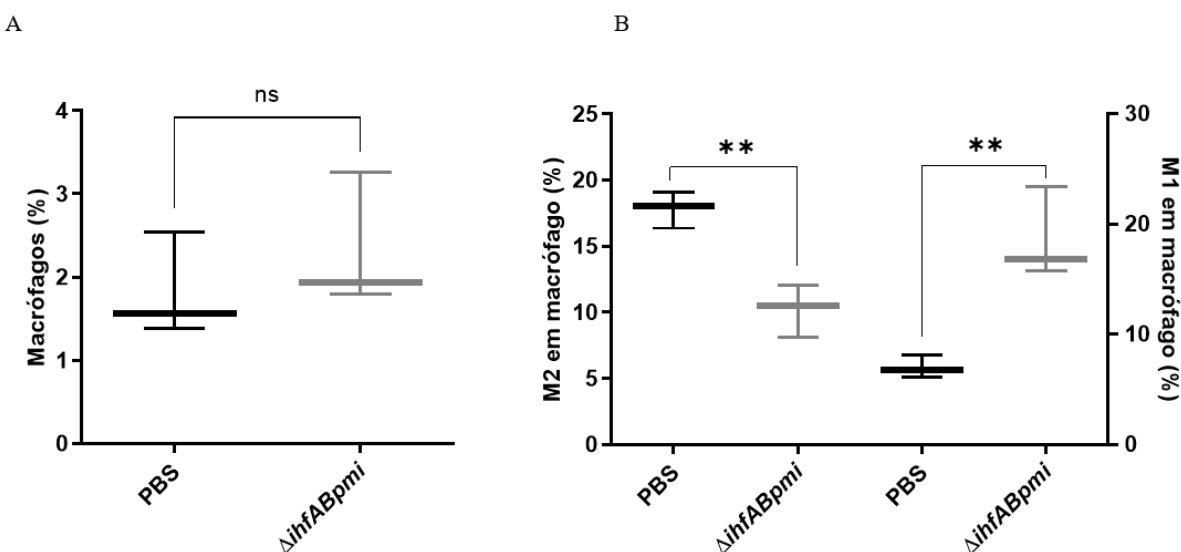


Figura II.5. Imunofenotipagem de macrófagos infiltrados nos tumores B16F10. A. População de macrófagos e B. Fenótipo de macrófagos (do tipo M1 ou do tipo M2) depois do tratamento por via intratumoral com 10^5 UFC do mutante $\Delta ihfABpmi$ ou PBS em modelo murino de melanoma (três camundongos por grupo). A significância estatística foi calculada por teste t Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$.

A suspensão de células tumorais preparadas a partir do tecido tumoral, foram marcadas com CD80-Pe, CD206-APC, CD11b-PerCP e F4/80-Fitc. Embora a análise de citometria de fluxo tenha mostrado maior infiltração de macrófagos no tumor após o tratamento com o mutante $\Delta ihfABpmi$ do que após o tratamento com PBS, não houve diferenças entre os dois tratamentos (Figura II.5.A). Em seguida, detectamos o fenótipo de macrófagos intratumorais. A imunofenotipagem mostrou que o tratamento com o mutante $\Delta ihfABpmi$ reduziu

significativamente a proporção de macrófagos de tipo M2 e aumentou a proporção de macrófagos do tipo M1 (Figura II.5.B), sugerindo que a capacidade de eliminar o tumor está associada com a habilidade de *S. enterica* $\Delta ihfABpmi$ em mudar o fenótipo de macrófagos pró-tumorais para macrófagos imunossupressores que destroem as células tumorais.

Para entender melhor o mecanismo pelo qual o mutante $\Delta ihfABpmi$ exerce sua atividade antitumoral, avaliamos a expressão de genes de proliferação celular (Ki-67), angiogêneses (VEGF), apoptose (Bax), e mediadores pró-inflamatórios (IL-6, TNF- α e iNOS). Assim, tecido tumoral de camundongos tratados com o mutante $\Delta ihfABpmi$ ou com PBS foi coletado para medir o nível de expressão de mRNA por qRT-PCR. Os resultados mostraram que o tratamento com o mutante $\Delta ihfABpmi$ induz a suprarregulação estatisticamente significativa do nível de mRNA dos genes Bax, IL-6, TNF- α e iNOS (figura II.6.A, B, D e F). Citocinas pró-inflamatórias secretadas por células imunes, como macrófagos, podem contribuir para a morte das células tumorais e induzir uma forte resposta imune específica do tumor.

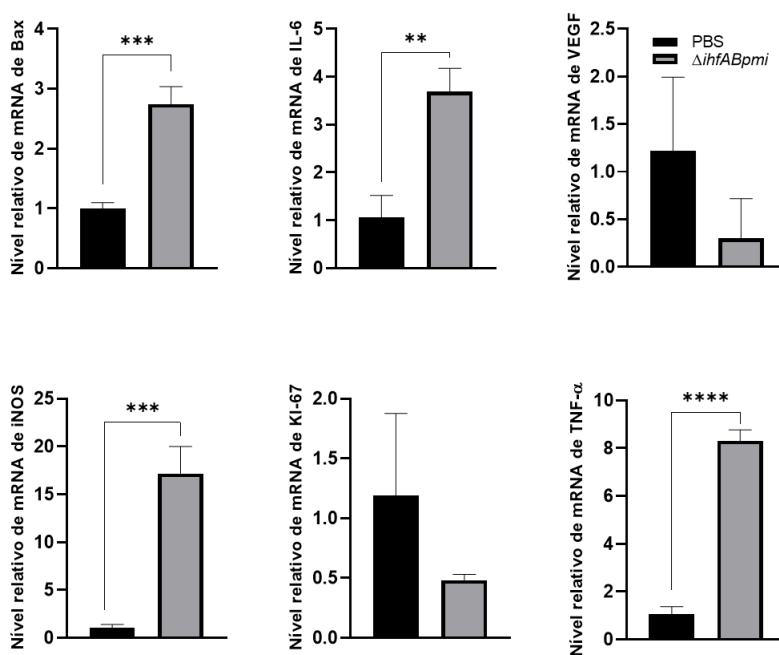


Figura II.6. Efeito do mutante $\Delta ihfABpmi$ na expressão de genes. Nível relativo de expressão de RNA dos genes Bax (A), IL-6 (B), VEGF (C), iNOS (D), Ki-67 (E) e TNF- α (F). Tecido tumoral de camundongos portadores de tumor B16F10 foi coletado após quatro dias de uma injeção por via intratumoral com 10^5 UFC do mutante $\Delta ihfABpmi$ ou PBS ($n = 3$). Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SD. A significância estatística foi calculada por teste t Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$.

II.4. Discussão

A terapia anticancerígena baseada no uso de bactérias representa uma opção promissora para o tratamento do câncer (CHEN et al., 2022; PÉREZ JORGE et al., 2022). Bactérias anaeróbicas facultativas como *S. enterica* são foco de pesquisa devido à sua capacidade natural de atacar regiões tumorais com variável concentração de oxigênio e à sua imunogenicidade que conduz a ativação do sistema imunológico para a destruição de tumores em modelos animais (ZHOU et al., 2018; GAO et al., 2020). Porém, *S. enterica* também é naturalmente um patógeno que pode causar Salmonelose em humanos (ROGERS; TSOLIS; BÄUMLER, 2021). Portanto, para que cepas de *S. enterica* possam ser consideradas na terapia contra o câncer, é necessário atenuar sua virulência para garantir a aplicação segura.

A virulência de *S. enterica* pode ser atenuada pela mutação ou pela eliminação de genes de patogenicidade ou genes essenciais para sua sobrevivência (HIRSCH WERLE et al., 2016; LEITE et al., 2017; JIANG et al., 2019). Não obstante, a mutação desses genes pode comprometer sua atividade anticancerígena, como suas capacidades de invadir e de destruir células tumorais (ARRACH et al., 2010). Por exemplo, a deleção em genes da biossíntese do LPS (ΔrfG e ΔrfD) diminui o efeito antitumoral intrínseco de *S. enterica* Typhimurium 14028 (FRAHM et al., 2015). As cepas KST0651 ($\Delta relA \Delta spoT$) e KST0649 ($\Delta ptsI \Delta crr$) perderam a capacidade de replicar-se em macrófagos e células epiteliais (NA et al., 2006; ZHI et al., 2019). O baixo rendimento da cepa VNP20009, modificada no lipídio A ($\Delta msbB \Delta purI$), evidenciado na carência de colonização tumoral e de atividade antitumoral em ensaios pré-clínicos, é atribuído à deleção do gene *msbB* (TOSO et al., 2002; HEIMANN; ROSENBERG, 2003; NEMUNAITIS et al., 2003). Portanto, a seleção de cepas de *S. enterica* deve ser cuidadosa para não comprometer a capacidade de atacar tumores das cepas enquanto se logra sua atenuação.

Neste estudo, demonstramos a eficiência antitumoral de duas cepas de *S. enterica* Typhimurium que não tinham sido exploradas quanto a seu potencial antitumoral. As cepas foram desenhadas pela deleção de genes cromossômicos. O duplo mutante $\Delta tolRA$, deficiente de duas proteínas críticas para manter a integridade da membrana bacteriana (TolR e TolA), e o triplo mutante $\Delta ihfABpmi$, que carece de duas proteínas, IHF uma proteína associada ao nucleóide que também atua como regulador transcricional envolvido na expressão de genes de patogenicidade e da 6-fosfomanose isomerase, uma enzima chave para a produção do lipopolissacarídeo O. Entre

os dois mutantes avaliadas, o mutante $\Delta tolRA$ mostrou ser altamente atenuado, porém sua capacidade de eliminar tumores de melanoma foi comprometida, ao menos no modelo de camundongo. Por sua vez, o mutante $\Delta ihfABpmi$ mostrou menor atenuação que o mutante $\Delta tolRA$, no entanto manteve sua capacidade de eliminar tumores.

As proteínas TolR e TolA fazem parte do sistema Tol-Pal, um complexo multiproteico chave para a manutenção da integridade do envelope celular de bactérias gram negativas e que está associado com a virulência bacteriana (NEVERMANN et al., 2019; LI et al., 2022). O sistema Tol-Pal atravessa membrana interna, periplasma e membrana externa (HIRAKAWA et al., 2020). TolR e TolA estão ancorados na membrana interna através de uma única região localizada próxima do N-terminal (SANTOS et al., 2014). A inativação de qualquer um dos genes do sistema Tol-Pal afeta negativamente a integridade da membrana externa, produz fuga do periplasma, aumenta a suscetibilidade a compostos tóxicos e eleva a produção de vesículas de membrana externa (NEVERMANN et al., 2019).

Além da manutenção da estrutura do envelope celular, outras funções biológicas têm sido associadas às proteínas TolR e TolA. Por exemplo, em *E. coli*, a proteína TolR participa no transporte retrógrado de fosfolipídios. Em *Shigella flexneri*, as cepas carentes do gene *tolR* são mais sensíveis a antibióticos e a sais biliares e são menos virulentas (PASTOR et al., 2018; BOAGS; SAMSUDIN; KHALID, 2019). Em *S. enterica* Typhimurium, a proteína TolR tem funções associadas com a motilidade, e a deleção do gene *tolR* aumenta significativamente a produção de vesículas de membrana externa (LAHIRI et al., 2011; MARCHANT et al., 2021).

Por outro lado, a deleção do gene que codifica a proteína TolA em *S. enterica* Typhimurium aumenta a sensibilidade a sais biliares, reduz a motilidade e a carga bacteriana em baço, fígado, placas de Peyer e gânglios linfáticos, em comparação com *S. enterica* Typhimurium de tipo selvagem. *S. enterica* Typhimurium $\Delta tolA$ é considerado altamente atenuado em camundongos e em *G. mellonella* e mais sensível ao sistema complemento que cepas do tipo selvagem, uma característica também relatada para mutantes carentes de *tolR* (PATERSON et al., 2009; LAHIRI et al., 2011; MORGAN; ORTIZ; RIORDAN, 2014; PASTOR et al., 2018). Nossos resultados de virulência do mutante $\Delta tolRA$ estão de acordo com o reportado na literatura, pois, no modelo de *G. mellonella*, o mutante $\Delta tolRA$ mostrou ser altamente atenuado, já que 90% das larvas inoculadas

com o mutante $\Delta tolRA$ sobreviveram, enquanto todas as larvas inoculadas com a cepa de tipo selvagem morreram 24 horas após a inoculação (Figura II.1.C).

Os perfis de atenuação e de hipervesiculação de mutantes carentes dos genes *tolR* e *tolA* tornaram essas cepas e vesículas de membrana externa isoladas nesses mutantes foco de pesquisas para o desenvolvimento de vacinas contra *S. enterica*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* e SARS-CoV-2 (PATERSON et al., 2009; DALEKE-SCHERMERHORN et al., 2014a; HAYS et al., 2018; JIANG et al., 2022). No entanto, seu potencial contra o câncer não havia sido investigado. Neste estudo, exploramos *in vitro* e *in vivo* se o mutante duplo de *S. enterica* Typhimurium $\Delta tolRA$ apresenta atividade antitumoral. De fato, o mutante $\Delta tolRA$ possui características importantes para uma cepa antitumoral potencial, como a alta atenuação da virulência (Figura II.1.C), as capacidades de invadir e de sobreviver de forma similar à cepa de tipo selvagem (Figura II.2.A-B) e a toxicidade em células de câncer de bexiga e melanoma (Figura II.2. C-D). A principal característica do mutante $\Delta tolRA$ observada neste estudo foi sua capacidade de inibir o crescimento de melanoma em modelo murino. Apesar disso, o mutante $\Delta tolRA$ não foi suficiente para erradicar totalmente os tumores (Figura II.4). A alta atenuação dessa cepa provavelmente comprometeu sua eficácia antitumoral.

Até o momento, nenhuma das cepas analisadas é eficaz para eliminar tumores humanos, por isso o estudo de novas cepas antitumorais é necessário para obter cepas mais eficazes e seguras que possam ser usadas no tratamento contra o câncer (TOSO et al., 2002; HEIMANN; ROSENBERG, 2003; NEMUNAITIS et al., 2003). Nosso laboratório demonstrou previamente que o mutante para o gene *ihfA* de *S. enterica* Typhimurium é atenuado quanto à virulência e reduz a massa tumoral em modelo murino. No entanto, essa cepa apresentou problemas de alta toxicidade *in vivo*. 70% dos camundongos tratados com *S. enterica* Typhimurium $\Delta ihfA$ por via intratumoral morreram 15 dias após a inoculação com uma dose de 10^5 UFC (HIRSCH WERLE et al., 2016).

Os genes *ihfA* e *ihfB* codificam para as subunidades α e β da proteína heterodimérica IHF (BUSHMAN et al., 1984; POZDEEV et al., 2022). IHF se liga promotores de transcrição específicos e induz sua curvatura $>120^\circ$ (K et al., 2021). A flexão do DNA pode influenciar a transcrição, facilitando o contato entre proteínas reguladoras e a RNA polimerase (CRAIG; NASH, 1984; GOODMAN et al., 1999; SWINGER; RICE, 2004; VELMURUGU et al., 2018). Um estudo recente em *Pseudomonas putida* revelou que a recombinação homóloga e processos

mutagênicos são facilitados por IHF, e as taxas de recombinação e mutação são menores em mutantes para a proteína IHF (MIKKEL et al., 2020). Em *S. enterica* Typhimurium, IHF controla positivamente a expressão de vários genes de virulência e a invasão de células epiteliais (MANGAN et al., 2006). Cepas carentes de *ihfA* e *ihfB* são atenuadas e levam a uma desregulação transcricional global (PRIETO et al., 2012; REVERCHON et al., 2021). Estudos prévios têm demonstrado que as formas homodiméricas de IHF ($\alpha\alpha$ ou $\beta\beta$) são biologicamente ativas, embora menos estáveis (ZULIANELLO et al., 1994). Mutantes carentes de *ihfA* ou *ihfB* ainda são capazes de produzir proteínas homodiméricas; isso poderia explicar o porquê da toxicidade do mutante simples $\Delta ihfA$ foi alta no estudo anterior de nosso laboratório.

Posteriormente, para abordar os problemas de toxicidade apresentados pelo mutante $\Delta ihfA$, nosso grupo construiu uma cepa deficiente em IHF (homodímero ou heterodímero) por deleção de *ihfA* e *ihfB*. O duplo mutante *ihfA* e *ihfB* de *S. enterica* Typhimurium 14028 foi mais atenuado que o mutante simples $\Delta ihfA$ (HIRSCH WERLE et al., 2016; TIBO, 2019). Nosso grupo também demonstrou que o duplo mutante *ihfA* e *ihfB* de *S. enterica* Typhimurium 14028 em combinação com violaceína tem efeito antitumoral contra o câncer de bexiga no modelo murino (TIBO, 2019). Levando esses resultados em consideração e com a finalidade de melhorar a segurança e a atenuação do duplo mutante de *S. enterica* Typhimurium 14028 $\Delta ihfA \Delta ihfB$, neste trabalho construímos um novo mutante triplo, adicionando deleção do gene *pmi*.

O gene *pmi* codifica para 6-fosfomanose isomerase, enzima que faz a interconversão reversível de fructosa-6-fosfato em manosa-6-fosfato, precursor de GDP-manose. Como a GDP-manose é necessária para a síntese da cadeia lateral do antígeno O do LPS, cepas com mutação no gene *pmi* crescem na ausência de manose, mas não podem sintetizar o antígeno O; esses mutantes só podem produzir o LPS completo na presença de manose exógena (COLLINS; HACKETT, 1991; MITRA et al., 2015; LI et al., 2017b). Mutantes com deleção no gene *pmi* já foram estudados previamente, já que permitem a obtenção de cepas com atenuação retardada regulada, uma estratégia implementada para a construção de cepas vacinais seguras e imunogênicas (KONG; CLARK-CURTISS; CURTISS, 2013; LANIEWSKI et al., 2014; MITRA et al., 2015; LI et al., 2017b, 2020c). Dessa forma, mutantes Δpmi são cultivados em meio de cultura suplementado com manose, permitindo uma ótima colonização do hospedeiro e nas etapas iniciais de invasão. Depois

de várias gerações de crescimento *in vivo*, o antígeno O é perdido gradualmente e o mutante Δpmi atenua-se pela ausência de manose nos tecidos animais (MITRA et al., 2015).

Neste estudo, deletamos o gene *pmi* baseando-se em estudos anteriores que mostraram que esses mutantes são atenuados e imunogênicos, com a vantagem de cessarem a expressão *in vivo* de LPS completo (COLLINS; ATTRIDGE; HACKETT, 1991). Essa característica confere à linhagem maior segurança para o hospedeiro, uma vez que linhagens com LPS incompletos são mais suscetíveis ao sistema imunológico (COLLINS; ATTRIDGE; HACKETT, 1991; LANIEWSKI et al., 2014).

Nossos resultados sugerem que o mutante $\Delta ihfABpmi$ é uma cepa atenuada com potencial antitumoral que apresenta um equilíbrio entre atenuação e eficiência antitumoral. Embora o mutante triplo $\Delta ihfABpmi$ seja uma cepa atenuada, seu perfil de atenuação foi inferior ao perfil de atenuação do mutante $\Delta tolRA$ (Figura II.1.C). O mutante $\Delta ihfABpmi$ foi capaz de invadir e sobreviver no interior de células tumorais, porém não tão eficientemente quanto a linhagem selvagem (Figura II.2.A-B). Apesar disso, o mutante $\Delta ihfABpmi$ foi eficiente em diminuir a viabilidade de células tumorais *in vivo* e *in vitro* (Figura II.2.D-E e Figura II.4). As mutações nos genes *ihfA*, *ihfB* e *pmi* não comprometeram a capacidade antitumoral de *S. enterica* Typhimurium, já que o tratamento com o triplo mutante levou à regressão total de tumores B16F10 (Figura II.4). Diferentes estudos têm demonstrado que *S. enterica* Typhimurium exerce sua atividade antitumoral ativando o sistema imunológico (ZHENG et al., 2017; CHEN et al., 2021), portanto a imunogenicidade da bactéria é a chave para a eliminação de tumores.

A incapacidade de produzir LPS completo do mutante $\Delta ihfABpmi$ após alguns ciclos de replicação parece permitir que o mutante ative o sistema imunológico e posteriormente adquira fenótipo de atenuação adicional pela deficiência de manose. Um exame mais detalhado do efeito antitumoral mostrou que o tratamento de tumores com o mutante $\Delta ihfABpmi$ leva à infiltração de macrófagos e à polarização funcional de macrófagos no microambiente tumoral imunossupressor. A análise revelou que os macrófagos do tipo M2 foram mais abundantes em tecido tumoral de camundongos do grupo controle (PBS) que no grupo tratado com $\Delta ihfABpmi$, enquanto a porcentagem de macrófagos do tipo M1 foi maior no grupo tratado com o mutante (Figura II.5). Evidentemente, o tratamento com o mutante $\Delta ihfABpmi$ afetou a polarização de macrófagos ao fenótipo antitumoral. A alteração de M2 para M1 também foi acompanhada pelo aumento

significativo de mRNA de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-6), iNOS e Bax (Figura II.6). As citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-12P70 foram associadas com a atividade antitumoral em estudos prévios (GRILLE et al., 2014; VENDRELL et al., 2013). Juntos, nossos resultados sugerem que o mutante $\Delta ihfABpmi$ induz a polarização de macrófagos do tipo M1, os quais levam a apoptose e suprimem o crescimento tumoral pela secreção de citocinas com atividade antitumoral.

Os estudos têm identificado que os macrófagos são ativados por LPS e por flagelina para matar especificamente as células tumorais (YANG et al., 2018; CHEN et al., 2021). O LPS e a flagelina presentes em *S. enterica* Typhimurium podem estimular a infiltração de células imunitárias, como macrófagos, pela sinalização TLR5 e TLR4, respectivamente. As células imunitárias produziram mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-6, IL-1, IL-12 e iNOS, levando à reprogramação do microambiente tumoral imunossupressor em imunogênico, para auxiliar na eliminação de tumores (ZHENG et al., 2017). No momento da inoculação, o mutante $\Delta ihfABpmi$ tem LPS completo, permitindo que a bactéria possa colonizar eficientemente e levar a reprogramação do microambiente tumoral, o que é evidenciado pela porcentagem de macrófagos do tipo M1 e o aumento significativo de iNOS, indicador de macrófagos do tipo M1. Nossos resultados são consistentes com informes prévios em modelos de melanoma, linfoma, adenocarcinoma de cólon e câncer de mama que também mostram que *S. enterica* Typhimurium pode reprogramar o fenótipo de macrófagos ao fenótipo M1 e induzir a secreção de citocinas inflamatórias (ZHENG et al., 2017; YANG et al., 2018; MATEOS-CHÁVEZ et al., 2019; CHEN et al., 2021; CR; LH; CH, 2021).

A produção de TNF- α tem sido associada com a morte de células tumorais induzida por apoptose (SANLIOGLU et al., 2004). Estudos prévios têm demonstrado que *S. enterica* Typhimurium apresenta um efeito apoptótico ao aumentar a produção de Bax (ZHAO et al., 2016; MATEOS-CHÁVEZ et al., 2019). Os dados aqui apresentados mostram que o tratamento com o mutante $\Delta ihfABpmi$ aumenta significativamente a expressão dos genes TNF- α e Bax, sugerindo que *S. enterica* Typhimurium exerce sua atividade antitumoral por ativação do apoptose.

A toxicidade bacteriana é uma barreira para o uso de bactérias na imunoterapia do câncer que deve ser abordada. O mutante triplo explorado neste estudo perde o LPS completo depois de algumas gerações, isso faz que a bactéria seja mais susceptível ao sistema imune e possa ser eliminada do hospede, causando assim menor toxicidade. No ponto final do experimento, não

detectamos o mutante $\Delta ihfABpmi$ em tumor, fígado ou baço de camundongos, sugerindo que esse mutante elimina completamente o tumor, e posteriormente é eliminado pelo sistema imunológico. Além disso, deleção dos genes que codificam para a proteína IHF reduzem o risco de que o mutante $\Delta ihfABpmi$ faça recombinação homóloga com bactérias da microbiota ou apareçam mutações aleatórias, além de contribuir com o fenótipo de atenuação.

No presente estudo, reportamos dois mutantes atenuados de *S. enterica* Typhimurium e exploramos a atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. O primeiro mutante mostrou ser altamente atenuado, mas sua atividade antitumoral foi comprometida. O segundo mutante, $\Delta ihfABpmi$ mostrou um perfil de atenuação menor, mas manteve suas capacidades de invadir e de sobreviver em células tumorais. Além disso, foi eficiente para eliminar totalmente o melanoma. O efeito antitumoral foi mediado pela reprogramação de macrófagos do tipo M2 para o tipo M1. Esses macrófagos secretam citocinas e mediadores pró-inflamatórios que conduzem a apoptose das células tumorais. Em conjunto, nossos dados proporcionam uma base para compreender a atividade de *S. enterica* Typhimurium na imunoterapia do câncer e abrem perspectivas para o uso de mutantes para NAPs como linhagens atenuadas para fins vacinais e antitumorais.

Referencias

ARRACH, N. et al. High-throughput screening for *Salmonella* avirulent mutants that retain targeting of solid tumors. **Cancer Research**, v. 70, n. 6, p. 2165–2170, 15 mar. 2010.

AVOGADRI, F. et al. Cancer immunotherapy based on killing of *Salmonella*-infected tumor cells. **Cancer Research**, v. 65, n. 9, p. 3920–3927, 1 maio 2005.

BACON, J. V. W. et al. Somatic Features of Response and Relapse in Non–muscle-invasive Bladder Cancer Treated with *Bacillus Calmette-Guérin* Immunotherapy. **European Urology Oncology**, 8 dez. 2021.

BOAGS, A. T.; SAMSUDIN, F.; KHALID, S. Binding from Both Sides: TolR and Full-Length OmpA Bind and Maintain the Local Structure of the E. coli Cell Wall. **Structure (London, England: 1993)**, v. 27, n. 4, p. 713- 724.e2, 2 abr. 2019.

BOARDMAN, C. H. et al. A Phase I Evaluation of Extended Field Radiation Therapy With Concomitant Cisplatin Chemotherapy Followed by Paclitaxel and Carboplatin Chemotherapy in Women With Cervical Carcinoma Metastatic to the Para-aortic Lymph Nodes: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study. **Gynecologic Oncology**, v. 151, n. 2, p. 202–207, 1 nov. 2018.

BUSHMAN, W. et al. Determinants of directionality in lambda site-specific recombination. **Cell**, v. 39, n. 3 Pt 2, p. 699–706, dez. 1984.

CHANG, W.-W.; LEE, C.-H. *Salmonella* as an innovative therapeutic antitumor agent. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 8, p. 14546–14554, 21 ago. 2014.

CHEN, J. et al. *Salmonella* flagella confer anti-tumor immunological effect via activating Flagellin/TLR5 signalling within tumor microenvironment. **Acta Pharmaceutica Sinica. B**, v. 11, n. 10, p. 3165–3177, out. 2021.

CHEN, W. et al. Advances in *Salmonella* Typhimurium-based drug delivery system for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 185, p. 114295, jun. 2022.

COLLINS, L. V.; ATTRIDGE, S.; HACKETT, J. Mutations at rfc or pmi attenuate *Salmonella* typhimurium virulence for mice. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 3, p. 1079–1085, mar. 1991.

COLLINS, L. V.; HACKETT, J. Sequence of the phosphomannose isomerase-encoding gene of *Salmonella* typhimurium. **Gene**, v. 103, n. 1, p. 135–136, 15 jul. 1991.

CR, P.; LH, W.; CH, L. *Salmonella* Impacts Tumor-Induced Macrophage Polarization, and Inhibits SNAI1-Mediated Metastasis in Melanoma. **Cancers**, v. 13, n. 12, 6 set. 2021.

CRAIG, N. L.; NASH, H. A. *E. coli* integration host factor binds to specific sites in DNA. **Cell**, v. 39, n. 3 Pt 2, p. 707–716, dez. 1984.

DALEKE-SCHERMERHORN, M. H. et al. Decoration of Outer Membrane Vesicles with Multiple Antigens by Using an Autotransporter Approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 18, p. 5854–5865, set. 2014a.

DALEKE-SCHERMERHORN, M. H. et al. Decoration of Outer Membrane Vesicles with Multiple Antigens by Using an Autotransporter Approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 18, p. 5854–5865, set. 2014b.

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**, v. 97, n. 12, p. 6640–6645, 6 jun. 2000.

DI MITRI, D. et al. Re-education of Tumor-Associated Macrophages by CXCR2 Blockade Drives Senescence and Tumor Inhibition in Advanced Prostate Cancer. **Cell Reports**, v. 28, n. 8, p. 2156–2168.e5, 20 ago. 2019.

EGGERMONT, A. M. M. et al. Identification of stage I/IIA melanoma patients at high risk for disease relapse using a clinicopathologic and gene expression model. **European Journal of Cancer**, v. 140, p. 11–18, 1 nov. 2020.

ELSINGHORST, E. A. Measurement of invasion by gentamicin resistance. **Methods in Enzymology**, v. 236, p. 405–420, 1994.

FELGNER, S. et al. aroA-Deficient *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Is More Than a Metabolically Attenuated Mutant. **mBio**, v. 7, n. 5, p. e01220-16, 6 set. 2016.

FELGNER, S. et al. The immunogenic potential of bacterial flagella for *Salmonella*-mediated tumor therapy. **International Journal of Cancer**, v. 147, n. 2, p. 448–460, 15 jul. 2020.

FRAHM, M. et al. Efficiency of Conditionally Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in Bacterium-Mediated Tumor Therapy. **mBio**, 14 abr. 2015.

GAO, S. et al. Development of Oxytolerant *Salmonella* typhimurium Using Radiation Mutation Technology (RMT) for Cancer Therapy. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 3764, 28 fev. 2020.

GNIADEK, T. J. et al. A Phase I, Dose Escalation, Single Dose Trial of Oral Attenuated *Salmonella* typhimurium Containing Human IL-2 in Patients With Metastatic Gastrointestinal Cancers. **Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)**, v. 43, n. 7, p. 217–221, set. 2020.

GOODMAN, S. D. et al. In Vitro Selection of Integration Host Factor Binding Sites. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 10, p. 3246–3255, maio 1999.

GRILLE, S. et al. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium immunotherapy for B-cell lymphoma induces broad anti-tumour immunity with therapeutic effect. **Immunology**, v. 143, n. 3, p. 428–437, nov. 2014.

HAYS, M. P. et al. Immunization With Skp Delivered on Outer Membrane Vesicles Protects Mice Against Enterotoxigenic *Escherichia coli* Challenge. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 132, 2018.

HEIMANN, D. M.; ROSENBERG, S. A. Continuous intravenous administration of live genetically modified *Salmonella* typhimurium in patients with metastatic melanoma. **Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)**, v. 26, n. 2, p. 179–180, abr. 2003.

HIRAKAWA, H. et al. Roles of the Tol-Pal system in the Type III secretion system and flagella-mediated virulence in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 15173, 23 set. 2020.

HIRSCH WERLE, C. et al. Antimelanoma effect of *Salmonella* Typhimurium integration host factor mutant in murine model. **Future Oncology (London, England)**, v. 12, n. 20, p. 2367–2378, out. 2016.

HITCHCOCK, P. J.; BROWN, T. M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Bacteriology**, v. 154, n. 1, p. 269–277, abr. 1983.

JARVIK, T. et al. Short-Term Signatures of Evolutionary Change in the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium 14028 Genome. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 2, p. 560–567, jan. 2010.

JIANG, L. et al. A bacterial extracellular vesicle-based intranasal vaccine against SARS-CoV-2 protects against disease and elicits neutralizing antibodies to wild-type and Delta variants. **bioRxiv: The Preprint Server for Biology**, p. 2021.06.28.450181, 1 fev. 2022.

JIANG, Y. et al. A Novel Cre Recombinase-Mediated In Vivo Minicircle DNA (CRIM) Vaccine Provides Partial Protection against Newcastle Disease Virus. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 85, n. 14, 15 jul. 2019.

K, K. et al. Whole-Genome Analysis Reveals That the Nucleoid Protein IHF Predominantly Binds to the Replication Origin *oriC* Specifically at the Time of Initiation. **Frontiers in microbiology**, v. 12, 8 dez. 2021.

KAIMALA, S. et al. *Salmonella*-mediated tumor regression involves targeting of tumor myeloid suppressor cells causing a shift to M1-like phenotype and reduction in suppressive capacity. **Cancer immunology, immunotherapy: CII**, v. 63, n. 6, p. 587–599, jun. 2014.

KAMRAN, N. et al. Melanoma induced immunosuppression is mediated by hematopoietic dysregulation. **Oncoimmunology**, v. 7, n. 3, p. e1408750, 2018.

KONG, W.; CLARK-CURTISS, J.; CURTISS, R. Utilizing *Salmonella* for antigen delivery: the aims and benefits of bacterial delivered vaccination. **Expert Review of Vaccines**, v. 12, n. 4, p. 345–347, abr. 2013.

LAHIRI, A. et al. TolA mediates the differential detergent resistance pattern between the *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhi and Typhimurium. **Microbiology (Reading, England)**, v. 157, n. Pt 5, p. 1402–1415, maio 2011.

LANIEWSKI, P. et al. Evaluation of protective efficacy of live attenuated *Salmonella enterica* serovar Gallinarum vaccine strains against fowl typhoid in chickens. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 21, n. 9, p. 1267–1276, set. 2014.

LEITE, B. et al. Integration host factor is important for biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 6, p. ftx074, 31 ago. 2017.

LI, C.-X. et al. “Obligate” anaerobic *Salmonella* strain YB1 suppresses liver tumor growth and metastasis in nude mice. **Oncology Letters**, v. 13, n. 1, p. 177–183, jan. 2017a.

LI, P. et al. Reversible synthesis of colanic acid and O-antigen polysaccharides in *Salmonella* Typhimurium enhances induction of cross-immune responses and provides protection against heterologous *Salmonella* challenge. **Vaccine**, v. 35, n. 21, p. 2862–2869, 15 maio 2017b.

LI, Q. et al. The role of TolA, TolB, and TolR in cell morphology, OMVs production, and virulence of *Salmonella* Choleraesuis. **AMB Express**, v. 12, n. 1, p. 5, 25 jan. 2022.

LI, Y.-A. et al. Live-attenuated *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis vaccine with regulated delayed fur mutation confer protection against *Streptococcus suis* in mice. **BMC veterinary research**, v. 16, n. 1, p. 129, 7 maio 2020.

MANGAN, M. W. et al. The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1831–1847, 2006.

MANSOURI, V. et al. Recent advances in regenerative medicine strategies for cancer treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 141, p. 111875, 1 set. 2021.

MARCHANT, P. et al. “One for All”: Functional Transfer of OMV-Mediated Polymyxin B Resistance From *Salmonella enterica* sv. Typhi Δ tolR and Δ degS to Susceptible Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 672467, 2021.

MATEOS-CHÁVEZ, A. A. et al. Live Attenuated *Salmonella enterica* Expressing and Releasing Cell-Permeable Bax BH3 Peptide Through the MisL Autotransporter System Elicits Antitumor Activity in a Murine Xenograft Model of Human B Non-hodgkin’s Lymphoma. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 2562, 2019.

MI, Z. et al. Salmonella-Mediated Cancer Therapy: An Innovative Therapeutic Strategy. **Journal of Cancer**, v. 10, n. 20, p. 4765–4776, 20 ago. 2019.

MIKKEL, K. et al. Integration Host Factor IHF facilitates homologous recombination and mutagenic processes in *Pseudomonas putida*. **DNA repair**, v. 85, p. 102745, jan. 2020.

MILANEZ, G. P. et al. HU-Lacking Mutants of *Salmonella enterica* Enteritidis Are Highly Attenuated and Can Induce Protection in Murine Model of Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1780, 2018.

MITRA, A. et al. A Live Oral Fowl Typhoid Vaccine with Reversible O-Antigen Production. **Avian Diseases**, v. 59, n. 1, p. 52–56, mar. 2015.

MIYAKE, K. et al. Tumor-targeting *Salmonella* typhimurium A1-R overcomes nab-paclitaxel resistance in a cervical cancer PDOX mouse model. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 299, n. 6, p. 1683–1690, jun. 2019.

MORGAN, J. K.; ORTIZ, J. A.; RIORDAN, J. T. The role for TolA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis and virulence gene transcription. **Microbial Pathogenesis**, v. 77, p. 42–52, dez. 2014.

NA, H. S. et al. Immune response induced by *Salmonella* typhimurium defective in ppGpp synthesis. **Vaccine**, v. 24, n. 12, p. 2027–2034, 15 mar. 2006.

NEMUNAITIS, J. et al. Pilot trial of genetically modified, attenuated *Salmonella* expressing the *E. coli* cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. **Cancer Gene Therapy**, v. 10, n. 10, p. 737–744, out. 2003.

NEVERMANN, J. et al. Identification of Genes Involved in Biogenesis of Outer Membrane Vesicles (OMVs) in *Salmonella enterica* Seroovar Typhi. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 104, 2019.

PASTOR, Y. et al. Towards a subunit vaccine from a *Shigella flexneri* Δ tolR mutant. **Vaccine**, v. 36, n. 49, p. 7509–7519, 26 nov. 2018.

PATERSON, G. K. et al. Deletion of *tolA* in *Salmonella* Typhimurium generates an attenuated strain with vaccine potential. **Microbiology (Reading, England)**, v. 155, n. Pt 1, p. 220–228, jan. 2009.

PÉREZ JORGE, G. et al. p53 gene delivery via a recombinant *Salmonella enterica* Typhimurium leads to human bladder carcinoma cell death in vitro. **Letters in Applied Microbiology**, 23 jun. 2022.

PERROTTA, C. et al. Nitric Oxide Generated by Tumor-Associated Macrophages Is Responsible for Cancer Resistance to Cisplatin and Correlated With Syntaxin 4 and Acid Sphingomyelinase Inhibition. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1186, 2018.

POZDEEV, G. et al. Reciprocally rewiring and repositioning the Integration Host Factor (IHF) subunit genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: impacts on physiology and virulence. **Microbial Genomics**, v. 8, n. 2, fev. 2022.

PRIETO, A. I. et al. Genomic analysis of DNA binding and gene regulation by homologous nucleoid-associated proteins IHF and HU in *Escherichia coli* K12. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 8, p. 3524–3537, abr. 2012.

REVERCHON, S. et al. The nucleoid-associated protein IHF acts as a “transcriptional domainin” protein coordinating the bacterial virulence traits with global transcription. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 2, p. 776–790, 25 jan. 2021.

ROGERS, A. W. L.; TSOLIS, R. M.; BÄUMLER, A. J. *Salmonella* versus the Microbiome. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 85, n. 1, p. e00027-19, 17 fev. 2021.

SANLIOGLU, A. D. et al. Fundamental principals of tumor necrosis factor-alpha gene therapy approach and implications for patients with lung carcinoma. **Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)**, v. 44, n. 2, p. 199–211, maio 2004.

SANTOS, T. M. A. et al. Polar localization of *Escherichia coli* chemoreceptors requires an intact Tol-Pal complex. **Molecular Microbiology**, v. 92, n. 5, p. 985–1004, jun. 2014.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SWINGER, K. K.; RICE, P. A. IHF and HU: flexible architects of bent DNA. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, n. 1, p. 28–35, fev. 2004.

TIBO, L. H. Imunomodulação intravesical com *Salmonella enterica* e violaceína para o tratamento do câncer de bexiga urinária não músculo (CBNMI). Campinas, SP: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 2019.

TOSO, J. F. et al. Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma. **Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 20, n. 1, p. 142–152, 1 jan. 2002.

TSAI, C. M.; FRASCH, C. E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 115–119, 1 jan. 1982.

VELMURUGU, Y. et al. Two-step interrogation then recognition of DNA binding site by Integration Host Factor: an architectural DNA-bending protein. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. 4, p. 1741–1755, 28 fev. 2018.

VENDRELL, A. et al. Therapeutic effects of *Salmonella typhi* in a mouse model of T-cell lymphoma. **Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)**, v. 36, n. 3, p. 171–180, abr. 2013.

YANG, M. et al. An obligatory anaerobic *Salmonella typhimurium* strain redirects M2 macrophages to the M1 phenotype. **Oncology Letters**, v. 15, n. 3, p. 3918–3922, mar. 2018.

ZAHAVI, D.; WEINER, L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. **Antibodies**, v. 9, n. 3, p. 34, 20 jul. 2020.

ZHAO, C. et al. Enhanced therapeutic effect of an antiangiogenesis peptide on lung cancer in vivo combined with *Salmonella* VNP20009 carrying a Sox2 shRNA construct. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 35, n. 1, p. 107, 2 jul. 2016.

ZHENG, J. H. et al. Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered *Salmonella typhimurium* secreting heterologous flagellin. **Science Translational Medicine**, v. 9, n. 376, p. eaak9537, 8 fev. 2017.

ZHI, Y. et al. Effective mucosal live attenuated *Salmonella* vaccine by deleting phosphotransferase system component genes ptsI and crr. **Journal of Microbiology (Seoul, Korea)**, v. 57, n. 1, p. 64–73, jan. 2019.

ZHOU, S. et al. Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 18, n. 12, p. 727–743, dez. 2018.

ZULIANELLO, L. et al. The HimA and HimD subunits of integration host factor can specifically bind to DNA as homodimers. **The EMBO journal**, v. 13, n. 7, p. 1534–1540, 1 abr. 1994.

CAPITULO III

Vesículas da membrana externa isoladas de *Salmonella enterica* Typhimurium carregadas com violaceína exercem atividade antineoplásica no melanoma

Capítulo III: Vesículas da membrana externa isoladas de *Salmonella enterica* Typhimurium carregadas com violaceína exercem atividade antineoplásica no melanoma

Resumo

A violaceína tem um amplo espectro de ações biológicas, incluindo atividade antitumoral, o que sugere uma futura aplicação clínica na terapia do câncer. Porém, um sistema eficiente é necessário para a aplicação biomédica desse composto antineoplásico e hidrofóbico na terapia do câncer. Estudos recentes mostraram que vesículas de membrana externa (OMVs) derivadas de bactérias podem ser usadas como nanocarregadores eficientes de drogas anticancerígenas. Neste estudo, foram isoladas e caracterizadas OMVs de *S. enterica* Typhimurium, e posteriormente as OMVs foram usadas no tratamento de melanoma murino. Uma dificuldade dos estudos com OMVs é o baixo rendimento de sua produção em linhagens selvagens sendo que, para contornar essa dificuldade, foram isoladas OMVs a partir de *S. enterica* Typhimurium $\Delta tolRA$, que tem fenótipo hipervesiculado. Essa cepa e a linhagem isogênica parental foram transformadas com o plasmídeo que carrega o operon para a síntese da violaceína. As OMVs *tolRAvio* (*tolRAvio*-OMV), mas não *tolRA*-OMV, diminuíram a viabilidade de células de melanoma *in vitro* e entregaram violaceína no citosol dessas células. Além disso, o tratamento de camundongos portadores de tumores B16F10 com *tolRAvio*-OMV e *tolRA*-OMV esteve associado a regressão tumoral, sendo que o tratamento com *tolRAvio*-OMV mostrou-se mais eficaz como agente antitumoral e na ativação da resposta imune, do que o tratamento com vesículas sem violaceína. Nossos resultados sugerem que a violaceína entregue pelas vesículas melhora a ativação imunitária e a eficácia terapêutica. A resposta antitumoral ativada pelas OMVs foi mediada pela infiltração de macrófagos no tecido tumoral e pela reprogramação do microambiente tumoral, caracterizadas pela polarização de macrófagos ao fenótipo M1 e a superexpressão de mRNA de citocinas e mediadores antitumorais. Nossos resultados sugerem que OMVs podem não apenas ser usadas como nanocarregadores de agentes antineoplásicos altamente hidrofóbicos, mas também podem induzir respostas antitumorais apropriadas para a eliminação de tumores.

Palavras-chave: vesículas de membrana externa, *Salmonella enterica* Typhimurium, antitumor, macrófagos, violaceína, nanocarregador, vetor de entrega.

III.1. Introdução

O melanoma é o tipo mais agressivo, grave e metastático de todos os cânceres de pele. A maioria das mortes por câncer de pele é atribuída ao melanoma (SUNG et al., 2021). As estatísticas globais de câncer de 2020 relataram 324.635 novos casos com mais de 57.000 mortes em todo o mundo (SUNG et al., 2021). O alto número de mortes por melanoma deve-se, em grande parte, à sua natureza altamente metastática (TASDOGAN et al., 2020). As opções atuais disponíveis de tratamento para o melanoma incluem ressecção cirúrgica do tumor e margens no local do tumor para os estágios iniciais, em combinação com quimioterapia ou radioterapia, e imunoterapia, especialmente para estágios metastáticos (LUKE et al., 2017; LEE; BRADY, 2021). Essas terapias melhoraram muito a sobrevida dos pacientes com melanoma e reduziram a taxa de mortalidade. No entanto, muitos pacientes apresentam resistência inerente a essas terapias ou tumores que reaparecem após a ressecção inicial e desenvolvem resistência adquirida devido à heterogeneidade genética dessa doença, o que leva ao aparecimento de subtipos de melanoma (ASCIERTO et al., 2019; BOLICK; GELLER, 2021; PATTON et al., 2021). Portanto, novas estratégias terapêuticas são urgentemente necessárias para o tratamento do melanoma.

As bactérias e seus derivados são uma rica fonte de potenciais drogas antitumorais. Já foi demonstrado, *in vivo* e *in vitro*, que derivados bacterianos, como metabólitos e vesículas de membrana externa (OMVs), têm um potencial considerável para o tratamento de diferentes tipos de câncer, incluindo o melanoma (BROMBERG et al., 2010; HASHIMI; XU; WEI, 2015; GONÇALVES et al., 2016; CHEN et al., 2020; ALY et al., 2021; KIM et al., 2021). A violaceína é um metabólito secundário hidrofóbico e de coloração roxa, produzido por diversas bactérias Gram-negativas filogeneticamente distintas (DURÁN; MENCK, 2001; PANTANELLA et al., 2007; YANG et al., 2007; YADA et al., 2008; HAKVÅG et al., 2009; ARANDA; MONTES-BORREGO; LANDA, 2011;). Esse pigmento de cor roxa é um alcaloide e um membro da família dos indocarbazoles, é formado por uma via sintética que envolve a dimerização oxidativa de duas moléculas de triptofano (FÜLLER et al., 2016). Cinco genes são responsáveis pela produção da violaceína, *vioA*, *vioB*, *vioC*, *vioD* e *vioE*, os quais são encontrados em um operon designado como *vioABCDE*; esses genes são transcritos na mesma direção (DURÁN et al., 2016). Os genes responsáveis da produção da violaceína tem sido superexpressos em algumas bactérias de interesse terapêutico, como *Escherichia coli* e *Salmonella enterica Typhimurium*, pela clonagem do operon *vioABCDE* (HASHIMI; XU; WEI, 2015). Uma ampla gama de atividades biológicas e

farmacológicas tem sido relatada para a violaceína (VERINAUD et al., 2015; BILSLAND et al., 2018; CAUZ et al., 2019), incluindo atividade anticancerígena (HASHIMI; XU; WEI, 2015).

Dentre todas as propriedades farmacológicas relatadas para a violaceína, sua atividade anticancerígena é a mais promissora (DURÁN et al., 2021; DAHLEM et al., 2022). A atividade citotóxica da violaceína foi demonstrada em concentrações nanomolares e micromolares em células de melanoma, leucemia, câncer de cólon, mama, cabeça e pescoço (FERREIRA et al., 2004; LEAL et al., 2015; VERINAUD et al., 2015; HASHIMI; XU; WEI, 2015; ALSHATWI; SUBASH-BABU; ANTONISAMY, 2016; GONÇALVES et al., 2016; KIM et al., 2021). A eficácia da violaceína também foi demonstrada *in vivo* em modelos murinos de ascite de Ehrlich e tumores de cabeça e pescoço (BROMBERG et al., 2010; HASHIMI; XU; WEI, 2015; MASUELLI et al., 2016). Embora o mecanismo pelo qual a violaceína exerce sua atividade anticancerígena não seja muito bem descrito, estudos anteriores indicam que ela induz a parada do ciclo celular e a apoptose através da regulação negativa de mdm2, AKT e ERK e regulação positiva de Bax, p53 e p21 (ALSHATWI; SUBASH-BABU; ANTONISAMY, 2016; KIM et al., 2021). Recentemente, foi demonstrado que a violaceína atua como imunoestimulante, ativando a via TLR, seguida de indução da expressão de TNF- α (VENEGAS et al., 2019). Apesar dos resultados promissores obtidos com a violaceína, sua aplicação terapêutica é limitada, em parte devido à sua alta hidrofobicidade (BERTI et al., 2019; DURÁN et al., 2021), o que dificulta a entrega dessa possível molécula anticancerígena.

Recentemente, as OMVs bacterianas foram propostas como nanocarregadores biológicos para a entrega de moléculas anticancerígenas (BERTI et al., 2019; LI et al., 2020). As OMVs são proteolipossomas esféricos de tamanho nanométrico (10-300 nm) secretados naturalmente por bactérias gram-negativas (MACDONALD; KUEHN, 2012). Todas as bactérias Gram-negativas secretaram OMVs durante todos os estágios de crescimento em uma ampla variedade de ambientes. Já foi sugerido que, em bactérias Gram-negativas, a produção de OMV é uma característica fundamental para seu crescimento e sua sobrevivência (MCBROOM et al., 2006; SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015). A produção de OMVs aumenta sob condições de estresse e com a interrupção ou a deleção de alguns genes, como reguladores transcricionais (*hns*) ou genes envolvidos na estabilidade da membrana (*ompA*, *tolA*, *tolB*, *tolR*) (DEATHERAGE et al., 2009; NEVERMANN et al., 2019). As OMVs são compostas por fosfolipídios, proteínas,

lipopolissacarídeos e ácidos nucleicos. Também foi relatado que elas transportam metabólitos e outras pequenas moléculas para se comunicarem com seu ambiente, com outras células bacterianas e eucarióticas (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015; BITTO et al., 2017 BATISTA et al., 2020). Isso as torna ferramentas valiosas para a entrega de moléculas terapêuticas.

Além de serem úteis como sistema de entrega, as OMVs podem estimular o sistema imunológico (ALY et al., 2021), pois são constituídas por componentes da membrana externa de suas bactérias parentais (SCHWECHHEIMER; KUEHN, 2015), o que permite que sejam usadas como um sistema de entrega de moléculas anticancerígenas e como imunoterapêuticos contra o câncer. Recentemente, as OMVs carregadas de ligantes indutoras de apoptose relacionadas ao fator de necrose tumoral humano mostraram-se eficientes em retardar a progressão, a recidiva e a metástase de melanoma cutâneo em um modelo murino (PENG et al., 2020). Da mesma forma, as OMVs foram eficientes na entrega de doxorrubicina em células tumorais e na inibição do crescimento tumoral em camundongos portadores de tumor A549 (KUERBAN et al., 2020). Esses e outros relatos apontam para o potencial das OMVs como sistema de entrega de moléculas anticancerígenas e como imunoterapia para o tratamento de diferentes tipos de câncer, incluindo o melanoma.

Neste estudo, utilizamos o mutante atenuado de *S. enterica* Typhimurium $\Delta tolRA$ para preparar OMVs carregadas de violaceína. O efeito citotóxico das OMVs carregadas com violaceína foi analisado em culturas 2D e 3D e comparado com OMVs sem violaceína. A segurança do tratamento com OMVs também foi investigada em camundongos. Finalmente, o efeito anticancerígeno de OMVs e a resposta imune foram avaliados em modelo murino de melanoma. Nossos dados sugerem que OMVs carregadas com violaceína podem entregar violaceína de forma eficiente no interior de células tumorais e induzir uma resposta imune antitumoral apropriada para a regressão total de melanoma.

III.2. Materiais e métodos

III.2.1. Cepas bacterianas, plasmídeos e condições de crescimento

Neste trabalho, foram utilizados *S. Typhimurium* ATCC 14028 (JARVIK et al., 2010) e o duplo mutante hipervesiculado $\Delta tolRA$, construído conforme descrito no capítulo anterior. As duas cepas bacterianas foram transformadas por eletroporação com o plasmídeo pBAT_vioABCDE, resultando nas cepas 14028 pBAT_vioABCDE e 14028 $\Delta tolRA$ pBAT_vioABCDE, respectivamente. As bactérias utilizadas neste estudo foram cultivadas aerobiamente a 37° C em

meio LB e LB-ágar. Quando apropriado, a ampicilina foi usada na concentração de 100 µg/mL ou a canamicina na concentração de 50 µg/mL.

III.2.2. Crescimento *in vitro* de cepas bacterianas

O crescimento *in vitro* das cepas bacterianas recombinantes foi analisado em caldo LB conforme descrito anteriormente (PÉREZ JORGE et al., 2022). Em breve, as cepas foram semeadas em LB ágar e incubadas a 37 °C por 16 horas. Uma única colônia foi incubada em caldo LB por 16 horas a 37 °C e agitação constante a 150 rpm. No dia seguinte, as culturas foram diluídas 1:100 em meio LB previamente aquecido a 37 °C e incubadas nas mesmas condições mencionadas. O crescimento bacteriano foi monitorado por 12 horas por meio da coleta de alíquotas para medição da DO ($\lambda 600$) e determinação de UFC por diluições seriadas e pela técnica de microgotas em placas de LB ágar. Foram realizados três experimentos independentes.

III.2.3. Isolamento de OMVs

OMVs de *S. Typhimurium* 14028, *S. Typhimurium* 14028 $\Delta tolRA$, *S. Typhimurium* 14028 pBAT_vioABCDE e 14028 $\Delta tolRA$ pBAT_vioABCDE foram isoladas conforme descrito anteriormente (CHUTKAN et al., 2013). Resumidamente, bactérias cultivadas por 16 horas foram diluídas (1:100) em caldo LB fresco e incubadas até a fase exponencial ($OD_{600} = 0,6$). Posteriormente, a expressão de violaceína foi induzida com IPTG na concentração final de 1 mM, e as culturas foram incubadas por 16 horas. Um mililitro dessas culturas foi separado para contagem de UFC. As culturas foram centrifugadas a 4° C e 5000×g por 45 min. Os sobrenadantes foram filtrados em filtro de 0,22 µm e concentrados utilizando membranas de ultrafiltração de 100 KDa (Millipore Amicon, Billerica, MA, EUA). Os sobrenadantes foram então centrifugados a 13000×g por 15 min a 4 °C e passados novamente por filtro de 0,22 µm. Posteriormente os sobrenadantes foram ultracentrifugados a 4° C e 60.000 rpm (ultracentrífuga Beckman Coulter Optima L-90K) por 90 min. As amostras de OMVs purificadas foram ressuspensas em PBS 1X, filtradas novamente em filtro de 0,22 µm, alíquotadas e armazenadas a -80° C até o uso. A concentração de OMVs com base na proteína total foi determinada pelo método de Bradford. As OMVs isoladas foram nomeadas da seguinte forma: OMVs isolados de *S. Typhimurium* 14028: ST-OMV; OMVs isolados de *S. Typhimurium* 14028 $\Delta tolRA$: *tolRA*-OMV; OMVs isolados de *S. Typhimurium* 14028 pBAT_vioABCDE: STvio-OMV; e OMVs isolados de 14028 $\Delta tolRA$ pBAT_vioABCDE: *tolRA*vio-OMV.

III.2.4. Caracterização de OMVs

III.2.4.1. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (do inglês: Nanoparticle-Tracking Analysis - NTA)

O tamanho, a distribuição e a quantificação de números de partículas das preparações de OMV foram medidos por NTA usando o equipamento NanoSight NS300 (Malvern Instruments, Malvern, UK). As amostras OMV foram diluídas em PBS 1X e injetadas no NanoSight para captura rápida de vídeo. O foco, a câmera e o brilho foram definidos para tornar as partículas visíveis. Em seguida, vídeos de 60 segundos foram capturados em triplicata e analisados usando o software NanoSight (versão 3.2.16).

III.2.4.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (do inglês: Transmission electron microscopy - TEM)

Para imagens de TEM, 20 µL de amostra de OMVs foram colocados em uma grade de cobre e corados com acetato de uranila 2% em tampão maleato por 4 min. Após a grade seca, as OMVs foram visualizadas usando o microscópio eletrônico de transmissão Zeiss (LEO-906) com 60 kV como tensão de aceleração.

III.2.4.3. Detecção e quantificação da violaceína presente em OMVs por HPLC

A violaceína foi purificada conforme descrito previamente (BATISTA et al., 2020; SASIDHARAN et al., 2015). As OMVs foram isoladas seguindo a metodologia descrita acima. A violaceína foi extraída duas vezes das OMVs com acetato de etila (durante a noite). A violaceína bruta extraída com acetato de etila foi ainda analisada em HPLC analítico (Shimadzu Prominence, equipado com um detector de arranjo de diodos SPD-M20A DAD associado a um detector de dispersão de luz evaporativo ELSD-LT II, uma bomba de solvente LC-20 AD, um CBM-controlador de sistema 20A, um forno de coluna CTO-20A, um injetor SIL-20A e um amostrador automático SIL-20A), usando uma coluna C18 de fase reversa (Ascentis, C18, 2,7µm, 100 x 4,6 mm) e o software LabSolution. O gradiente foi composto por ACN:H₂O a um fluxo de 1 ml min⁻¹. Violaceína (Sigma-Aldrich, USA) foi usada como padrão. Foram realizados três experimentos independentes.

III.2.5. Linhagem de células cancerígenas

A linhagem celular de melanoma murino B16F10 foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle high glucose (DMEM, Sigma-Aldrich, USA) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, BR) (v/v), penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) (Sigma-

Aldrich, USA) a 37 °C em ar umidificado com 5% de CO₂. As células foram subcultivadas com tripsina 0.1% (Sigma-Aldrich, USA) a cada dois ou três dias.

III.2.5.1. Teste de viabilidade celular e determinação da concentração inibitória 50% de OMVs em cultura 2D

O ensaio de citotoxicidade foi determinado por MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] – Sigma-Aldrich, USA) para avaliar a redução de sais de tetrazólio a cristais de formazan) (MOSMANN, 1983). Resumidamente, as células foram semeadas em uma placa de 96 poços (1×10⁴ células/poço) e cultivadas durante a noite para adesão das células. As OMVs (ST-OMV, *tolRA*-OMV, STvio-OMV, *tolRA*vio-OMV) foram diluídas em meio sem soro e sem antibióticos. Em seguida, as células foram tratadas com OMVs diluídas por 24 horas usando diluição em série, começando com 2.036×10¹⁰ partículas/mL, e a curva SDS (150 µg/mL) foi usada como controle de morte. Ambos os fatores de diluição foram realizados duas vezes em sextuplicata. Para comparação com a literatura e com STvio-OMV e *tolRA*vio-OMV (que carregam violaceína), utilizou-se violaceína (Sigma-Aldrich, USA) como curva padrão. Em seguida, o meio foi substituído por solução de MTT (1 mg/mL) por 4 horas. Após isso, o meio foi removido, e 200 µL de isopropanol acidificado (HCl 0,04 M) foram adicionados. A placa foi homogeneizada por 20 minutos, e a absorbância foi medida em um leitor de microplacas Enspire (Perkin Elmer, USA) a 570 nm. A porcentagem de células viáveis foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$(\%) = [100 \times (\text{absorbância da amostras})/(\text{absorbância do controle})]$$

Os dados de viabilidade celular foram determinados por três experimentos independentes (n = 3) e os valores foram normalizados para controle não tratado.

III.2.5.2. Microscopia de células B16F10 tratadas com OMVs

O efeito de OMVs em células B16F10 também foi examinado por microscopia. Um total de 1×10⁵ células foi plaqueado em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro redondas de 13 mm de diâmetro, sendo as células mantidas por 18 horas sob condições de cultura apropriadas. 5×10⁹ partículas/ml de OMV foram então adicionadas a cada poço por 24 horas a 37° C e 5% de CO₂. Três poços foram usados para cada um dos tipos de OMVs. As células não tratadas foram usadas como um controle de células saudáveis. Após o tratamento, as células B16F10 foram fixadas com metanol (Synth 99,8%) por 30 min, lavadas com PBS 1X e coradas com Giemsa (Fluka analítico) em tampão de KH₂PO₄ 0,07 e 0,07 M Na₂HPO₄. As lamínulas de vidro circulares

contendo as células foram montadas em lâminas de vidro e examinadas microscopicamente. O experimento foi realizado em triplicata e em dois experimentos independentes.

III.2.5.3. Modelo tridimensional de toxicidade

A citotoxicidade das vesículas também foi testada em modelo tridimensional de células B16F10. Para evitar a adesão celular na superfície dos poços e induzir a agregação celular, semeamos 2×10^4 células/poço em placas de 96 poços em forma de U (Greiner Bio-One, Áustria), que foram previamente revestidas com poli (2-hidroxietil metacrilato) [(poli- (HEMA), Sigma-Aldrich, EUA)]. Após 72 horas, os agregados celulares foram expostos a três concentrações de OMVs, sendo a maior concentração de $2,036 \times 10^{10}$ OMVs/ml por 24 horas. Avaliamos a viabilidade do agregado após a exposição das OMVs utilizando o kit CellTiterGlo 3D (Promega, EUA). Esse kit é baseado na reação do ATP de células viáveis (lisadas) com luciferina e luciferase, gerando um sinal luminescente. O leitor luminescente foi realizado no CLAROnote Plus (BMG Labtech, Alemanha).

III.2.3.6. Microscopia de fluorescência

A violaceína é um pigmento roxo e fluorescente que pode ser detectado quando excitado em 570 nm e emite em 675 nm. Células B16F10 foram semeadas em uma placa de 96 poços (1×10^4 células/poço) e cultivadas durante a noite para adesão das células. No dia seguinte, as células foram tratadas com diluições seriadas de OMVs e incubadas por 4 horas. Analisamos as placas celulares no High-Content Analysis Operetta™ 3.5 (Perkin Elmer, EUA), aumento de 20×. Além disso, no ensaio de toxicidade 3D após 24 horas, também analisamos as placas de células agregadas no mesmo microscópio, com aumento de 2× e 10×.

III.2.3.7. Quantificação de violaceína por densidade óptica

Com base nos espectros de absorção da violaceína, medimos a densidade óptica das vesículas com violaceína e comparamos com a absorbância de uma concentração conhecida de violaceína diluída em água. Lemos a 570 nm em um leitor de placas Enspire (Perkin Elmer, EUA). Além disso, com base na concentração de violaceína nas OMVs obtida anteriormente por HPLC, também calculamos a concentração presente na IC50 obtida no ensaio de citotoxicidade.

III.2.6. Camundongos

Os camundongos C57BL/6JUnib (fêmea, 6-8 semanas) foram adquiridos do Centro Multidisciplinar de Pesquisa Biológica (CEMIB – UNICAMP). Esses camundongos foram mantidos em mini-isoladores ventilados (ALESCO, São Paulo, Brasil), sob condições específicas

livres de patógenos e condições laboratoriais padrão de $24 \pm 2^\circ \text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 h e umidade relativa de $50 \pm 10 \%$. Os animais tiveram acesso à água e à dieta sólida *ad libitum* (Nuvilab, Colombo, PR, Brasil). Todos os camundongos foram mantidos duas semanas para serem aclimatados em nosso laboratório antes do início do experimento. Este estudo foi realizado seguindo o Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual de Campinas (protocolo nº 5769-1/2021, 5820-1/2021 e 5895-1/2021).

III.2.6.1. Avaliação da segurança dos tratamentos com OMVs

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em 7 grupos (de 5 camundongos cada). O Grupo I representou o controle de PBS, incluiu camundongos que foram injetados subcutaneamente (sc) com 60 μL de PBS 1X duas vezes por semana durante 2 semanas. O Grupo II incluiu camundongos que foram injetados sc com 2×10^{10} partículas de *tolRA*-OMV duas vezes por semana durante 2 semanas. O Grupo III incluiu camundongos que foram injetados sc com 1×10^{10} partículas de *tolRA*-OMV duas vezes por semana durante 2 semanas. O Grupo IV incluiu camundongos que foram injetados sc com 5×10^9 partículas de *tolRA*-OMV duas vezes por semana durante 2 semanas. O Grupo V incluiu camundongos que foram injetados sc com 2×10^{10} partículas de *tolRAvio*-OMV duas vezes por semana durante 2 semanas. O Grupo VI incluiu camundongos que foram injetados sc com 1×10^{10} partículas de *tolRAvio*-OMV duas vezes por semana durante 2 semanas e o Grupo VI incluiu camundongos que foram injetados sc com 5×10^9 partículas de *tolRAvio*-OMV nas mesmas doses mencionadas anteriormente. Todos os camundongos foram pesados três vezes por semana ao longo do período experimental e observados durante todo o aparecimento de quaisquer sinais de doença, como secreção ocular, diarreia, dor, piloereção ou letargia. Os animais foram sacrificados uma semana após a última dose para injeção intraperitoneal de 5 mg/kg de xilazina e 40 mg/kg de cetamina, seguido de deslocamento cervical. Fígados e baços foram coletados e pesados. O experimento foi realizado duas vezes.

III.2.6.2. Avaliações do efeito antitumoral

Camundongos C57BL/6JUnib foram inoculados por via sc com células tumorais B16F10 (3×10^6) no flanco direito. Quando o tamanho do tumor médio atingiu $\sim 100 \text{ mm}$ de diâmetro, os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (sete camundongos/grupo) e tratados da seguinte forma: controle de PBS, violaceína (na mesma quantidade presente nas OMVs) como controle, 5×10^9 partículas de *tolRA*-OMV e 5×10^9 partículas de *tolRAvio*-OMV. Os tratamentos foram administrados por via intratumoral duas vezes por semana durante 2 semanas

em um volume de 60 μL . Durante o tratamento, o tumor foi medido usando um paquímetro, e o volume do tumor em mm^3 foi calculado usando a fórmula: volume do tumor = (largura) $2 \times$ (comprimento) $\times 1/2$. O peso e o volume do tumor foram medidos a cada dois dias até o final do experimento. Ao final do tratamento, fígado e baço foram extraídos e pesados. Amostras de sangue também foram coletadas para a detecção de citocinas. O experimento foi repetido duas vezes.

III.2.6.3. Análise da resposta antitumoral

Camundongos C57BL/6JUnib foram utilizados para pesquisar a resposta imune antitumoral mediada por *tol*/RA-OMV e *tol*/RAvio-OMV. Quando os tumores atingiram $\sim 100 \text{ mm}^3$, os camundongos foram inoculados por via intratumoral com 5×10^9 partículas, violaceína (na mesma quantidade presente nas OMVs) ou PBS. Quatro dias depois da primeira inoculação, os camundongos foram inoculados pela segunda vez com as mesmas condições da primeira inoculação. Após 4 horas da segunda inoculação, os animais foram eutanasiados, e o sangue foi coletado. A massa tumoral também foi extraída e dividida em duas partes. Uma das partes foi utilizada para análise de macrófagos por citometria de fluxo. A partir da outra parte da massa tumoral, foi extraído RNA para análise da expressão de genes associados com a resposta antitumoral.

III.2.6.4. Citometria de fluxo

A massa tumoral foi coletada e lavada com PBS gelado. A partir da massa tumoral coletada, foi preparada a suspensão de células isoladas. A massa tumoral foi cortada em pequenos pedaços e macerada em 1% de BSA em PBS, seguido de passagem por filtro de células com poros de 70 μM . A suspensão de células isoladas foi incubada por 20 minutos a 4° C na escuridão com anticorpos (CD11b-Percp, F4/80-Fitc, CD80-Pe e CD206-APC (Elabscience. Houston, USA)). As células marcadas com anticorpos foram lavadas com 1% de BSA em PBS e centrifugadas a 400 g, 4° C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células foram então resuspensas em solução de paraformaldeído 2% e incubadas por 20 minutos a 4° C na escuridão. Os dados foram adquiridos no citometro de fluxo NovoCyte, a partir da contagem de 50.000 eventos. A análise dos dados foi feita no software NovoExpress 1.5.0.

III.2.6.5. RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)

A massa tumoral foi macerada em nitrogênio líquido, imediatamente o RNA total foi extraído, usando o kit *Direct-zol RNA MiniPrep Plus* (Zymo Research. Irvine, CA, USA) e *Trizol reagente* (Invitrogen, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A partir de gel de

agarose a 1% e coloração com brometo de etídeo, verificamos a integridade das amostras de RNA. A concentração e a pureza do ARN foram analisadas em NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, USA). 1,5 µg de RNA de cada amostra foram tratados com *DNase I Amplification grade* (Sigma-Aldrich, Louis, MO, USA). Além disso, fizemos PCR de todas as amostras tratadas com *DNase I* para garantir que nossas amostras não estivessem contaminadas com DNA genômico. A transcrição reversa foi realizada usando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, USA), de acordo as instruções do fabricante. O cDNA foi diluído 1:10, e o kit *2x qPCRBio SyGreen Mix Separate-Rox* (PCRBIOSYSTEMS, Wayne, Pennsylvania, USA) foi usado de acordo as recomendações do fabricante, usando o equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, USA) e os primers citados no capítulo II. A partir da curva de dissociação, verificamos a especificidade e a qualidade dos primers. Nossos dados foram normalizados pela expressão dos genes β -actina e GAPDH. O nível de expressão de cada um dos genes foi analisado pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

III.2.7. Análises estatísticas

Os dados são representados como a média $\pm$ Desvio Padrão da média. ANOVA de uma via, seguido do teste de Dunnett ou Tukey, foi usado para comparações multiplex. Para o ensaio de intensidade relativa da violaceína, primeiramente normalizamos os dados pela média da fluorescência no grupo STvio-OMV. Em seguida, as diferenças foram testadas por um teste de Mann-Whitney bicaudal. Todos os testes estatísticos foram realizados usando o programa *GraphPad Prism version 8.0.1* para Windows (GraphPad, San Diego, CA, USA) com um nível de significância de 95% ($p < 0.05$).

III.3. Resultados

III.3.1. Caracterização de OMVs: Deleção dos genes *tolR* e *tolA* aumenta significativamente a produção de OMVs

Neste estudo, OMVs foram preparadas de um mutante hipervesiculado e atenuado de *S. enterica* Typhimurium 14028 $\Delta tolRA$ por meio de várias etapas de centrifugação, ultrafiltração e ultracentrifugação. *S. enterica* Typhimurium 14028 $\Delta tolRA$ e *S. Typhimurium* 14028 foram transformados com o plasmídeo pBAT_vioABCDE. Após 24 h, observamos colônias roxas nas duas linhagens; no entanto, a intensidade de coloração das colônias nas duas linhagens foi diferente (Figura III.1.A). As colônias de *S. Typhimurium* 14028 pBAT_vioABCDE eram roxas intensas, enquanto as colônias de *S. Typhimurium* 14028 $\Delta tolRA$ pBAT_vioABCDE eram roxas claras. Para investigar o efeito da produção de violaceína em *S. enterica* Typhimurium, o crescimento *in vitro*

das linhagens *S. enterica* Typhimurium 14028, *S. enterica* Typhimurium 14028 pBAT_vioABCDE, *S. enterica* Typhimurium 14028 $\Delta tolRA$ e *S. enterica* Typhimurium 14028 $\Delta tolRA$ pBAT_vioABCDE foram comparados

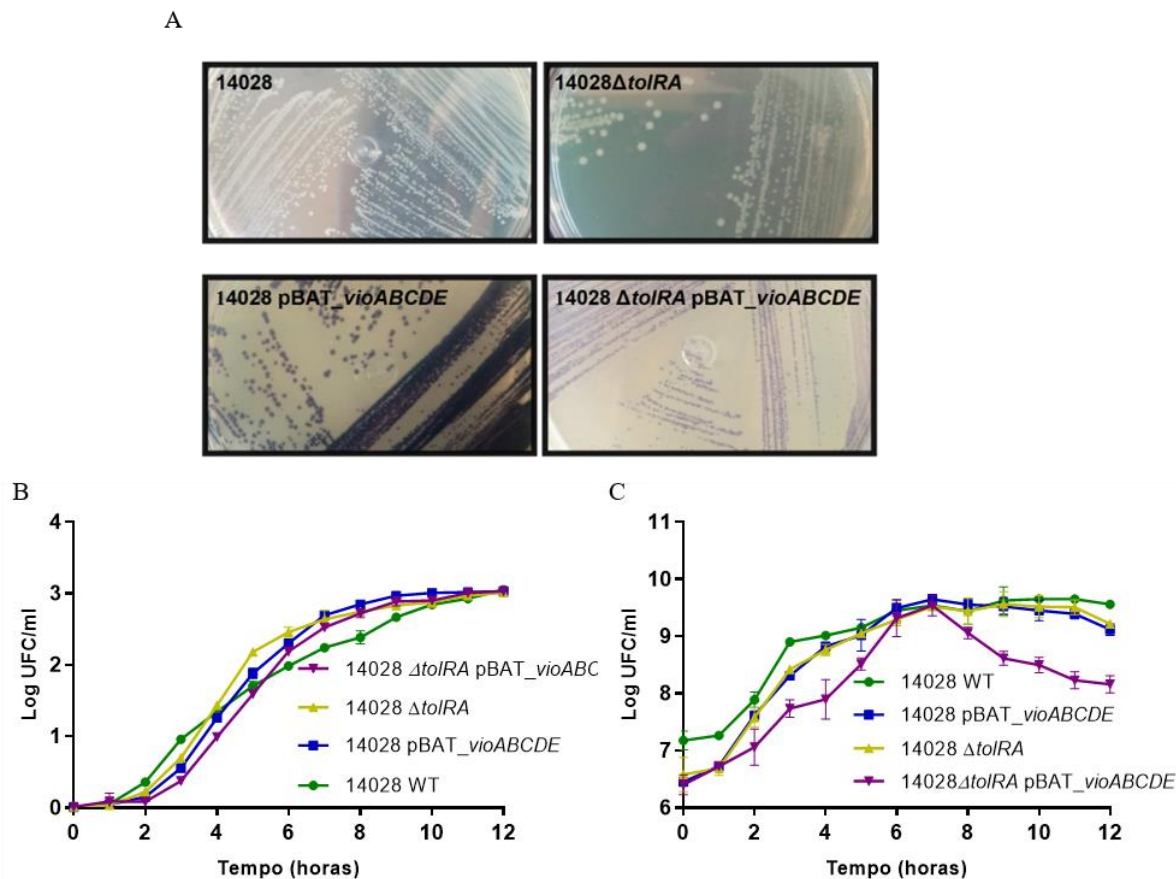


Figura III.1. Transformação de cepas bacterianas com plasmídio pBAT_vioABCDE contendo o operon da violaceína. (A) crescimento de mutantes *S. enterica* Typhimurium 14028 $\Delta tolRA$ e *S. enterica* Typhimurium 14028 $\Delta tolRA$ pBAT_vioABCDE após 24 horas em placas de LB ágar e comparação com a cepa parental. As colônias da cepa *S. enterica* Typhimurium 14028 pBAT_vioABCDE apresentam coloração púrpura escura, enquanto *S. enterica* Typhimurium 14028 $\Delta tolRA$ pBAT_vioABCDE apresenta coloração púrpura clara. O crescimento bacteriano foi monitorado por 12 horas a partir da medição da DO (λ 600 nm) (B) e contagem de UFC (C).

O crescimento das quatro cepas foi monitorado por 12 horas, por medidas de DO_{600nm} e determinação da UFC em placas de LB ágar (Figura III.1.B-C). *S. Typhimurium* 14028 $\Delta tolRA$ exibiu um tempo de duplicação ligeiramente maior que a cepa *S. Typhimurium* 14028 selvagem. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre as cepas em quaisquer fases de crescimento. Por sua vez, a cepa *S. enterica* Typhimurium 14028 $\Delta tolRA$ pBAT_vioABCDE

apresentou um tempo de duplicação maior que a cepa *S. Typhimurium* 14028 pBAT_vioABCDE ao longo do tempo analisado, apresentando diferenças significativas na fase estacionária.

Para quantificar a produção de OMVs das quatro cepas, analisamos OMVs isoladas de culturas LB coletadas na fase estacionária (após 20 horas de crescimento, OD₆₀₀ ~ 5), por NTA e quantificação do conteúdo total de proteína pelo método de Bradford (Figura III.2). Nossos resultados revelaram que a deleção dos genes *tolR* e *tolA* aumenta significativamente a produção de OMVs em *S. Typhimurium* 14028, assim como a concentração de proteínas das vesículas (Figura III.2.A-B). A maior produção de OMVs e a maior concentração de proteína foram obtidas de *tolRA*-OMV, enquanto a menor produção de OMVs foi obtida de ST-OMV (Figura III.2.A-B). Também observamos que, quando *S. enterica* Typhimurium 14028 Δ *tolRA* é transformada com pBAT_vioABCDE, a produção de OMVs é diminuída, provavelmente pela carga metabólica da produção de violaceína no mutante. Nossos dados mostraram que a partir de um litro de meio de cultivo de *S. enterica* Typhimurium 14028 Δ *tolRA* ou *S. enterica* Typhimurium 14028 Δ *tolRA* pBAT_vioABCDE é possível obter de seis a oito vezes mais concentração de proteínas das vesículas que de *S. enterica* Typhimurium 14028 ou *S. enterica* Typhimurium 14028 pBAT_vioABCDE. O rendimento para cada cepa analisada por litro de meio de cultivo foi: *S. enterica* Typhimurium 14028: 192 mg, *S. enterica* Typhimurium 14028 pBAT_vioABCDE: 203 mg, *S. enterica* Typhimurium 14028 Δ *tolRA*: 1633 mg e *S. enterica* Typhimurium 14028 Δ *tolRA* pBAT_vioABCDE: 1389 mg. Curiosamente, as amostras de STvio-OMV e o *tolRA*vio-OMV estavam roxos escuros, sugerindo que as OMVs estavam carregadas com violaceína (dados não mostrados).

As medidas de NTA não mostraram diferenças significativas entre os diâmetros médios das OMVs isoladas das quatro cepas (Figura III.2.C). No entanto, os valores de índice de polidispersidade de *tolRA*-OMV e *tolRA*vio-OMV foram 0,81 e 0,76, respectivamente (Figura III.2.D), caracterizando uma distribuição monodispersa; enquanto os valores de índice de polidispersidade de ST-OMV e STvio-OMV foram maiores que 1, caracterizando uma distribuição polidispersa (Figura III.2.E e Figura suplementar III.1). Nossos resultados revelaram maior número de OMVs nas amostras isoladas de mutantes Δ *tolRA*, e a normalização de OMVs pela contagem de UFC confirmou maior produção estatisticamente significativa de OMVs por bactéria (Figura III.2.D).

As preparações de OMVs foram avaliadas por coloração negativa em TEM (Figura III.3.A). A visualização por TEM mostrou partículas esféricas muito semelhantes entre as 4 preparações de OMVs; entretanto, observou-se coloração escura nas STvio-OMV e nas *tolRA*vio-OMV. A micrografia eletrônica mostra que as ST-OMVs variaram em tamanho de aproximadamente 57 a 220 nm de diâmetro, enquanto nas STvio-OMV o diâmetro variou de 24 a 166 nm. O tamanho do diâmetro *tolRA*-OMV variou de 35 a 149 nm em *tolRA*-OMV e para *tolRA*vio-OMV variou de 27 a 93 nm. Além disso, *tolRA*-OMV e *tolRA*vio-OMV apresentaram menor variabilidade de tamanho, resultados consistentes com os valores do índice de polidispersidade calculados com os dados de NTA (Figura II.E).

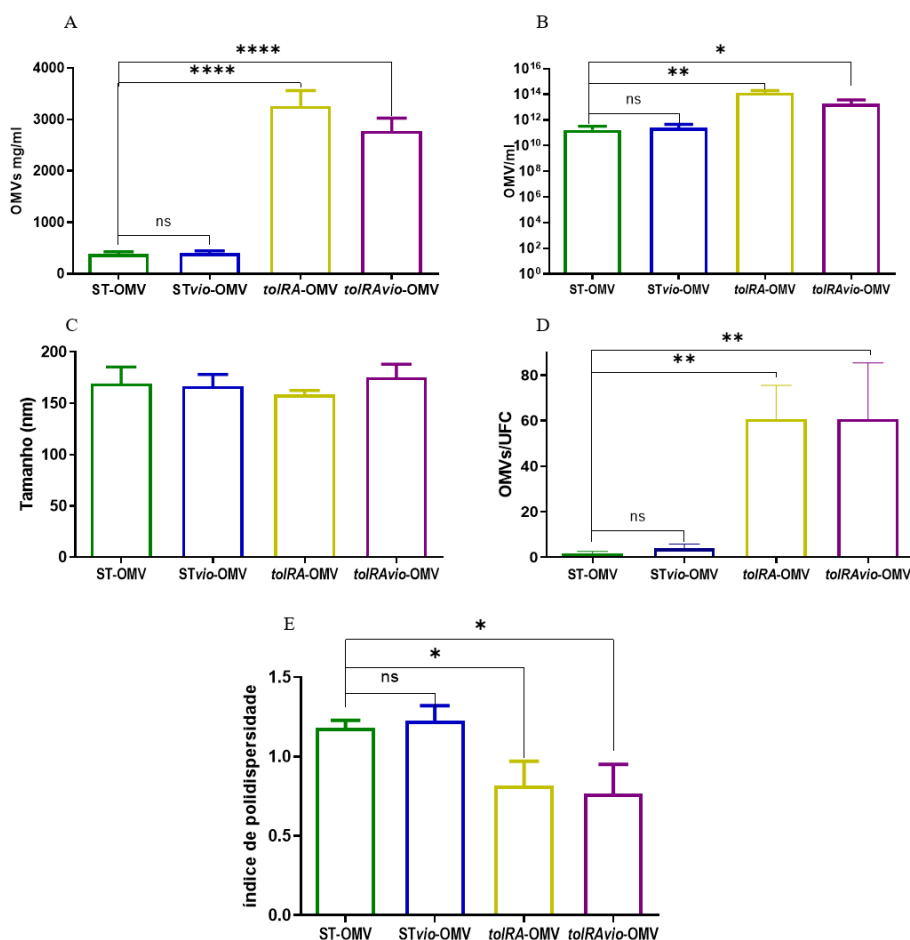


Figura III.2. Caracterização de OMVs isoladas de *S. enterica* Typhimurium por quantificação do conteúdo de proteínas e por NTA. OMVs foram isoladas de culturas de fase exponencial em caldo LB. A. quantidade de proteínas presentes nas amostras de OMVs. (B) OMVs quantificadas por

NTA. A deleção dos genes *tolR* e *tolA* em *S. enterica* Typhimurium 14028 aumenta a produção de OMVs e o conteúdo total de proteína. C. Diâmetros médios das OMVs medidos por NTA. D. relação de OMVs produzidas por UFC. E. Índice de polidispersidade das OMVs. Amostras com valores de Span menores que um são caracterizadas como monodispersas, enquanto amostras com valores maiores que um são caracterizadas como polidispersas. Os dados são representados como a média $\pm$ SD (n=4 réplicas biológicas). Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$.

Estudos anteriores mostraram que OMVs podem carregar compostos hidrofóbicos, e recentemente foi demonstrado que OMVs isoladas de *Chromobacterium violaceum* carregam violaceína e medeiam sua entrega ao ambiente extracelular (BATISTA et al., 2020; BRAMEYER et al., 2018). Com base nesses achados, na coloração roxa observada nas preparações de STvio-OMV e *tolRAvio*-OMV e na coloração escura observada na TEM, levantamos a hipótese de que STvio-OMV e *tolRAvio*-OMV poderiam estar carregadas com violaceína. Para testar nossa hipótese, analisamos a presença de violaceína nas quatro preparações de OMV por análise de HPLC (Figura III.3.B). As análises por HPLC foram feitas em colaboração com o Laboratório de Química de Micro-organismos da faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Detectamos violaceína em STvio-OMV e *tolRAvio*-OMV, mas não em ST-OMV e *tolRA*-OMV. Além disso, calculamos o teor relativo de violaceína nas amostras e achamos que as amostras de *tolRAvio*-OMV tinham quatro vezes mais violaceína que STvio-OMV.

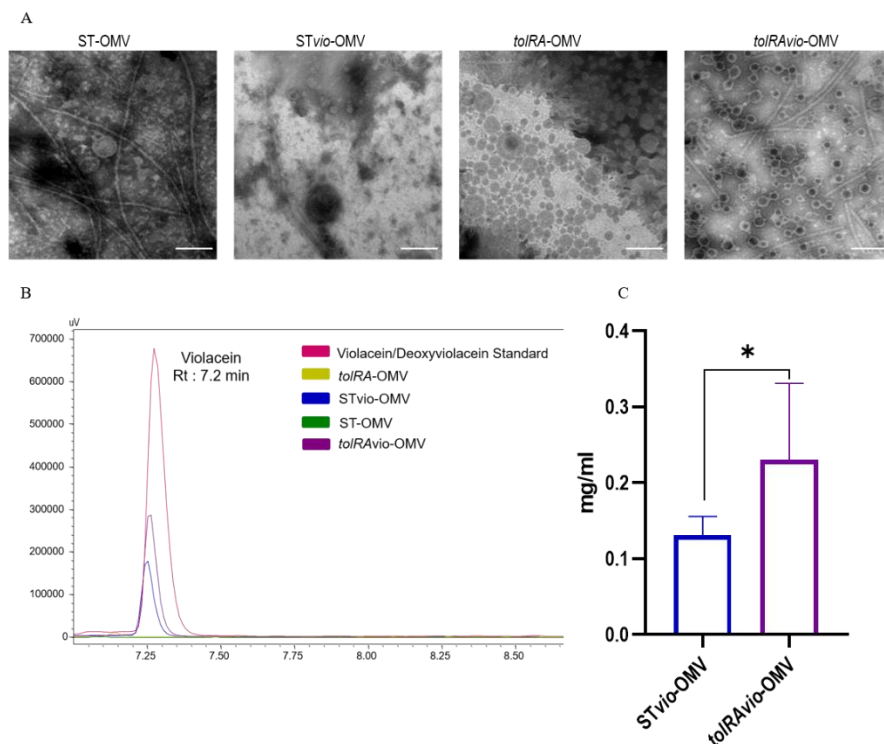


Figura III.3. Caracterização de OMVs isoladas de *S. enterica* Typhimurium por TEM e HPLC. A. Imagens de TEM. Barra de escala = 200 nm. B. Detecção de violaceína em OMVs a partir de HPLC. C. Quantificação de violaceína presente em OMVs (n= 3 réplicas biológicas). A significância estatística foi calculada por teste t Student. * $p < 0,05$.

III.3.2. Efeito citotóxico de OMVs *in vitro*

Para avaliar a eficácia antitumoral de OMVs *in vitro*, tratamos células B16F10 com OMVs em diferentes doses por 24 horas, e a viabilidade foi analisada pelo ensaio MTT (Figura III.4). Os dados do efeito citotóxico de OMVs *in vitro* foram obtidos em colaboração com o Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). Observamos que os controles SDS e Violaceína foram citotóxicos, e a violaceína apresentou IC_{50} de $1,55 \mu M$ (Figura III.4.A-D). ST-OMV e tolRA-OMV não foram citotóxicos para B16-F10 nas concentrações estudadas (Figura III.4.B-C), o que significa que as vesículas vazias não são prejudiciais a esse tipo de células. Como esperado, STvio-OMV e tolRAvio-OMV apresentaram citotoxicidade (IC_{50} : $4,28 \times 10^9$ partículas/ml e $9,30 \times 10^8$ partículas/ml, respectivamente). O IC_{50} de tolRAvio-OMV foi significativamente menor ($p = 0,0008$) quando comparado com o IC_{50} de STvio-OMV, sugerindo maior quantidade de violaceína no interior das vesículas (Figura III.4.E-F). Além do ensaio de MTT, a citotoxicidade *in vitro* de tolRAvio-OMV e STvio-OMV foi verificada por microscopia e coloração de Giemsa. Nas células

tratadas com 5×10^9 partículas/ml de *tolRAvio*-OMV ou *STvio*-OMV, observamos diminuição da viabilidade e alterações morfológicas (Figura III.5.).

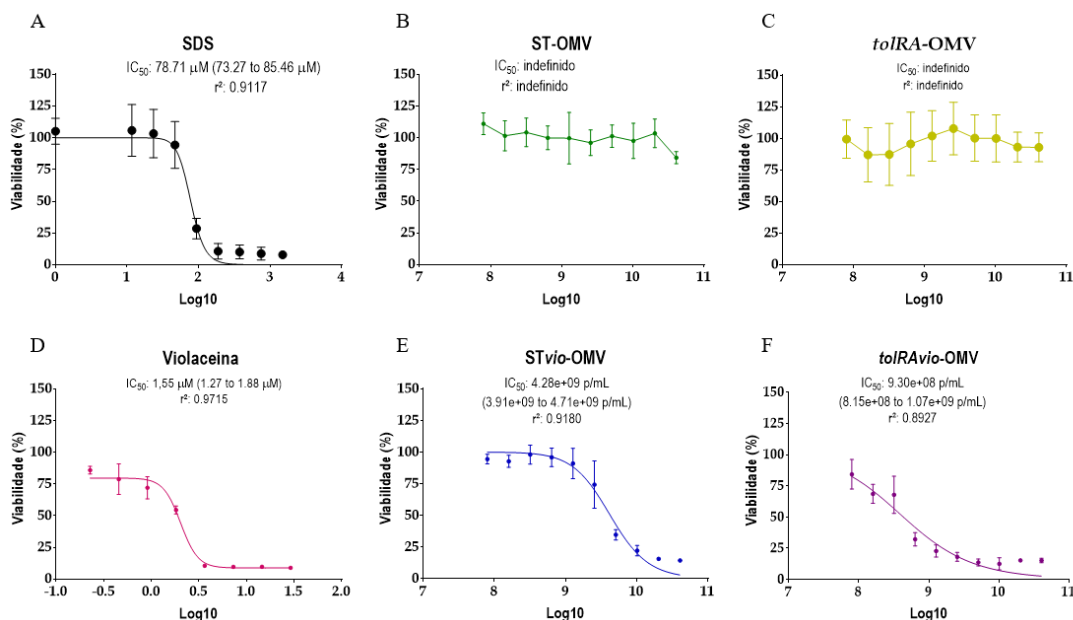


Figura III.4. Perfil citotóxico de OMVs para células de melanoma murino B16-F10 em 24 h. A. Curva dose-resposta de SDS (150 μ g/mL); B. ST-OMV; C. STvio-OMV; D. Violaceína; E. *tolRA*-OMV; F. *tolRAvio*-OMV. Células tratadas com diluições seriadas (maior diluição testada: $2,036 \times 10^{10}$ partículas/l) de OMV. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT. Cada valor representa a média $\pm$ S.D. de dois experimentos independentes (n=6), os valores foram normalizados para o controle de células não tratadas.

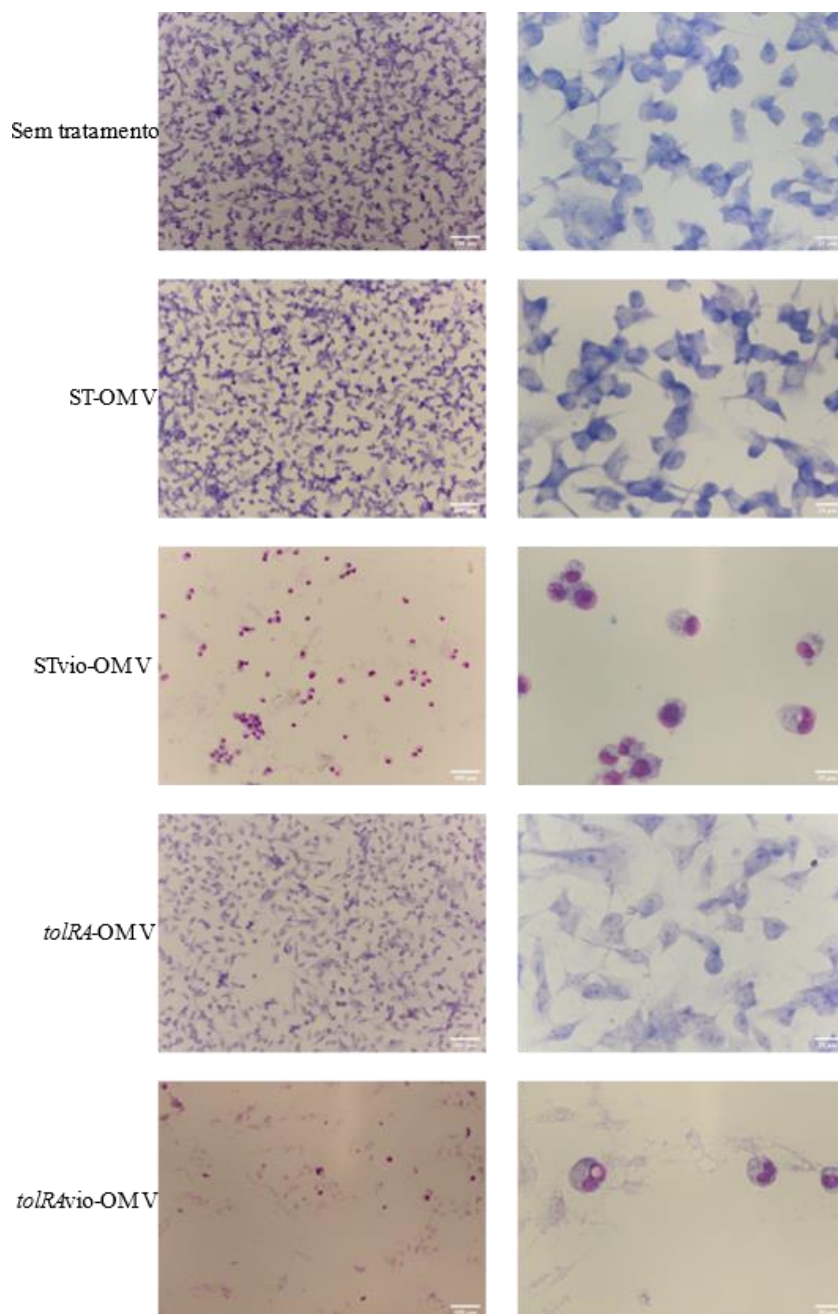


Figura III.5. Características morfológicas de células B16F10 tratadas com 5×10^9 partículas/ml de OMVs isoladas de *S. enterica* Typhimurium. Escala de barras, imagens da esquerda = 100 μm , imagens da direita = 20 μm .

Considerando que não encontramos diferenças significativas entre o efeito *in vitro* de ST-OMV e *tolRA*-OMV, que o rendimento de OMVs isoladas de mutante ΔtolRA é significativamente melhor que nas OMVs isoladas de *S. enterica* Typhimurium 14028 e que *tolRAvio*-OMV mostrou

maior toxicidade que STvio-OMV nas células de melanoma, os experimentos a seguir foram realizados apenas com *tolRA*-OMV e *tolRA*vio-OMV.

Uma vez que o ensaio de monocamada (cultura 2D) é muito restrito, não representa um tumor em modelo tridimensional (modelo 3D) e superestima a citotoxicidade, estudamos a toxicidade das vesículas também em um modelo 3D de células B16-F10. Estruturas 3D em placas de 96 poços foram tratados com três concentrações de OMVs. Como esperado, o tratamento com SDS foi citotóxico, entretanto a violaceína nos agregados celulares (variando de 5,80 μM a 0,72 μM) não afetou significativamente a viabilidade. As OMVs sem violaceína *tolRA*-OMV também não foram tóxicas para os agregados B16-F10 na faixa estudada. Reproduzindo o observado no ensaio de monocamada, o *tolRA*vio-OMV apresentou toxicidade, reduzindo a viabilidade nas três concentrações testadas, de maneira dependente da dose (Figura III.6).

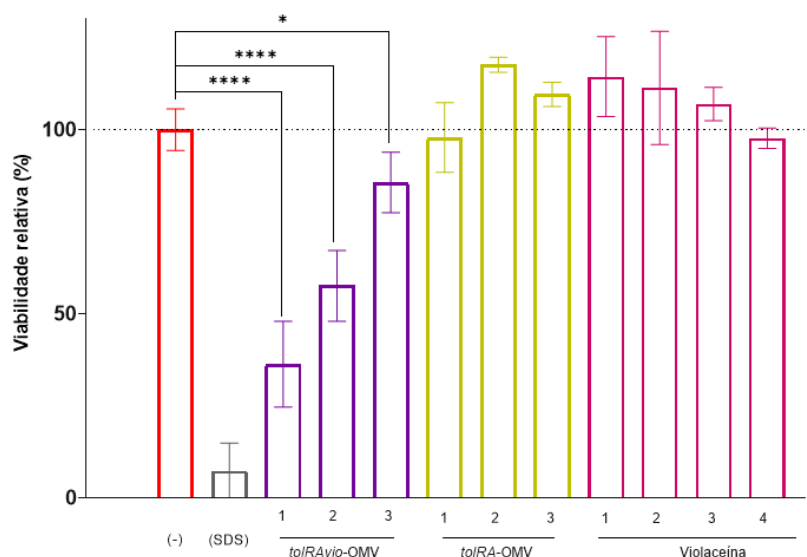


Figura III.6. Modelo tridimensional de células B16-F10 de melanoma murino tratadas com OMVs por 24 horas. (-) controle negativo não tratado; (SDS) Controle positivo de morte. As concentrações de *tolRA*vio-OMV e *tolRA*-OMV são: 1) $2,036 \times 10^{10}$ partículas/ml; 2) $1,018 \times 10^{10}$ partículas/ml; 3) $0,509 \times 10^{10}$ partículas/ml. Para violaceína, as concentrações são: 1) 5,8 μM ; 2) 2,90 μM ; 3) 1,45 μM ; 4) 0,72 μM . A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio luminescente 3D CellTiter Glo. Cada valor representa a média $\pm$ S.D. de dois experimentos independentes; os valores foram normalizados para controle não tratado. A significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,0001$.

III.3.2. Captação de violaceína por células tumorais

Considerando os resultados obtidos por HPLC, analisamos se as OMVs poderiam entregar efetivamente violaceína nas células de melanoma. Para isso, células B16F10 foram tratadas com diferentes concentrações de OMV (Figura III.7.). Quando as células tratadas com *tolRAvio*-OMV foram excitadas, a presença de violaceína foi observada em vermelho no citoplasma das células, devido à fluorescência intrínseca da violaceína. Na concentração de $2,75 \times 10^9$ partículas/ml, verificamos fluorescência apenas nas vesículas de *tolRAvio*-OMV e não em *STvio*-OMV. Além disso, mesmo na concentração mais alta ($1,02 \times 10^{10}$ partículas/ml), o *ST*-OMV e o *tolRA*-OMV não apresentaram citotoxicidade ou sinal vermelho de fluorescência, uma vez que não carregam violaceína (Figura III.7.A). Quando analisamos as características morfológicas celulares das células tratadas com *tolRAvio*-OMV a $1,02 \times 10^{10}$ partículas/ml, foi possível identificar vacúolos (setas pretas) no interior das células B16-F10, além da fluorescência da violaceína (fluorescência vermelha) (Figura III.7.B-C).

Também quantificamos a intensidade de fluorescência emitida por $2,75 \times 10^9$ partículas/ml de *tolRAvio*-OMV e *STvio*-OMV. As células incubadas com *tolRAvio*-OMV apresentam maior fluorescência que as células tratadas com *STvio*-OMV (Figura III.8). Portanto, há mais violaceína sendo entregue nas células e, possivelmente, mais violaceína por partícula nas *tolRAvio*-OMV, uma vez que a concentração é a mesma para ambos os grupos $2,75 \times 10^9$ partículas/ml. Também usamos modelos 3D para avaliar a presença de violaceína por microscopia de fluorescência (Figura III.9). Em $2,036 \times 10^{10}$ partículas/ml, observamos a fluorescência no Grupo *tolRAvio*-OMV (Figura III.9.D.) com alterações nas características morfológicas em comparação com o grupo controle (Figura III.9.A.).

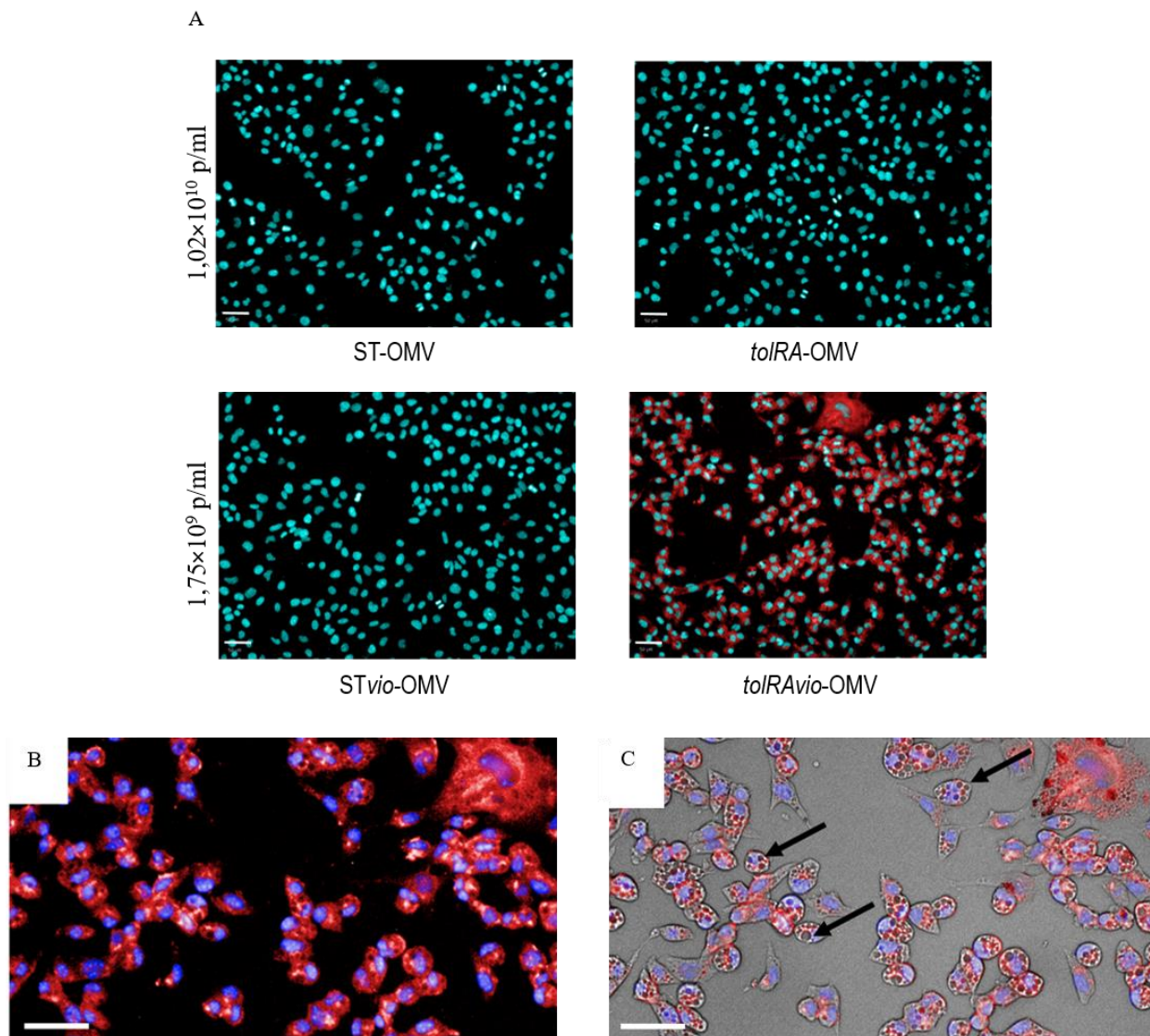


Figura III.7. Imagens representativas de células B16-F10 por microscopia de fluorescência. A. As células foram semeadas em microplaca de 96 poços (1×10^4 células/poço) e tratadas por 4 horas com $1,02 \times 10^{10}$ partículas/ml de ST-OMV, *tolRA*-OMV e $2,75 \times 10^9$ partículas/ml de *tolRAvio*-OMV, STvio-OMV. B-C. Células B16F10 tratadas com $2,75 \times 10^9$ partículas/ml de *tolRAvio*-OMV por 24 horas, campo claro e campo escuro, respectivamente. As setas destacam a vacuolização. Os núcleos foram corados com DAPI (azul-em/ex: ~350/470 nm) e violaceína observada em vermelho (em/ex: ~575/675 nm). As imagens foram adquiridas com ampliação de 20× em High-Content Analysis Operetta™ 3.5. Barras de escala: 50 μm.

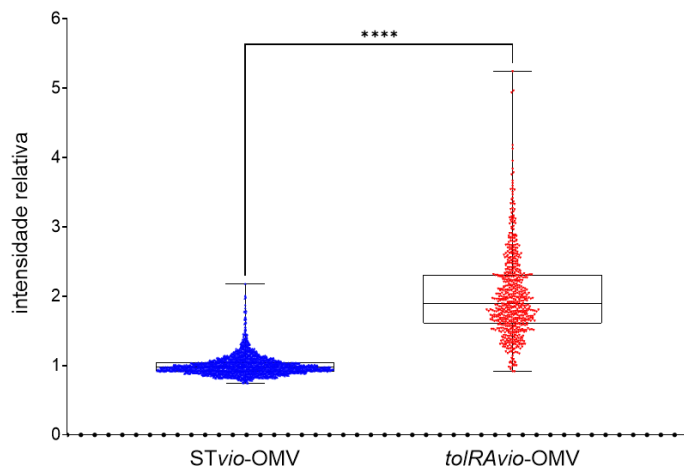


Figura III.8. Intensidade relativa de OMVs carregadas de violaceína por microscopia de fluorescência de células B16-F10 após 4 horas de exposição a $2,75 \times 10^9$ partículas/ml de *tolRAvio*-OMV e *STvio*-OMV. A significância estatística foi determinada pelo teste Mann-Whitney, **** $P < 0.0001$.

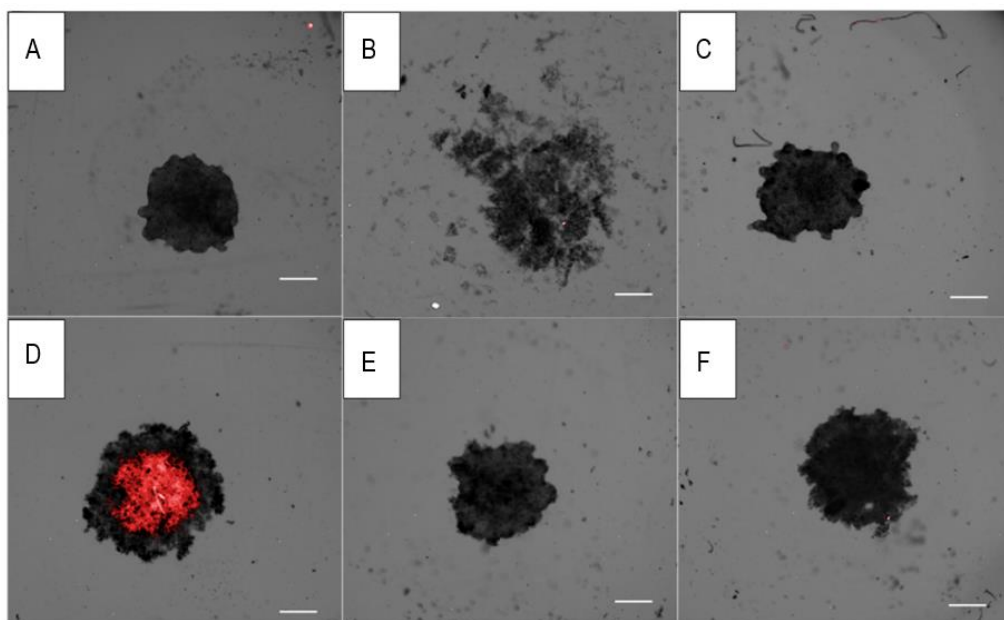


Figura III.9. Imagens representativas do modelo tridimensional B16F10. 2×10^4 células/poço foram semeadas em placa de 96 poços. As células foram incubadas por 48 horas para permitir a agregação. Posteriormente, as células foram tratadas com $2,036 \times 10^{10}$ partículas/ml por 24 horas. A. células sem vesículas. B. células tratadas com SDS (1500 µg/mL). C. *TolRA*-OMV. D. *tolRAvio*-OMV. E. *STvio*-OMV. F. Violaceína (5,08 µM). As imagens foram adquiridas com ampliação de 2× em High-Content Analysis Operetta™ 3.5. Barras de escala: 50 µm.

III.3.2. Estimativa da quantidade de violaceína presente nas OMVs por absorbância

A estimativa da quantidade de violaceína presente em *tolRAvio*-OMV e *STvio*-OMV mostrou resultados similares aos que observamos por HPLC (Tabela suplementar III.1). Por densidade óptica de OMVs carregadas de violaceína e em comparação com concentrações conhecidas de violaceína, determinou-se que *tolRAvio*-OMV tem três vezes mais violaceína que *STvio*-OMV (Tabela III.1). Isso confirma nossas hipóteses de que a maior quantidade de violaceína em *tolRAvio*-OMV é responsável por maior morte celular quando comparado com *STvio*-OMV.

Tabela III.1. Quantidade estimada de violaceína em μM de acordo com a concentração de OMV/ml pela curva padrão de absorbância da violaceína ($r = 0,9987$).

Quantidade relativa de violaceína baseado na curva de absorbância		
OMVs/mL	<i>tolRAvio</i> -OMV	<i>STvio</i> -OMV
79531250	0,429216	0,13929
1,59E+08	0,858095	0,27847
3,18E+08	1,71619	0,55694
6,36E+08	3,432379	1,11388
1,27E+09	6,853965	2,224258
2,55E+09	13,7619	4,46603
5,09E+09	27,46983	8,914546
1,02E+10	55,04759	17,86412
2,04E+10	110,0952	35,72824
4,08E+10	220,1904	71,45648
8,16E+10	440,3807	142,913

Em conjunto, nossos dados *in vitro* demonstraram que *tolRAvio*-OMV tem aproximadamente 4 vezes mais efeito citotóxico que *STvio*-OMV, devido à alta concentração interna de violaceína, uma vez que o número de OMVs foi o mesmo. Por outro lado, *ST*-OMV e *tolRA*-OMV não apresentam efeito citotóxico *in vitro*. O *tolRAvio*-OMV possui de três a quatro vezes mais violaceína que o *STvio*-OMV, conforme verificado tanto por absorbância como por HPLC, respectivamente. Quando comparamos violaceína sozinha e *tolRAvio*-OMV, observamos

que OMV necessita de menos violaceína para atingir a concentração de IC_{50} , portanto o uso de OMV tem mais eficácia e relevância biológicas.

III.3. Avaliação da segurança dos tratamentos com OMVs carregadoras e não carregadoras de violaceína

Para a escolha da dose para o tratamento de tumores, avaliamos a toxicidade de três doses de *tolRA*-OMV e *tolRAvio*-OMV, aplicadas por via subcutânea, duas doses por semana, por duas semanas, totalizando quatro doses (o desenho do experimento é mostrado na Figura III.10.A). Após a inoculação da primeira e da segunda doses, observamos perda de peso nas três doses avaliadas (Figura III.10.C-D), tanto com *tolRA*-OMV quanto com *tolRAvio*-OMV; não observamos perda de peso no grupo controle PBS. Também observamos sinais de doença, como piloereção e letargia, nos grupos tratados com as duas maiores concentrações de *tolRA*-OMV e *tolRAvio*-OMV durante os primeiros sete dias após o início das inoculações. Os grupos tratados com 5×10^9 *tolRA*-OMV e *tolRAvio*-OMV não apresentaram sinais clínicos indicativos de toxicidade sistêmica ou doença, exceto perda de peso.

Uma semana após o início das inoculações, os camundongos recuperaram-se dos sintomas clínicos e começaram a ganhar peso. No final do experimento, não foram observadas diferenças no peso entre o grupo controle PBS e os grupos inoculados com *tolRA*-OMV ou *tolRAvio*-OMV. Em relação à sobrevivência, nenhum dos camundongos tratados com 5×10^9 *tolRA*-OMV ou *tolRAvio*-OMV morreu no final do experimento (Figura III.10.B).

No exame macroscópico do baço, observamos esplenomegalia no grupo 5×10^9 *tolRA*-OMV, e diferenças significativas foram observadas no peso do baço quando comparado com o grupo controle e o grupo 5×10^9 *tolRAvio*-OMV (Figura III.10.E). No exame macroscópico do fígado, observamos aumento de peso no grupo 5×10^9 *tolRAvio*-OMV, no entanto não encontramos diferenças significativas. Esplenomegalia também foi observada quando os camundongos foram inoculados com as duas concentrações mais altas nos grupos *tolRA*-OMV e *tolRAvio*-OMV (Figura suplementar III.2)

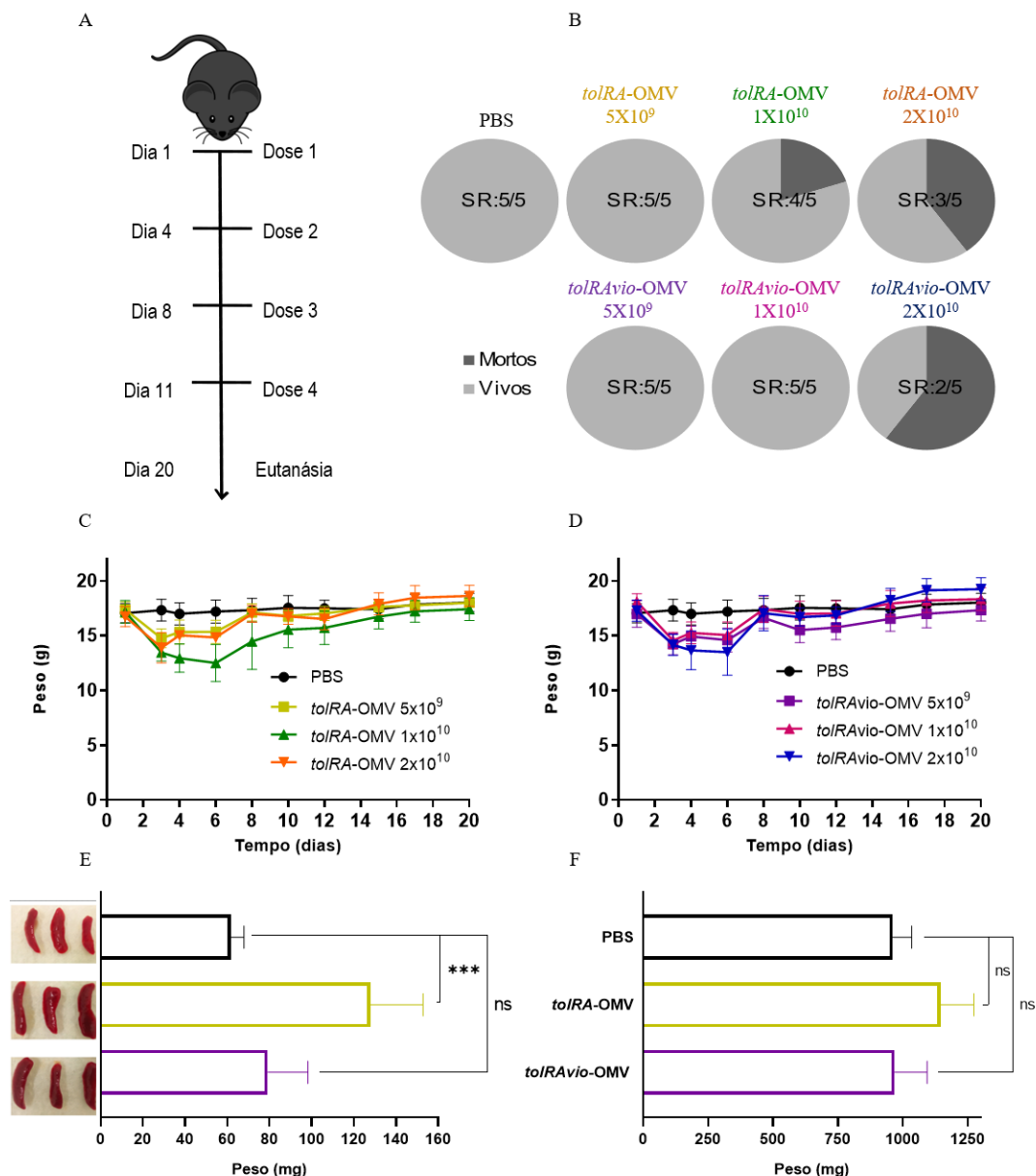


Figura III.10. Avaliação da segurança do tratamento com diferentes doses de OMVs em camundongos. A.

Desenho experimental para testar a toxicidade de diferentes doses de OMVs em camundongos inoculados por via subcutânea. B. Taxa de sobrevivência (SR) de camundongos inoculados com diferentes doses de OMVs no ponto final. C-D. Peso corporal de camundongos inoculados com diferentes doses de OMVs durante o período testado. E. Peso dos baços de camundongos inoculados com diferentes doses de OMVs e imagens representativas no ponto final. F. Peso dos fígados de camundongos inoculados com diferentes doses de OMVs no ponto final do experimento. O experimento foi feito duas vezes com cinco camundongos por grupo. Os gráficos mostram os dados de um experimento representativo. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's. *** $p < 0,005$.

III.3. Eficácia antitumoral de OMVs carregadoras e não carregadoras de violaceína no modelo de melanoma murino

O experimento de avaliação da segurança dos tratamentos mostrou que 5×10^9 OMVs era uma dose bem tolerada pelos camundongos, por isso escolhemos essa dose para os experimentos de eficácia antitumoral. Avaliamos a capacidade de *tolRA*-OMV e *tolRAvio*-OMV de inibir o crescimento tumoral em modelo de melanoma murino. A partir da quantificação da violaceína presente nas vesículas por HPLC, calculamos a massa de violaceína contida em 5×10^9 *tolRAvio*-OMV. Descobrimos que 5×10^9 *tolRAvio*-OMV tinham 306 ng de violaceína. Verificamos também o efeito da violaceína presente nas vesículas. Para isso, células tumorais foram injetadas por via subcutânea no flanco direito de camundongos C57BL/6JUnib. Aproximadamente 10 dias após a inoculação das células tumorais, os tumores atingiram $\sim 100 \text{ mm}^3$, e os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos e injetados por via intratumoral com PBS, 306 ng de violaceína, 5×10^9 *tolRA*-OMV ou 5×10^9 *tolRAvio*-OMV.

Observamos diminuição significativa do crescimento do tumor nos camundongos tratados com *tolRA*-OMV e *tolRAvio*-OMV, quando comparado com o grupo controle de PBS, porém, o tratamento com *tolRAvio*-OMV mostrou melhores resultados. Por sua vez, o tratamento com violaceína retardou o crescimento do tumor (Figura III.11.A-C, D-F). Quando comparamos o tamanho do tumor no ponto final do experimento, observamos que, após 20 dias, o tratamento com *tolRAvio*-OMV eliminou completamente os tumores de todos os camundongos, enquanto o tratamento com *tolRA*-OMV eliminou os tumores de cinco dos sete camundongos. O tratamento com violaceína não mostrou diferenças significativas no tamanho dos tumores no ponto final do experimento (Figura III.11.C).

Também observamos que os tratamentos com OMVs não causaram letalidade nos camundongos. Entretanto, os camundongos inoculados com violaceína e com PBS tiveram que ser eutanasiados antes do ponto final do experimento para evitar maior sofrimento pelo crescimento exacerbado dos tumores. Com relação ao peso, observamos uma diminuição de 10% do peso dos camundongos após a primeira dose do tratamento; porém, uma semana depois, os camundongos recuperaram o peso. Ao final do experimento, não houve diferença significativa entre o peso dos diferentes grupos (Figura III.11.G). Não observamos diferenças significativas no tamanho do baço ou fígado entre os grupos (Figura III.11.H-I).

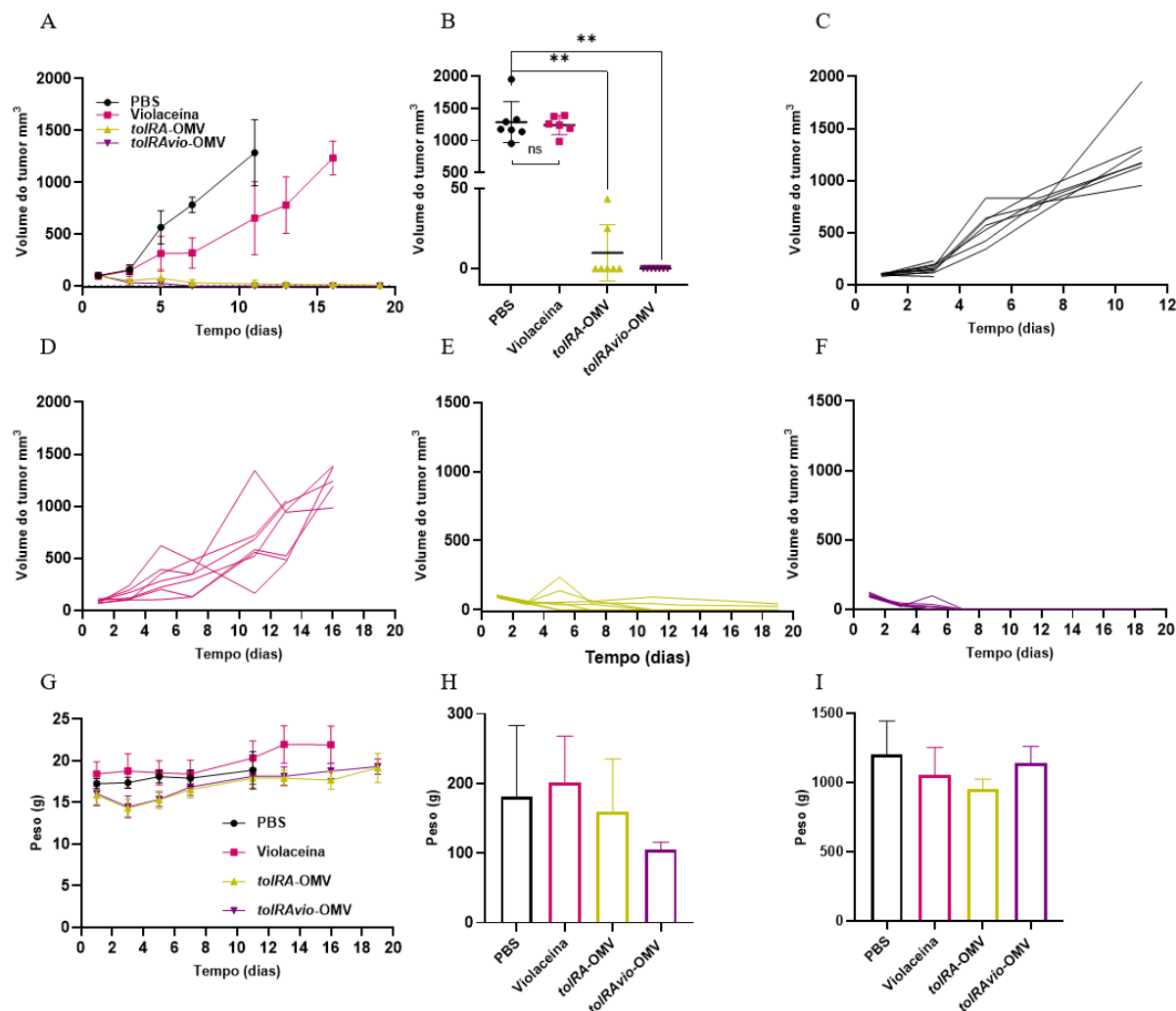


Figura III.11. Eficácia antitumoral de OMVs em modelo de melanoma murino. A supressão do crescimento tumoral foi investigada em modelo de melanoma B16F10 em camundongos C57BL/6JUnib. Camundongos portadores de tumores ($\sim 100 \text{ mm}^3$) foram tratados por via intratumoral, duas vezes por semana por duas semanas com PBS, *tolRA*-OMV (5×10^9), *tolRA*vio-OMV (5×10^9) ou violaceína (306 ng). A. crescimento de tumores depois de iniciados os tratamentos. B. Tamanho do tumor no ponto final do experimento. C-F. Cinética do crescimento individual de tumores de camundongos inoculados com PBS, *tolRA*-OMV (5×10^9), *tolRA*vio-OMV (5×10^9) ou violaceína (306 ng). G. Peso dos camundongos durante os tratamentos. H. Peso de baço (H) e fígado (I) após os tratamentos. A significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's $**p < 0,01$.

III. 3. Investigação da resposta imune desencadeada por OMVs carregadoras e não carregadoras de violaceína.

Também investigamos se o tratamento de tumores com OMVs pode desencadear a resposta imune antitumoral em camundongos. Nossos resultados de eficácia antitumoral mostraram que

tolRAvio-OMV elimina os tumores depois de aproximadamente seis dias. Portanto, para poder analisar o tecido tumoral de camundongos tratados antes de sua regressão, tratamos camundongos portadores de tumores com duas doses de OMVs, as quais foram espaçadas por quatro dias. Quatro horas após a segunda dose, os camundongos foram eutanasiados, e o tecido tumoral foi coletado para as análises da resposta imune.

Analisamos os macrófagos infiltrantes no tumor, e o fenótipo deles por citometria de fluxo, usando os anticorpos CD80-Pe, CD206-APC, CD11b-Percp e F4/80-Fitc. Além disso, analisamos por qRT-PCR a expressão de genes associados com a resposta antitumoral. Nossos dados demonstraram que o tratamento com *tolRA*-OMV e *tolRAvio*-OMV aumenta significativamente a infiltração de macrófagos (CD11b⁺_F4/80⁺) no tecido tumoral quando comparado com o dos os camundongos tratados com PBS. Não encontramos diferenças significativas na porcentagem de macrófagos entre o grupo PBS e o tratamento com violaceína (Figura III.12.A). Em seguida, investigamos a polarização funcional de macrófagos no tecido tumoral (Figura III.12.B). Para diferenciar entre macrófagos M1 e M2, examinamos a expressão de CD80 e CD206 em células CD11b⁺_F4/80⁺. A população de macrófagos do tipo M1 (CD11b⁺_F4/80⁺_CD80⁺) em tumores tratados com *tolRA*-OMV e *tolRAvio*-OMV aumentou significativamente, enquanto a população de macrófagos do tipo M2 (CD11b⁺_F4/80⁺_CD206⁺) diminuiu. A mudança de fenótipo de macrófagos foi maior nos tumores tratados com *tolRAvio*-OMV. Esses resultados sugerem que OMVs de *S. enterica* Typhimurium induzem a supressão tumoral pela infiltração de macrófagos do tipo M1.

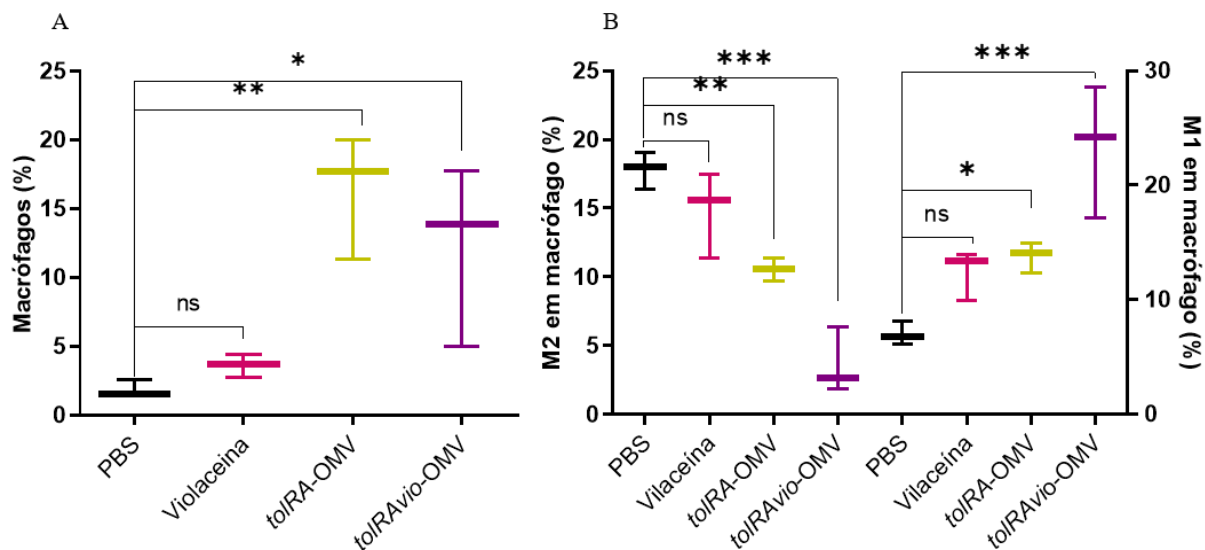


Figura III.12. Detecção de macrófagos infiltrantes no tecido tumoral de camundongos tratados com OMVs.

A. Porcentagem de macrófagos (CD11b+_F4/80+_CD80+). B. Polarização de macrófagos do tipo M1(CD11b+_F4/80+_CD206+) e M2 (CD11b+_F4/80+_CD206+). Foram utilizados três camundongos por grupo. A significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Algumas citocinas inflamatórias secretadas por células imunitárias podem destruir, de forma direta, as células tumorais ou induzir respostas antitumorais. Por tanto, a partir do tecido tumoral, analisamos a expressão de mRNA de algumas citocinas e mediadores usando qRT-PCR. Os resultados mostraram que as quantidades de mRNA de IL-6, iNOS e TNF- α induzidas pelo tratamento com *tolRA*-OMV e *tolRAvio*-OMV foram significativamente mais altas que as induzidas por PBS ou violaceína. Maior quantidade desses transcritos foi encontrada nos tumores tratados com *tolRAvio*-OMV (Figura III.13), o que sugere que a violaceína entregue pelas vesículas melhora a ativação imunitária e a eficácia terapêutica. Observamos também uma maior expressão do transcrito Bax e uma menor expressão de VEGF nos tumores tratados com *tolRA*-OMV e *tolRAvio*-OMV, porém não observamos diferenças significativas.

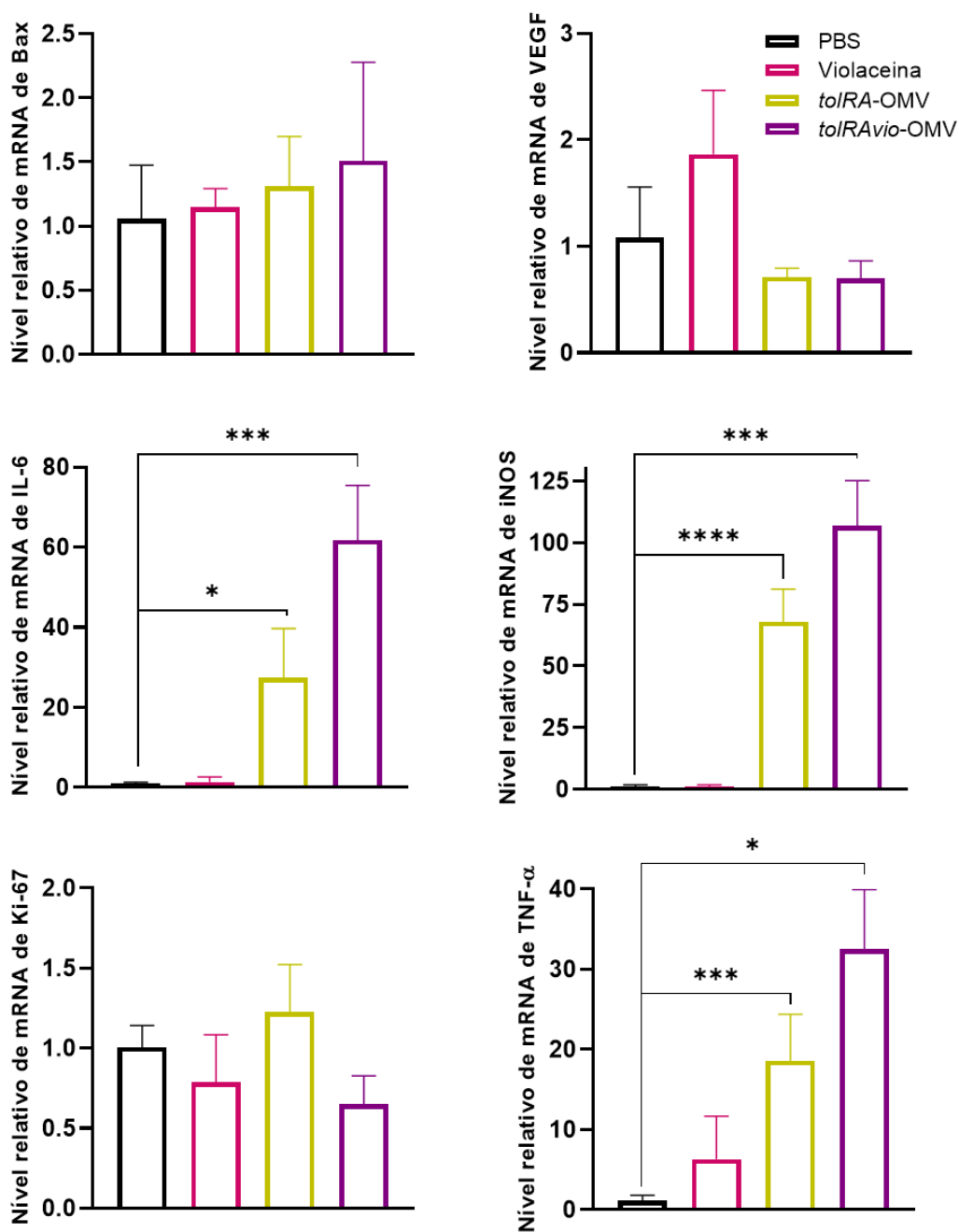


Figura III.13. Efeito de OMVs na expressão gênica de citocinas e mediadores associados com a resposta antitumoral. Nível relativo de expressão de mRNA dos genes Bax (A), VEGF (B), IL-6 (C), iNOS (D), Ki-67 (E) e TNF- α (F). Massa tumoral de camundongos portadores de tumor B16F10 foi coletada quatro horas após a segunda inoculação de OMVs, violaceína ou PBS via intratumoral (n=3). Os resultados são apresentados como a média $\pm$ SD. A significância estatística foi determinada por ANOVA de uma via seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,005; **** p <0,0001.

III. Discussão

Embora a eficácia antitumoral da violaceína já tenha sido demonstrada em diferentes tipos de câncer, sua aplicação clínica tem sido limitada por sua toxicidade inespecífica e sua alta hidrofobicidade (solúvel em DMSO, metanol e acetona), o que dificulta sua entrega nas células tumorais (BERTI et al., 2019; DURÁN et al., 2021). É por essa razão que a investigação em estratégias para aumentar a entrega e diminuir a toxicidade da violaceína tem sido o foco de grandes esforços. Diferentes abordagens têm sido propostas para melhorar a entrega e diminuir a toxicidade da violaceína, a maioria delas baseadas em nanopartículas poliméricas (DE AZEVEDO et al., 2000; MARTINS et al., 2010; BERNI et al., 2013; BERTI et al., 2019).

Algumas dessas abordagens envolvem a formação de complexos de violaceína com o oligossacarídeo ciclodextrina e o uso de nanopartículas de poli-D,L-(lactídeo-co-glicólido) recobertas com ácido ascórbico (DE AZEVEDO et al., 2000; MARTINS et al., 2010). Outros estudos envolvendo nanopartículas do polímero poli(ϵ -caprolactona) carregadas de violaceína também foram relatados (BERNI et al., 2013). Mas, recentemente, foi relatada a entrega de violaceína em células de câncer de cólon através de microesferas carregadas de violaceína emulsionada em polioxietileno sorbitano e recobertas de polímero (pectina e gelatina) (BERTI et al., 2019). Todas essas abordagens mostraram alta estabilidade, mas os sistemas não foram muito eficientes para entregar violaceína. Portanto, é necessário um sistema de entrega eficiente para o uso potencial da violaceína na terapia do câncer.

As OMVs, como nanocarregadores biológicos, têm mostrado grande potencial na terapia do câncer. As OMVs têm muitas características inatas que as tornam atraentes como veículos de entrega de drogas, como estabilidade, tamanho nanométrico, capacidade de carregar moléculas, capacidade de ativar o sistema imune e de se fundir com as células hospedes. *S. enterica* Typhimurium pode invadir células não fagocíticas por meio do sistema de secreção do tipo III e de proteínas de invasão (ROCHE et al., 2018). Uma análise de proteômica demonstrou que OMVs de *S. enterica* Typhimurium carregam proteínas de invasão (BAI et al., 2014). O tamanho nanométrico, assim como as proteínas carregadas pelas OMVs, pode facilitar sua entrada e a entrega de moléculas nas células tumorais (AMANO; TAKEUCHI; FURUTA, 2010).

OMVs de *S. enterica* Typhimurium foram usadas para a preparação de OMVs revestidas com peptídeo RGD que carregam o quimioterápico tegafur. As OMVs desencadearam a inibição significativa do crescimento tumoral no modelo murino (CHEN et al., 2020). De forma similar, o tratamento com OMVs carregadas de melanina em combinação com irradiação de luz infravermelha diminuiu o crescimento do tumor (GUJRATI et al., 2019). Recentemente, OMVs carregadas de doxorubicina foram desenvolvidas a partir de uma cepa de *Klebsiella pneumoniae*. As OMVs carregadas de doxorubicina facilitaram a entrega de doxorubicina às células tumorais e mostraram significativos efeitos antitumorais. Os autores demonstraram que, além de entregar doxorubicina, as OMVs podem estimular respostas imunes para aumentar o efeito da doxorubicina (KUERBAN et al., 2020). Esses e outros estudos confirmam o potencial das OMVs como nanocarregadores de moléculas anticancerígenas. Até o momento, o potencial das OMVs para entregar violaceína no tratamento do câncer não foi explorado. Portanto, é uma abordagem interessante que merece investigação. Neste estudo, isolamos OMVs de mutante atenuado e hipervesiculado de *S. enterica* Typhimurium. Demonstramos que as OMVs carregadas de violaceína facilitam a entrada da violaceína nas células tumorais e induzem respostas imunitárias que resultam na eliminação completa de tumores de melanoma em modelo murino.

O uso de OMVs sozinhas ou como nanocarregadores para o desenvolvimento de terapias contra diferentes enfermidades aumentou nos últimos anos (PASTOR et al., 2018; PAYNTER et al., 2019; PENG et al., 2020; KLOUWENS et al., 2021; JIANG et al., 2022). A estabilidade, a produção econômica e o sucesso da vacina baseada em OMVs contra a meningite tornam as OMVs produtos atraentes para o desenvolvimento de tratamentos eficientes (KAPARAKIS-LIASKOS; FERRERO, 2015). Mesmo assim, o baixo rendimento de isolamentos de bactérias de tipo selvagem é um problema que precisa ser abordado. Para aumentar o rendimento de OMVs, em nosso estudo, usamos uma cepa de *S. enterica* Typhimurium carente das proteínas TolA e TolR. Nossos resultados concordam com os observados em outros estudos que também mostraram um aumento significativo no rendimento de OMVs derivadas de mutantes carentes dessas proteínas em comparação com a cepa WT (Figura III.2.B) (DALEKE-SCHERMERHORN et al., 2014; PASTOR et al., 2018; JIANG et al., 2022). Curiosamente, as OMVs do mutante $\Delta tolRA$ mostraram uma distribuição monodispersa (Figura III.2.E e Figura suplementar III.1). Nanocarregadores com distribuição homogênea (monodispersa) têm maior potencial para aplicação biomédica que

nanopartículas com distribuição polidispersa (MASARUDIN et al., 2015; DANAIE et al., 2018; DHEYAB et al., 2022).

A toxicidade bacteriana é o principal problema no uso de bactérias ou produtos bacterianos na terapia do câncer. OMVs isoladas de cepas atenuadas de *S. enterica* Typhimurium são incapazes de se replicar e fornecem uma opção mais segura no tratamento do câncer. Neste estudo, usamos uma cepa atenuada, hipervesiculada e produtora de violaceína para isolar OMVs carregadoras de violaceína. Demonstramos, previamente *in vivo*, a atenuação da virulência dessa cepa (Capítulo II). As OMVs não carregadas de violaceína (ST-OMV e *tolRA*-OMV) não mostraram eficiência para eliminar células tumorais *in vitro*, como evidenciado pelo ensaio de MTT e microscopia de culturas 3D (Figura III.4 e 5), assim como pelo experimento de produção de ATP (Figura III.). No entanto, por meio desses mesmos experimentos, observamos que as OMVs carregadas com violaceína (STvio-OMV e *tolRA*vio-OMV) apresentaram toxicidade nas células tumorais. Curiosamente, não observamos diferenças significativas entre ST-OMV e *tolRA*-OMV, mas encontramos diferenças significativas entre a toxicidade de STvio-OMV e *tolRA*vio-OMV.

Como a violaceína tem fluorescência intrínseca, observamos células tratadas com OMVs com e sem violaceína por microscopia de fluorescência. Quando as células foram tratadas com 2.75×10^9 partículas/ml, observamos fluorescência intensa em células tratadas com *tolRA*vio-OMV, mas não observamos fluorescência nas células tratadas com STvio-OMV. Portanto, investigamos se a quantidade de violaceína entre STvio-OMV e *tolRA*vio-OMV era diferente. A quantificação relativa do conteúdo de violaceína nas OMVs por análise de HPLC e fluorescência demonstrou que *tolRA*vio-OMV carregam quatro e três vezes, respectivamente mais violaceína que STvio-OMV (Figura III.3 e 8, tabela III.1, tabela suplementar III.1). Esses resultados sugerem que a diferença na toxicidade observada *in vitro* é devido a maior quantidade de violaceína presente nas OMVs. Como *tolRA*vio-OMV apresentou maior atividade antitumoral que STvio-OMV, e o rendimento de OMVs do mutante $\Delta tolRA$ foi significativamente maior que da cepa selvagem, focamos os experimentos *in vivo* em *tolRA*-OMV e *tolRA*vio-OMV.

As OMVs podem se aderir às células eucariotas e entrar nelas para liberar sua carga no seu interior. Os mecanismos desse processo ainda não estão completamente elucidados, mas as vias de macropinocitose, internalização mediada por jangadas lipídicas, endocitose mediada por caveolina, endocitose mediada por clatrina e endocitose não mediada por caveolina ou clatrina têm

sido implicadas na entrada de OMVs nas células eucariotas (LA; RC; DR, 2014; O'DONOGHUE; KRACHLER, 2016; VANAJA et al., 2016; YANG et al., 2020). Em geral, as OMVs foram relatadas por entrar nas células eucarióticas e entregar seu conteúdo ao citoplasma. Devido à autofluorescência da violaceína, foi possível visualizar, por microscopia de fluorescência, a captação de vesículas carregadas com violaceína pelas células de melanoma. Nossos resultados revelaram que as OMVs transportam a violaceína de forma eficiente dentro das células, como evidenciado pelo acúmulo de fluorescência vermelha ao redor do núcleo em azul, corada com DAPI (Figura III.7 e 9). Curiosamente, quando as células foram tratadas com violaceína na mesma quantidade presente nas vesículas, não observamos fluorescência nas células, sugerindo que as OMVs facilitam a entrada do composto hidrofóbico para exercer seus efeitos citotóxicos com melhor eficiência, como ficou evidente nos experimentos de produção de MTT e ATP.

O mecanismo de ação da violaceína em células tumorais tem sido extensivamente pesquisado (HASHIMI; XU; WEI, 2015; ALSHATWI; SUBASH-BABU; ANTONISAMY, 2016; GONÇALVES et al., 2016; MASUELLI et al., 2016; KIM et al., 2021; DAHLEM et al., 2022). A evidência sugere que a violaceína induz apoptose e autofagia (HUANG et al., 2020). Em nosso estudo, observamos mudanças morfológicas e acumulação de vacúolos no citoplasma das células tratadas com *tolRAvio*-OMV (semelhante a autofagossomos). A formação de vacúolos é uma característica de autofagia. Previamente em células de carcinoma de cabeça e pescoço, foi demonstrado que a violaceína induz a morte por autofagia (MASUELLI et al., 2016). A presença de vacúolos nas células tratadas com *tolRAvio*-OMV e a diminuição da viabilidade das células de melanoma sugerem que as OMVs carregadas de violaceína podem induzir autofagia. No entanto, mais pesquisas são necessárias para corroborar esse achado.

Também investigamos se a administração de *tolRA*-OMV e *tolRAvio*-OMV em camundongos resultava em toxicidade letal. A dose de 5×10^9 foi bem tolerada pelos camundongos. Só observamos perda de peso corporal no início das inoculações, mas, no final do experimento, nenhuma perda significativa de peso ou mortalidade foi encontrada (Figura III.10.B-D). Tomados em conjunto, os resultados sugerem que as OMVs isoladas podem ser nanocarregadores promissores para entrega de drogas. Embora vesículas de células de mamíferos tenham sido propostas como nanocarregadores de drogas para a terapia do câncer, sua produção é cara em

comparação com OMVs de bactérias (MENDT et al., 2018). Além disso, OMVs bacterianas têm a vantagem adicional de atuar como adjuvantes naturais (GUJRATI et al., 2019).

Nossos resultados de experimentos antitumorais em um modelo murino de melanoma também demonstraram a eficácia de OMVs carregadas de violaceína. As OMVs carregadas de violaceína eliminaram totalmente os tumores dos camundongos sem causar letalidade alguma. Entretanto, semelhante a outros estudos reportados na literatura (BROMBERG et al., 2010; HASHIMI; XU; WEI, 2015; MASUELLI et al., 2016), o tratamento com violaceína em nosso estudo diminuiu a taxa de crescimento de tumores em comparação aos do grupo controle, mas não foi eficiente para eliminar o tumor (Figura III.11). É importante mencionar que a quantidade de violaceína presente em 5×10^9 OMVs (306 ng) é muito menor que a utilizada em modelos subcutâneos de tumor, que varia entre 13000-27000 ng de violaceína (HASHIMI; XU; WEI, 2015; MASUELLI et al., 2016). Portanto, o uso de vesículas permite reduzir a quantidade de violaceína utilizada e aumenta consideravelmente sua atividade antitumoral.

Por outra parte, houve discrepâncias entre os resultados *in vitro* e *in vivo* quanto à atividade antitumoral do tratamento com OMVs sem violaceína. OMVs sem violaceína *in vitro* não mostraram atividade antitumoral (Figura III.4), no entanto observamos atividade antitumoral significativa *in vivo* (Figura III.11). Outros estudos têm demonstrado a atividade antitumoral de OMVs sozinhas de *S. enterica* Typhimurium no tratamento de Carcinoma sólido de Ehrlich em camundongos (ALY et al., 2021). Semelhante às bactérias, as OMVs são capazes de ativar o sistema imunológico, uma vez que são compostas pelos mesmos padrões moleculares associados a patógenos presentes em suas bactérias parentais (DEATHERAGE et al., 2009; GUJRATI et al., 2019; PENG et al., 2020). As OMVs no tumor podem interagir com as células que apresentam antígenos e com macrófagos para induzir a sinalização que levará ao recrutamento de células imunes e à produção de mediadores pró-inflamatórios no microambiente tumoral imunossupressor (KAPARAKIS-LIASKOS; FERRERO, 2015; QING et al., 2020). Nossa análise de citometria revelou porcentagem significativamente maior de macrófagos infiltrantes no tumor nos camundongos tratados com *tolRA*-OMV e *tolRAvio*-OMV (Figura III.12.A). Esses achados sugerem que semelhante a *S. enterica* Typhimurium, OMVs de *S. enterica* Typhimurium podem induzir a eficácia antitumoral mediada por macrófagos.

Tumores podem desenvolver um microambiente tumoral imunossupressor, especialmente os tumores agressivos como o melanoma (FALCONE et al., 2020; JORGE et al., 2020; SIMICZYJEW et al., 2020). O microambiente tumoral imunossupressor dificulta o tratamento de tumores, uma vez que os torna mais resistentes. No microambiente tumoral imunossupressor, as células T reguladoras e os macrófagos associados a tumor de fenótipo M2 são abundantes. Essas células levam à evasão da vigilância imunológica e à progressão do tumor (QING et al., 2020). Foi encontrada uma correlação entre uma maior presença de macrófagos associados a tumor de tipo M2 e piores prognósticos em pacientes com melanoma (BRONKHORST et al., 2011; FALLENI et al., 2017; JORGE et al., 2020; MARTILE et al., 2020). Estratégias terapêuticas bem-sucedidas no tratamento do câncer precisam envolver mais que a morte das células tumorais (ZHOU et al., 2019). Portanto, a reprogramação do microambiente tumoral parece uma estratégia promissora para o tratamento do câncer.

A análise de citometria de fluxo também revelou que a proporção de macrófagos do tipo M1 para macrófagos do tipo M2 ($M1/M2 > 1$) foi significativamente maior nos camundongos tratados com *tolRA*-OMV e *tolRA*_{bio}-OMV, enquanto uma clara inversão foi observada nos grupos PBS e violaceína (Figura III.12.B), o que pode ser atribuído à internalização das OMVs pelas células imunes que leva à polarização de macrófagos do tipo M2 a fenótipo M1. Esse resultado está de acordo com um estudo anterior que demonstrou que OMVs de *E. coli* podem reprogramar o microambiente tumoral pela polarização de macrófagos de fenótipo M2 a fenótipo M1 (QING et al., 2020). Os macrófagos de fenótipo M1 ou pró-inflamatórios são caracterizados por produzir altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e estão associados à supressão do tumor (KAIMALA et al., 2014; PERROTTA et al., 2018; DI MITRI et al., 2019). Esse comportamento diverge de seus análogos macrófagos de tipo M2, que são anti-inflamatórios e participam de processos imunossupressores e da promoção do tumor (KAIMALA et al., 2014; PERROTTA et al., 2018; DI MITRI et al., 2019).

A polarização de macrófagos do tipo M2 a fenótipo M1 observada em nosso estudo foi acompanhada pelo aumento significativo de mRNA de IL-6, iNOS e TNF- α (Figura III.13.C-D e F). Estudos prévios *in vitro* reportaram o aumento da secreção de IL-6 e TNF- α em macrófagos murinos tratados com violaceína (VENEGAS et al., 2019); também foi reportado o aumento dessas citocinas em camundongos tratados com OMVs, e tem se associado essas citocinas à resposta

imune antitumoral (KIM et al., 2017; KUERBAN et al., 2020; QING et al., 2020). Macrófagos do fenótipo M1 sintetizam óxido nítrico, e a expressão de iNOS tem sido descrita como uma marca registrada dos macrófagos M1. O óxido nítrico bloqueia a proliferação celular, inibindo a síntese de DNA (HABIB; ALI, 2011; NATH; KASHFI, 2020). Em nosso estudo, é provável que o aumento de iNOS contribua para a reprogramação do microambiente tumoral. É importante destacar que as OMVs carregadoras de violaceína apresentaram maior proporção de macrófagos do tipo M1 e maior expressão de citocinas pró-inflamatórias e iNOS, bem como menor proporção de macrófagos do tipo M2 que as OMVs sem violaceína. Esses achados sugerem que a violaceína aumenta a atividade antitumoral *in vivo* das OMVs.

Em conclusão, nosso estudo mostra que as OMVs derivadas de mutante hipervesiculado de *S. enterica* Typhimurium são nanocarregadores eficientes para a entrega do composto hidrofóbico violaceína no citoplasma de células cancerígenas. Além disso, podem desencadear a reprogramação do microambiente tumoral de imunossupressor a imunoativo por indução de infiltração de macrófagos, polarização de macrófagos do tipo M1 e produção de citocinas e mediadores inflamatórios. A entrega de violaceína pelas OMVs também pode potencializar seu efeito antitumoral e a reprogramação do microambiente tumoral sem toxicidade evidente. Portanto, OMVs de *S. enterica* Typhimurium carregadas de compostos anticancerígenos são uma estratégia promissora e economicamente viável na terapia do câncer.

Tabela suplementar III.1

Tabela 01. Quantidade estimada de violaceína em μM de acordo com a concentração de OMV/ml pela área de HPLC da violaceína padrão.

Quantidade relativa de violaceína baseada na curva de HPLC		
OMVs/mL	<i>tolRAvio</i> -OMV	ST <i>vio</i> -OMV
79531250	0,013766	0,003436
1,59E+08	0,027521	0,006869
3,18E+08	0,055041	0,013738
6,36E+08	0,110082	0,027476
1,27E+09	0,219818	0,054865
2,55E+09	0,441368	0,110162
5,09E+09	0,881004	0,219892
1,02E+10	1,765471	0,440648
2,04E+10	3,530941	0,881297
4,08E+10	7,061882	1,762593
8,16E+10	14,12376	3,525186

Figuras suplementares

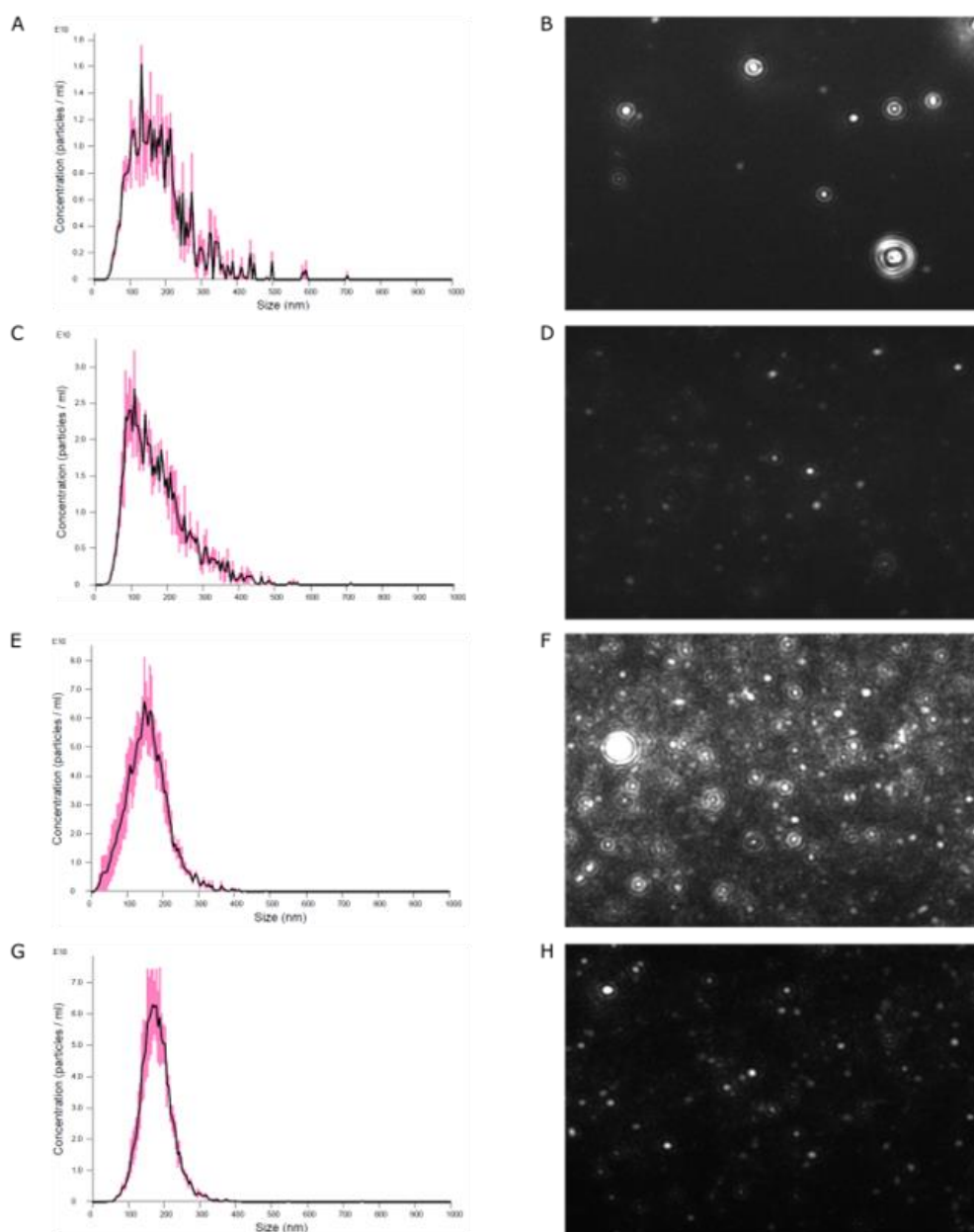


Figura suplementar III.1. NTA de OMVs isoladas de sobrenadantes de cultura de *S. enterica* Typhimurium. (A) e (B) histograma mostrando a distribuição de tamanho de partícula e captura de tela do vídeo de ST-OMVs, respectivamente. (C) e (D) histograma mostrando a distribuição de tamanho de partícula e captura de tela do vídeo de STvio-OMVs, respectivamente. (E) e (F) histograma mostrando a distribuição de tamanho de partícula e captura de tela do vídeo de tolRA-OMVs, respectivamente. (G) e (H) histograma mostrando a distribuição de tamanho de partícula e captura de tela do vídeo de *tolRAvio*-OMVs, respectivamente.

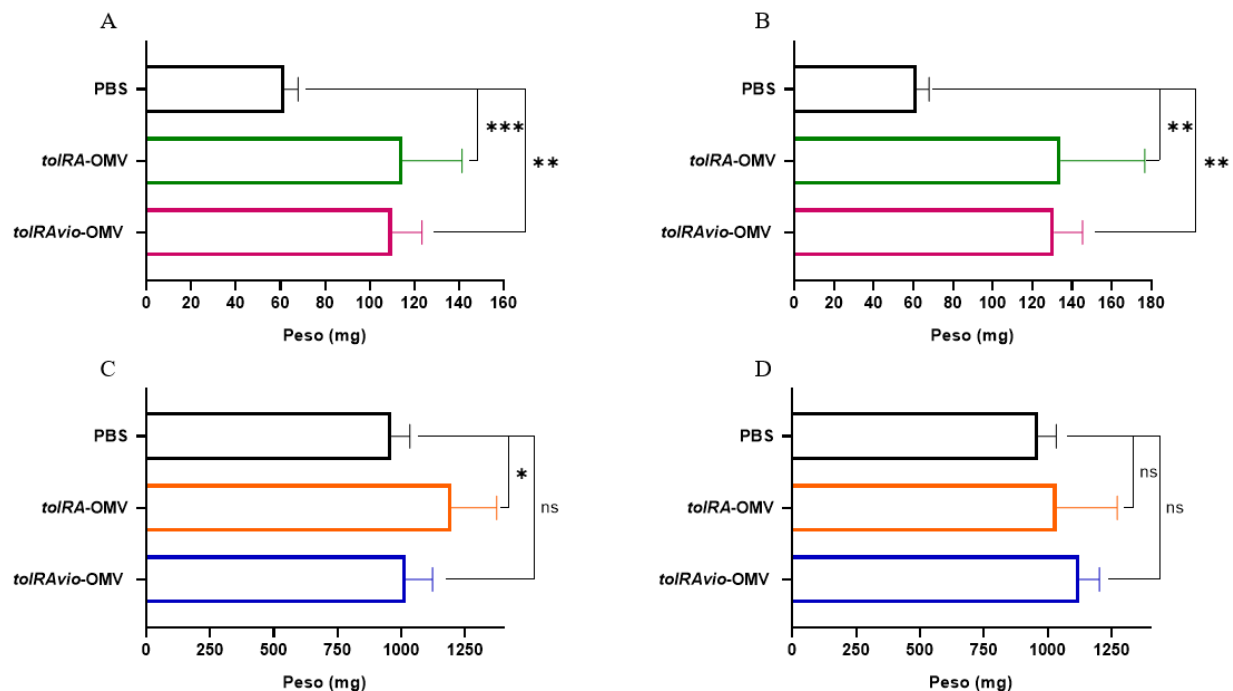


Figura suplementar III.2. Peso de fígados e baços de camundongos inoculados com diferentes doses de OMVs. A. Peso dos baços de camundongos inoculados com 1×10^{10} OMVs. B. Peso dos baços de camundongos inoculados com 2×10^{10} OMVs. C. Peso dos fígados de camundongos inoculados com 1×10^{10} OMVs. D. Peso dos fígados de camundongos inoculados com 2×10^{10} OMVs. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido pelo Teste de comparações multiplex de Dunnett's. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$.

Referências

ALSHATWI, A. A.; SUBASH-BABU, P.; ANTONISAMY, P. Violacein induces apoptosis in human breast cancer cells through up regulation of BAX, p53 and down regulation of MDM2. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 68, n. 1, p. 89–97, 1 jan. 2016.

ALY, R. G. et al. Antineoplastic activity of *Salmonella* Typhimurium outer membrane nanovesicles. **Experimental Cell Research**, v. 399, n. 1, p. 112423, 1 fev. 2021.

AMANO, A.; TAKEUCHI, H.; FURUTA, N. Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host-parasite interactions. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 11, p. 791–798, out. 2010.

ARANDA, S.; MONTES-BORREGO, M.; LANDA, B. B. Purple-pigmented violacein-producing *Duganella spp.* inhabit the rhizosphere of wild and cultivated olives in southern Spain. **Microbial Ecology**, v. 62, n. 2, p. 446–459, ago. 2011.

ASCIERTO, P. A. et al. Perspectives in melanoma: meeting report from the Melanoma Bridge. **Journal of Translational Medicine**, v. 17, n. 1, p. 234, 22 jul. 2019.

BAI, J. et al. Identification and Characterization of Outer Membrane Vesicle-Associated Proteins in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 10, p. 4001–4010, out. 2014.

BATISTA, J. H. et al. Interplay between two quorum sensing-regulated pathways, violacein biosynthesis and VacJ/Yrb, dictates outer membrane vesicle biogenesis in *Chromobacterium violaceum*. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 2432–2442, jun. 2020.

BERNI, E. et al. Violacein/poly(epsilon-caprolactone)/chitosan nanoparticles against bovine mastitis: Antibacterial and ecotoxicity evaluation. v. 429, p. 012030, 1 abr. 2013.

BERTI, I. R. et al. Development of biocarrier for violacein controlled release in the treatment of cancer. **Reactive and Functional Polymers**, v. 136, p. 122–130, 1 mar. 2019.

BILSLAND, E. et al. Antiplasmodial and trypanocidal activity of violacein and deoxyviolacein produced from synthetic operons. **BMC biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 22, 11 abr. 2018.

BITTO, N. J. et al. Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. **Scientific Reports**, v. 7, p. 7072, 1 ago. 2017.

BOLICK, N. L.; GELLER, A. C. Epidemiology of Melanoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, Melanoma. v. 35, n. 1, p. 57–72, 1 fev. 2021.

BRAMEYER, S. et al. Outer Membrane Vesicles Facilitate Trafficking of the Hydrophobic Signaling Molecule CAI-1 between *Vibrio harveyi* Cells. **Journal of Bacteriology**, v. 200, n. 15, p. e00740-17, 1 ago. 2018.

BROMBERG, N. et al. Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. **Chemico-Biological Interactions**, v. 186, n. 1, p. 43–52, 7 jun. 2010.

BRONKHORST, I. H. G. et al. Detection of M2-Macrophages in Uveal Melanoma and Relation with Survival. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 52, n. 2, p. 643–650, 2 fev. 2011.

CAUZ, A. C. G. et al. Violacein Targets the Cytoplasmic Membrane of Bacteria. **ACS infectious diseases**, v. 5, n. 4, p. 539–549, 12 abr. 2019.

CHEN, Q. et al. Bioengineering Bacterial Vesicle-Coated Polymeric Nanomedicine for Enhanced Cancer Immunotherapy and Metastasis Prevention. **Nano Letters**, v. 20, n. 1, p. 11–21, 8 jan. 2020.

CHUTKAN, H. et al. Quantitative and qualitative preparations of bacterial outer membrane vesicles. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 966, p. 259–272, 2013.

DAHLEM, C. et al. Characterization of Anti-Cancer Activities of Violacein: Actions on Tumor Cells and the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 872223, 2022.

DALEKE-SCHERMERHORN, M. H. et al. Decoration of Outer Membrane Vesicles with Multiple Antigens by Using an Autotransporter Approach. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 18, p. 5854–5865, set. 2014.

DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 18 maio 2018.

DE AZEVEDO, M. B. M. et al. Violacein/ β -Cyclodextrin Inclusion Complex Formation Studied by Measurements of Diffusion Coefficient and Circular Dichroism. **Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry**, v. 37, n. 1, p. 67–74, 1 maio 2000.

DEATHERAGE, B. L. et al. Biogenesis of bacterial membrane vesicles. **Molecular Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 1395–1407, jun. 2009.

DHEYAB, M. A. et al. Monodisperse Gold Nanoparticles: A Review on Synthesis and Their Application in Modern Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, p. 7400, 2 jul. 2022.

DI MITRI, D. et al. Re-education of Tumor-Associated Macrophages by CXCR2 Blockade Drives Senescence and Tumor Inhibition in Advanced Prostate Cancer. **Cell Reports**, v. 28, n. 8, p. 2156–2168.e5, 20 ago. 2019.

DURÁN, N. et al. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 1030–1045, 1 set. 2016.

DURÁN, N.; MENCK, C. F. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 201–222, 2001.

AZEVEDO, P. A. A. et al. Detection of virulence and β -lactamase encoding genes in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 49 Suppl 1, p. 224–228, nov. 2018.

DI MITRI, D. et al. Re-education of Tumor-Associated Macrophages by CXCR2 Blockade Drives Senescence and Tumor Inhibition in Advanced Prostate Cancer. **Cell Reports**, v. 28, n. 8, p. 2156–2168.e5, 20 ago. 2019.

EHUWA, O.; JAISWAL, A. K.; JAISWAL, S. Salmonella, Food Safety and Food Handling Practices. **Foods**, v. 10, n. 5, p. 907, 21 abr. 2021.

ILYAS, B.; TSAI, C. N.; COOMBES, B. K. Evolution of Salmonella-Host Cell Interactions through a Dynamic Bacterial Genome. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 428, 2017.

- FALCONE, I. et al. Tumor Microenvironment: Implications in Melanoma Resistance to Targeted Therapy and Immunotherapy. **Cancers**, v. 12, n. 10, p. 2870, 6 out. 2020.
- FALLEN, M. et al. M1 and M2 macrophages' clinicopathological significance in cutaneous melanoma. **Melanoma Research**, v. 27, n. 3, p. 200–210, jun. 2017.
- FERREIRA, C. V. et al. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. **Blood**, v. 104, n. 5, p. 1459–1464, 1 set. 2004.
- FÜLLER, J. J. et al. Biosynthesis of Violacein, Structure and Function of l-Tryptophan Oxidase VioA from *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 38, p. 20068–20084, 16 set. 2016.
- GONÇALVES, P. R. et al. Violacein induces death of RAS-mutated metastatic melanoma by impairing autophagy process. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 37, n. 10, p. 14049–14058, out. 2016.
- GUJRATI, V. et al. Bioengineered bacterial vesicles as biological nano-heaters for optoacoustic imaging. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1114, 7 mar. 2019.
- HABIB, S.; ALI, A. Biochemistry of nitric oxide. **Indian journal of clinical biochemistry: IJCB**, v. 26, n. 1, p. 3–17, jan. 2011.
- HAKVÅG, S. et al. Violacein-producing *Collimonas* sp. from the sea surface microlayer of coastal waters in Trøndelag, Norway. **Marine Drugs**, v. 7, n. 4, p. 576–588, 12 nov. 2009.
- HASHIMI, S. M.; XU, T.; WEI, M. Q. Violacein anticancer activity is enhanced under hypoxia. **Oncology Reports**, v. 33, n. 4, p. 1731–1736, 1 abr. 2015.
- HUANG, Y. et al. Autophagy Participates in Lysosomal Vacuolation-Mediated Cell Death in RGNNV-Infected Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.
- JARVIK, T. et al. Short-Term Signatures of Evolutionary Change in the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium 14028 Genome. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 2, p. 560–567, jan. 2010.

JIANG, L. et al. A bacterial extracellular vesicle-based intranasal vaccine against SARS-CoV-2 protects against disease and elicits neutralizing antibodies to wild-type and Delta variants. **bioRxiv: The Preprint Server for Biology**, p. 2021.06.28.450181, 1 fev. 2022.

JORGE, N. A. N. et al. Poor clinical outcome in metastatic melanoma is associated with a microRNA-modulated immunosuppressive tumor microenvironment. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, p. 56, 5 fev. 2020.

KAIMALA, S. et al. *Salmonella*-mediated tumor regression involves targeting of tumor myeloid suppressor cells causing a shift to M1-like phenotype and reduction in suppressive capacity. **Cancer immunology, immunotherapy: CII**, v. 63, n. 6, p. 587–599, jun. 2014.

KAPARAKIS-LIASKOS, M.; FERRERO, R. L. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. **Nature Reviews. Immunology**, v. 15, n. 6, p. 375–387, jun. 2015.

KIM, O. Y. et al. Bacterial outer membrane vesicles suppress tumor by interferon- γ -mediated antitumor response. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 626, 20 set. 2017.

KIM, Y. J. et al. The Natural Pigment Violacein Potentially Suppresses the Proliferation and Stemness of Hepatocellular Carcinoma Cells In Vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 10731, jan. 2021.

KLOUWENS, M. J. et al. Vaccination with meningococcal outer membrane vesicles carrying *Borrelia* OspA protects against experimental Lyme borreliosis. **Vaccine**, v. 39, n. 18, p. 2561–2567, 28 abr. 2021.

KUERBAN, K. et al. Doxorubicin-loaded bacterial outer-membrane vesicles exert enhanced anti-tumor efficacy in non-small-cell lung cancer. **Acta Pharmaceutica Sinica. B**, v. 10, n. 8, p. 1534–1548, ago. 2020.

LA, M.; RC, P.; DR, C. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. **Journal of extracellular vesicles**, v. 3, 8 abr. 2014.

LEAL, A. M. DE S. et al. Violacein induces cell death by triggering mitochondrial membrane hyperpolarization in vitro. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 115, 6 jun. 2015.

LEE, A. Y.; BRADY, M. S. Neoadjuvant immunotherapy for melanoma. **Journal of Surgical Oncology**, v. 123, n. 3, p. 782–788, 2021.

LI, Y. et al. Bacterial Outer Membrane Vesicles Presenting Programmed Death 1 for Improved Cancer Immunotherapy via Immune Activation and Checkpoint Inhibition. **ACS nano**, 24 nov. 2020.

LUKE, J. J. et al. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 14, n. 8, p. 463–482, ago. 2017.

MACDONALD, I. A.; KUEHN, M. J. Offense and defense: microbial membrane vesicles play both ways. **Research in Microbiology**, Microbial devices for cell-cell and cell-surface interactions. v. 163, n. 9, p. 607–618, 1 nov. 2012.

MARTILE, M. D. et al. Melanoma-specific bcl-2 promotes a protumoral M2-like phenotype by tumor-associated macrophages. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 8, n. 1, p. e000489, 1 abr. 2020.

MARTINS, D. et al. Antitumoral activity of L-ascorbic acid-poly- D,L-(lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 77–85, 2 fev. 2010.

MASARUDIN, M. J. et al. Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: application to the passive encapsulation of [14C]-doxorubicin. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 8, p. 67–80, 11 dez. 2015.

MASUELLI, L. et al. Violacein, an indole-derived purple-colored natural pigment produced by *Janthinobacterium lividum*, inhibits the growth of head and neck carcinoma cell lines both in vitro and in vivo. **Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 3705–3717, mar. 2016.

MCBROOM, A. J. et al. Outer Membrane Vesicle Production by *Escherichia coli* Is Independent of Membrane Instability. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 15, p. 5385–5392, ago. 2006.

MENDT, M. et al. Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer. **JCI insight**, v. 3, n. 8, p. 99263, 19 abr. 2018.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55–63, 16 dez. 1983.

NATH, N.; KASHFI, K. Tumor associated macrophages and ‘NO’. **Biochemical Pharmacology, Nitric Oxide in Cancer and Beyond**. v. 176, p. 113899, 1 jun. 2020.

NEVERMANN, J. et al. Identification of Genes Involved in Biogenesis of Outer Membrane Vesicles (OMVs) in *Salmonella enterica* Serovar Typhi. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 104, 2019.

O'DONOGHUE, E. J.; KRACHLER, A. M. Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 1508–1517, 2016.

PANTANELLA, F. et al. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 4, p. 992–999, abr. 2007.

PASTOR, Y. et al. Towards a subunit vaccine from a *Shigella flexneri* Δ tolR mutant. **Vaccine**, v. 36, n. 49, p. 7509–7519, 26 nov. 2018.

PATTON, E. E. et al. Melanoma models for the next generation of therapies. **Cancer Cell**, v. 39, n. 5, p. 610–631, 10 maio 2021.

PAYNTER, J. et al. Effectiveness of a Group B Outer Membrane Vesicle Meningococcal Vaccine in Preventing Hospitalization from Gonorrhea in New Zealand: A Retrospective Cohort Study. **Vaccines**, v. 7, n. 1, p. E5, 5 jan. 2019.

PENG, L.-H. et al. Engineering bacterial outer membrane vesicles as transdermal nanoplatforms for photo-TRAIL-programmed therapy against melanoma. **Science Advances**, v. 6, n. 27, p. eaba2735, 3 jul. 2020.

PÉREZ JORGE, G. et al. p53 gene delivery via a recombinant *Salmonella enterica* Typhimurium leads to human bladder carcinoma cell death in vitro. **Letters in Applied Microbiology**, 23 jun. 2022.

PERROTTA, C. et al. Nitric Oxide Generated by Tumor-Associated Macrophages Is Responsible for Cancer Resistance to Cisplatin and Correlated With Syntaxin 4 and Acid Sphingomyelinase Inhibition. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1186, 2018.

QING, S. et al. Biomineralized Bacterial Outer Membrane Vesicles Potentiate Safe and Efficient Tumor Microenvironment Reprogramming for Anticancer Therapy. **Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)**, v. 32, n. 47, p. e2002085, nov. 2020.

ROCHE, S. M. et al. *Salmonella* Typhimurium Invalidated for the Three Currently Known Invasion Factors Keeps Its Ability to Invade Several Cell Models. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 2018.

SASIDHARAN, A. et al. Antifungal activity of violacein purified from a novel strain of *Chromobacterium* sp. NIIST (MTCC 5522). **Journal of Microbiology (Seoul, Korea)**, v. 53, n. 10, p. 694–701, out. 2015.

SCHWECHHEIMER, C.; KUEHN, M. J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 605–619, out. 2015.

SIMICZYJEW, A. et al. The Influence of Tumor Microenvironment on Immune Escape of Melanoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8359, 7 nov. 2020.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TASDOGAN, A. et al. Metabolic heterogeneity confers differences in melanoma metastatic potential. **Nature**, v. 577, n. 7788, p. 115–120, jan. 2020.

VANAJA, S. K. et al. Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1106–1119, 19 maio 2016.

VENEGAS, F. A. et al. The Bacterial Product Violacein Exerts an Immunostimulatory Effect Via TLR8. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13661, 20 set. 2019.

VERINAUD, L. et al. Violacein Treatment Modulates Acute and Chronic Inflammation through the Suppression of Cytokine Production and Induction of Regulatory T Cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0125409, 4 maio 2015.

YADA, S. et al. Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. **Marine Biotechnology (New York, N.Y.)**, v. 10, n. 2, p. 128–132, abr. 2008.

YANG, J. et al. Bacterial Outer Membrane Vesicle-Mediated Cytosolic Delivery of Flagellin Triggers Host NLRC4 Canonical Inflammasome Signaling. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

YANG, L. H. et al. Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from a marine sponge. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 625–630, jun. 2007.

ZHOU, J. et al. Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, n. 8, p. 4854–4865, ago. 2019.

CONCLUSÃO GERAL

Capítulo I.

- A entrega de *p53* por *S. enterica* Typhimurium χ 11218 leva a expressão eucariota da proteína *p53* WT
- O tratamento com *p53* entregue por χ 11218 diminuiu significativamente a viabilidade de células cancerígenas da bexiga humana de maneira dose-dependente. Este estudo demonstra a aplicabilidade da cepa χ 11218 atenuada como vetor para plasmídeos de DNA que expressam genes supressores de tumor.

Capítulo II.

- Os mutantes de *S. enterica* Typhimurium Δ *tolRA* e Δ *ihfABpmi* são atenuados no modelo de *Galleria mellonella* e são capazes de invadir e replicar em células tumorais de melanoma e câncer de bexiga.
- O tratamento com o mutante Δ *ihfABpmi* reduziu completamente a massa de tumores de melanoma.
- A resposta terapêutica bem-sucedida induzida pelo tratamento com Δ *ihfABpmi* foi acompanhada pela polarização de macrófagos ao fenótipo antitumoral M1. A alteração de M2 a M1 também foi acompanhada pelo aumento significativo de mRNA de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, iNOS) e o gene pro apoptótico Bax.
- Nossos resultados sugerem que Δ *ihfABpmi* tem equilíbrio entre atenuação e eficácia antitumoral e que exerce sua atividade antitumoral induzindo a infiltração de macrófagos e a reprogramação do microambiente tumoral imunossuprimido a imunoativo.
- nosso estudo proporciona evidências de que as cepas atenuadas de *S. enterica* Typhimurium desenvolvidas neste estudo podem ser usadas como imunoterapêuticos contra o câncer.

Capítulo III.

- As OMVs carregas de violaceína diminuíram a viabilidade de células de melanoma *in vitro* e entregaram violaceína no citosol dessas células.
- O tratamento de camundongos portadores de tumores B16F10 com *tolRAvio*-OMV e *tolRA*-OMV esteve associado a regressão tumoral, sendo que o tratamento com *tolRAvio*-

OMV mostrou-se mais eficaz como agente antitumoral e na ativação da resposta imune, do que o tratamento com vesículas sem violaceína.

- A resposta antitumoral mediada por OMVs foi mediada pela infiltração de macrófagos no tecido tumoral e pela reprogramação do microambiente tumoral, caracterizadas pela polarização de macrófagos ao fenótipo M1 e a superexpressão de mRNA de mediadores antitumorais.
- Nossos resultados sugerem que OMVs podem ser usadas como nanocarregadores de agentes antineoplásicos altamente hidrofóbicos como a violaceína,

PERSPECTIVAS PARA A PESQUISA

- Eliminar as resistências no triplo mutante *S. enterica* Typhimurium $\Delta ihfABpmi$;
- Analisar a histopatologia de órgãos principais de camundongos tratados com *S. enterica* Typhimurium $\Delta ihfABpmi$ e OMV (carregadas e não carregadas de violaceína);
- Quantificar citocina proinflamatórias em circulação de camundongos tratados com *S. enterica* Typhimurium $\Delta ihfABpmi$ e OMVs (carregadas e não carregadas de violaceína);
- Quantificar a produção de citocinas em tecido tumoral em diferentes tempos depois do tratamento com *S. enterica* Typhimurium $\Delta ihfABpmi$ e OMVs (carregadas e não carregadas de violaceína);
- Analisar a infiltração de macrófagos intratumorais em diferentes tempos depois do tratamento com *S. enterica* Typhimurium $\Delta ihfABpmi$ e OMVs (carregadas e não carregadas de violaceína);
- Construir o mutante *S. enterica* Typhimurium $\Delta tolRA \Delta msbB$ e avaliar a eficácia antitumoral de OMVs derivadas, carregadas e não carregadas de violaceína

ANEXOS

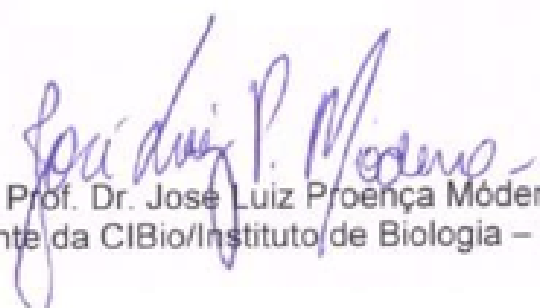


INFORMAÇÃO

INFORMAMOS que o projeto CIBio/IB No. 2009/1 – “*Salmonella enterica*: Caracterização Fenotípica, Molecular e Uso Biotecnológico de Mutantes”, cujo pesquisador responsável é o Prof. Dr. Marcelo Brocchi, sub-projeto “Mutantes atenuados de *Salmonella enterica* como carreadoras de moléculas heterólogas”, da pós-graduanda Genesy Pérez, encontra-se devidamente aprovado e regularizado junto a CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio, conforme legislação vigente.

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”,

18 de agosto de 2020.



Prof. Dr. Jose Luiz Proença Modena
Presidente da CIBio/Instituto de Biologia – UNICAMP

CIBio/IB-Unicamp
Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - Unicamp
Caixa Postal 6109 - 13083-970 Campinas SP
Tel.: (19) 3521-6359 – e-mail: comisib@unicamp.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da atividade antitumoral de vesículas de membrana externa careadoras de violaceína**, registrada com o nº **5820-1(A)/2021**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marcelo Brocchi e Genesy Perez**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **28/10/2021**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/10/2021 a 10/05/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	28/10/2021 a 10/05/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Origem:	Biotério
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério do Laboratório de Doenças Tropicais, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **23 de novembro de 2021**.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosangela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada **Atividade antitumoral de mutantes atenuados de Salmonella e vesículas de membrana externa careadoras de violaceína**, registrada com o nº **5895-1/2021**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marcelo Brocchi e Genesys Perez Jorge**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **28/10/2021**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/12/2021 a 01/07/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	28/10/2021 a 01/07/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10

Informar código 531B4AD1 F7464E8F BC852324 5DAC4308
CERTIFICADO CEUA nº 262/2021

Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Origem:	Biotério
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério do Laboratório de Doenças Tropicais, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **23 de novembro de 2021.**

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código 531B4AD1 F7464E8F BC852324 5DAC4308

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, PRESIDENTE DA CEUA/UNICAMP**, em 25/11/2021, às 18:53 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA DA CEUA/UNICAMP**, em 24/11/2021, às 16:33 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador:
531B4AD1 F7464E8F BC852324 5DAC4308





CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da atividade antitumoral de vesículas de membrana externa careadoras de violaceína**, registrada com o nº **5820-1/2021**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marcelo Brocchi e Genesys Perez**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **15/07/2021**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	02/08/2021 a 10/05/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	15/07/2021 a 10/05/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	10
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	10 Fêmeas
Origem:	Biotério
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério do Laboratório de Doenças Tropicais, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **18 de agosto de 2021.**

Prof. Dr. Wagner José Fávaro

Presidente

Rosangela dos Santos

Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código 05A64E8B F1454ADC 810B3B1F 91CEFDDB



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da atividade antitumoral de mutantes atenuados de Salmonella e vesículas de membrana externa careadoras de violaceína**, registrada com o nº **5769-1/2021**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marcelo Brocchi e Genesy Perez**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo

Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas CEUA/UNICAMP**, em reunião de **20/05/2021**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	20/07/2021 a 25/05/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	20/05/2021 a 25/05/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	7
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	7
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	7
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	7
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	7
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas

Informar código D8FB36FE D3F04899 89AD94E2 CAA72DAC
CERTIFICADO CEUA nº 128/2021

Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	7
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	7
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	7
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	7
Idade/Peso:	5.00 Semanas / 22.00 Gramas
Sexo:	7 Fêmeas
Origem:	Biotério
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério do Laboratório de Doenças Tropicais, IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 23 de junho de 2021.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro

Presidente

Rosangela dos Santos

Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Documento assinado eletronicamente por **WAGNER JOSE FAVARO, COORDENADOR CEUA/UNICAMP**, em 23/06/2021, às 19:06 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

Documento assinado eletronicamente por **ROSANGELA DOS SANTOS, SECRETÁRIA EXECUTIVA CEUA/UNICAMP**,



D8FB36FE D3F04899 89AD94E2 CAA72DAC



em 24/06/2021, às 09:59 horas, conforme Art. 10 § 2º da MP 2.200/2001 e Art. 1º da Resolução GR 54/2017.

A autenticidade do documento pode ser conferida no site:
sigad.unicamp.br/verifica, informando o código verificador: