1. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

KAUAN RIBEIRO DE SENA GOMES

Aplicação de Biologia Sintética na construção de circuito genético para melhorar o efeito antitumoral da *Salmonella* spp.

Ribeirão Preto

2020

KAUAN RIBEIRO DE SENA GOMES

**Aplicação de Biologia Sintética na construção de circuito genético para
melhorar o efeito antitumoral da *Salmonella* spp.**

Versão original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Rafael Silva-Rocha

Ribeirão Preto

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Gomes, Kauan Ribeiro de Sena

Aplicação de Biologia Sintética na construção de circuito genético para melhorar o efeito antitumoral da *Salmonella* spp. Ribeirão Preto, 2020.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Silva-Rocha, Rafael

1. Biologia Sintética. 2. Biologia Molecular. 3. Câncer. 4. Terapia Celular.

Nome: GOMES, Kauan Ribeiro de Sena Gomes

Título: Aplicação de Biologia Sintética na construção de circuito genético para melhorar o efeito antitumoral da *Salmonella* spp.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha mãe, Rita de Cássia Ribeiro de Sena, por ser uma força da natureza ao me apoiar e sempre me incentivar a perseguir os meus objetivos e nunca deixar de sonhar grande; e ao meu pai, Jorge Gomes da Silva, por me aconselhar nos momentos mais importantes e, além de pai, sempre foi um grande amigo com quem eu sempre pude contar.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer ao meu orientar, o Professor Dr. Rafael Silva-Rocha. Sou extremamente grato pelo acolhimento em seu laboratório, por abrir as portas da área pela qual eu me apaixonei, por me ensinar através do exemplo, sendo sempre um orientador íntegro, admirável, com enormes aspirações profissionais, pessoais e acadêmicas que me serviram de enorme inspiração, e, acima de tudo, pela paciência em me ajudar durante essa trajetória, em todos os percalços, extravagâncias, momentos de descontração, e até nos atritos e nas chamadas de atenção. Acredito que somos sempre marcados pelas grandes pessoas que impactam a nossa vida, e por isso, reconheço o tamanho do crescimento que eu pude experimentar durante esse tempo sob a sua tutela ao aprender tanto contigo.

Em terceiro, gostaria de agradecer àqueles que sem os quais eu não teria chegado até aqui, todos os membros do Laboratório de Biologia de Sistemas e Sintética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto: Adriano, Ananda, Bianca, Bruno, Felipe, Greicy, Larwsk, Juliana, Leo, Luísa, Murilo e Nina.

Em especial, agradeço à pessoa que mais me ajudou nessa jornada acadêmica, cuja paciência e amizade me ofereceram o maior crescimento nessa jornada e que se tornou uma das pessoas mais queridas à mim em todo o mestrado. Lummy, esse trabalho é tão seu quanto meu, sem você eu ainda estaria perdido procurando entender o que são transformações e como me organizar num laboratório.

Juntamente, agradeço a todos do Laboratório de Metagenômica Funcional. Ana, Carol, Gabs (G2), Guilherme, Ítalo, Luana, Lucas, Tiago e Profa. Dra. Maria Eugênia, todos sempre foram maravilhosos comigo. Agradeço enormemente a amizade e o apoio ao longo desses anos durante esse trabalho.

Gostaria de agradecer à University of Toronto, ao Prof. David McMillen e ao seu laboratório, em especial ao Zhe, em que eu encontrei um verdadeiro amigo, ao Alex, que abraçou esse agente brasileiro no seu projeto, me ensinando tanto acerca de ciência quanto sobre o lado divertido da vida, à Kath, que me mostrou que as coisas por lá não são tão diferentes das daqui, ao Louis, que foi um exemplo de conduta e profissionalismo, ao Emil, que sempre se prestou a mostrar interesse pelos outros a sua volta, e a todos os companheiros da pós-graduação da UTM que tornaram o meu tempo no Canadá o mais prazeroso possível.

Adicionalmente, gostaria de incluir um parágrafo especial ao Murilo, o qual se tornou um dos meus melhores amigos da vida e um companheiro para todas as horas, sejam claras ou escuras, seja para beber, conversar ou só estar lá. Grande parte de todo o crescimento que obtive foi devido à sua amizade.

E não menos importante, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo (de quem fui bolsista sob os processos número 18/03274-8 e 19/00478-4), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro cujo sem o qual este trabalho não teria sido possível de ser realizado.

RESUMO

GOMES, Kauan Ribeiro de Sena Gomes. **Aplicação de Biologia Sintética na construção de circuito genético para melhorar o efeito antitumoral da *Salmonella* spp.** 2020. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A engenharia e construção de uma máquina biológica, desenhada para desenvolver uma atividade terapêutica, como o combate de células malignas, e projetada para atuar dentro do espaço complexo de um indivíduo vivo, exige a concatenação de uma intrincada rede de processos biológicos, internos e externos. Esses processos têm sido descritos e anotados utilizando uma nova abordagem científica que emprega a mesma lógica de sistemas eletroeletrônicos de computação aos sistemas biológicos naturais. Essa nova área da biotecnologia, cunhada de Biologia Sintética, busca obter construções genéticas capazes de imbuir organismos vivos com novas funcionalidades, obedecendo a um perfil de funcionamento definido, robusto e preciso. As bactérias são microrganismos capazes de responderem às mudanças ambientais alterando os conjuntos de genes ativados para expressar proteínas ou acionar vias metabólicas importantes à resposta de adaptação às novas condições externas encontradas. Assim, por meio dos métodos oferecidos pela Biologia Sintética, nosso trabalho buscou acoplar elementos genéticos capazes de detectar níveis extracelulares de oxigênio a um circuito genético contendo uma cascata de regulação que restringe a ativação de nosso agente recombinante a sítios de hipóxia, como os presentes em massas tumorais sólidas, junto da presença de um agente externo com propriedades farmacológicas apropriadas para uma aplicação clínica. Utilizando um regulador genético desenvolvido pelo nosso grupo, conseguimos construir um circuito capaz de responder à presença de aspirina, um fármaco clinicamente seguro e com extenso histórico de uso, e selecionamos promotores candidatos a reconhecerem baixos níveis de oxigênio como sinal fisiopatológico para estabelecer uma porta lógica AND que permitisse maior segurança e seletividade ao uso de agentes microbianos como ferramentas terapêuticas de combate ao câncer. A validação da resposta do nosso circuito à condição de hipóxia *in vitro* se provou desafiadora, dado à miríade de fatores que

influenciam no funcionamento de novas partes genéticas, como promotores induzíveis, em construções sintéticas fora do seu contexto nativo, entretanto o trabalho oferece um exemplo de abordagem simples e econômica para investigar sensores biológicos de anaerobiose por meio da expressão de proteínas repórteres.

Palavras-chave: biologia sintética, biologia molecular, câncer, terapia celular, *salmonella* spp.

ABSTRACT

GOMES, Kauan Ribeiro de Sena Gomes. **Application of Synthetic Biology in the construction of a genetic circuit to improve the anti-tumor effect of *Salmonella* spp.** 2020. 91 p. Dissertation (Master of Science) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto.

The engineering and construction of a biological machine, designed to develop a therapeutic activity, such as the fight against malignant cells, and designed to act within the complex space of a living individual, requires the concatenation of an intricate network of biological processes, internal and external. These processes have been described and annotated using a new scientific approach that employs the same logic as electronic computing systems to biological natural systems. This new biotechnological field, coined as Synthetic Biology, seeks to obtain genetic constructions capable of imbuing living organisms with new functionalities, obeying a defined, robust and precise blueprint. Bacteria are microorganisms capable of responding to environmental cues by changing the sets of genes required for proteins expression or triggering important metabolic pathways involved in the adaptative response to the new external conditions. Thus, through the methods offered by Synthetic Biology, our work sought to couple genetic elements capable of detecting extracellular oxygen levels to a genetic circuit containing a regulatory cascade that restricts the activation of our recombinant agent to hypoxic sites, such as those present in solid tumors, together with the presence of an external pharmacological agent appropriate for clinical application. Using a genetic regulator developed by our group, we were able to build a circuit capable of responding to the presence of aspirin, a clinically safe drug with an extensive history of use, and we selected promoters candidates to recognize low levels of oxygen as a pathophysiological signal to establish a logic AND gate that would allow greater safety and selectivity in the use of microbial agents as therapeutic tools to fight cancer. The *in vitro* validation of the response of our circuit to the condition of hypoxia has proved challenging, given the myriad of factors that influence the functioning of new genetic parts, such as inducible promoters, in synthetic constructs outside their native context, however the work offers an example of a simple and economical approach to investigate biological anaerobic sensors through the expression of reporter proteins.

Keywords: synthetic biology, molecular biology, cancer, cell therapy, *salmonella* spp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquematização de respostas celulares personalizadas, aproveitando a modularidade inerente à sinalização celular e às redes genéticas regulatórias.....	17
Figura 2. Interruptores e osciladores que ocorrem em sistemas eletrônicos também são vistos na biologia e foram projetados em sistemas biológicos sintéticos.....	19
Figura 3. Esquematização da função lógica do circuito sintético responsivo à hipóxia e aspirina.	24
Figura 4. Sistemas de gatilhos externos.	27
Figura 5. Exemplos de estratégias para administração terapêutica bacteriana.	29
Figura 6. Mecanismos bacterianos antitumorais.	33
Figura 7. Plasmídeos utilizados nesse estudo.	40
Figura 8. Esquema do promotor sintético $P_{FNR2.3}$ mostrando o fator de transcrição FNR ligado ao seu sítio de ligação (CGTTGATCATGATCAA) e os sítios -35 e -10 de reconhecimento aos fatores sigma.....	42
Figura 9. Esquematização da estratégia de clonagem para inserir o promotor $P_{FNR2.3}$ no vetor 1 (pMR1-XylS-Pm-A111V).	43
Figura 10. Esquema da estratégia de substituição dos genes repórteres no circuito P_{FNR} -XylS-Pm-'Efetor'.....	45
Figura 11. Esquema do processo de obtenção da biblioteca dos plasmídeos com a coleção de promotores induzíveis (fdhF, fdhFmut, HIP-opt e pepT) e constitutivos (pJ100, pJ106, pJ113 e pJ114).....	46
Figura 12. Sistema de incubação doméstico para (A) cultivo em hipóxia, composta por (i) câmara hermética, (ii) sachê com reagente para consumo do oxigênio interno e (iii) placa de 96 poços com inóculos em meio M9 Cas amino-ácido; e (B) controle em normóxia, com mesmo inóculo.....	48
Figura 13. A, Representação geral do plasmídeo pMR1 contendo o gene <i>xyIS</i> . B, diferentes construções obtidas dependendo da inclusão do promotor P_{FNR} à montante do gene <i>xyIS</i> e do gene repórter usado.	50
Figura 14. A, Eletroforese em gel de agarose 1% TAE da reação de digestão do vetor (A) pMR1- P_{FNR} -XylS-Pm com as enzimas EcoRI e BamHI, com o cassete P_{FNR} -XylS-Pm.	51

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 1% TAE da reação de digestão com as enzimas EcoRI e BamHI para confirmação das células transformadas com o vetor pMR1-XylS-FbFP.....	52
Figura 16. Curva de crescimento de células de <i>E. coli</i> carregando as construções listadas na Tabela 6.	54
Figura 17. Atividade dos circuitos sintéticos com GFP como gene repórter em <i>E. coli</i>	55
Figura 18. Atividade dos circuitos sintéticos com GFP como gene repórter em <i>Salmonella</i> spp. Typhimurium...	56
Figura 19. Atividade dos circuitos sintéticos com FbFP como gene repórter em <i>E. coli</i>	57
Figura 20. Atividade dos circuitos sintéticos com FbFP como gene repórter em <i>Salmonella</i>	58
Figura 21. Eletroforese em gel de agarose 1% TAE da reação de digestão com as enzimas KpnI e XhoI para confirmação das células transformadas com o vetor pMR1-P _{FNR} -FbFP.....	61
Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 1% TAE da reação de digestão com as enzimas KpnI e XhoI para confirmação das células transformadas com o vetor pMR1-P _{FNR} -GFP.....	61
Figura 23. Eletroforese em gel de agarose 1% TAE da reação de PCR de colônia para confirmação de clones positivos usando primers para amplificar o cassete P _{FNR} -Repórter (FbFP ou GFP).....	62
Figura 24. Nível de expressão dos promotores constitutivos controlando a expressão do gene repórter GFP em (a) condição controle de Normóxia e (b) Hipóxia ao longo de 48 horas.	63
Figura 25. Nível de expressão dos potenciais promotores induzíveis controlando a expressão do gene repórter GFP em (a) condição controle de Normóxia e (b) Hipóxia ao longo de 48 horas.	63
Figura 26. Nível de expressão dos promotores constitutivos controlando a expressão do gene repórter FbFP em (a) condição controle de Normóxia e (b) Hipóxia ao longo de 48 horas.	64
Figura 27. Nível de expressão dos potenciais promotores induzíveis controlando a expressão do gene repórter FbFP em (a) condição controle de Normóxia e (b) Hipóxia ao longo de 48 horas.....	64
Figura 28. Multiplicidade (<i>fold change</i>) da ativação da expressão dos promotores induzíveis em hipóxia em relação à condição de normóxia (H/N) nos vários tempos de medição.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Segundo grupo de promotores usados para avaliar expressão sob condições de hipóxia.	41
Tabela 2	Oligonucleotídeos utilizados para a montagem dos circuitos sintéticos.	44
Tabela 3	Sequência do fragmento de DNA dupla (gBlock) com o gene FbFP de <i>E. coli</i>	45
Tabela 4	Lista dos vetores usados para transformar a linhagem de <i>Salmonella</i> spp. Typhimurium.	52
Tabela 5	Lista de promotores candidatos a induzir a ativação do circuito em resposta à condição de hipóxia...	59
Tabela 6	Lista de construções obtidas para caracterização dos promotores induzíveis por hipóxia.....	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Programabilidade biológica	14
1.2	Circuitos genéticos	18
1.3	Controle da resposta biológica	20
1.3.1	CRISPR	21
1.3.2	Fatores de transcrição sintéticos	22
1.4	Aplicação terapêutica	27
1.5	Propriedades Antitumorais Bacterianas	31
2	OBJETIVOS	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	Linhagens e meios de cultura	39
3.2	Plasmídeos e partes utilizadas	39
3.2.1	Segunda coleção de Promotores de hipóxia	40
3.3	Construções e clonagens	42
3.4	Construção vetores de caracterização dos novos promotores	45
3.5	Curva de crescimento e análise da expressão gênica	47
3.5.1	Circuito XylS	47
3.6	Sistema de hipóxia	47
3.7	Análise dos dados	49
4	RESULTADOS	50
4.1	Circuito XylS FNR	50
4.2	Caracterização do circuito XylS- <i>Pm</i> em <i>E. coli</i> & <i>Salmonella</i>	52
4.3	Clonagem dos promotores pepT, HIP-opt, fdhF, fdhF-mut	59
4.4	Caracterização dos promotores pepT, HIP-opt, fdhF, fdhF-mut	62
5	DISCUSSÃO	66
6	CONCLUSÃO	77
7	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

A partir dos estudos de Jacob e Monod, em que os processos celulares fundamentais, como diferenciação e regulação proteica, foram apontados como decorrentes de vias de sinalização encriptadas a nível genético (JACOB; MONOD, 1961), pôde-se endereçar os principais agentes responsáveis pela rede de processamento, regulação e resposta aos estímulos externos, como também a própria manutenção da homeostasia interna, na forma dos elementos genéticos codificados na estrutura da dupla fita de DNA. Por meio de padrões de estruturas físicas derivadas da organização tridimensional das bases do DNA (A, T, C e G), as quais são reconhecidas por outras biomoléculas, como proteínas ou complexos ribonucleicos, é possível caracterizar sequências próprias dotadas de funções específicas que compõe os processos fundamentais da biologia molecular, como transcrição e tradução (BROWNING; BUSBY, 2004). A partir da combinação desses elementos genéticos e suas interações com agentes moleculares de outras camadas de regulação, dispostos em níveis hierárquicos discretos, pode-se definir a malha de processamento de informação, indo da captação de um sinal ou estímulo, até a resposta fenotípica macroscópica, atendendo às demandas de seu contexto (MARCHISIO, 2008; RODRIGO, 2011; KOSURI, 2013; BRADLEY, 2016). Um dos elementos genéticos com papel central nesse processo de receber um sinal de entrada e oferecer uma resposta, computando uma ação em concordância com a necessidade do sistema, é o promotor genético. Como peça fundamental na transcrição, o promotor permite a ligação de fatores de transcrição capazes de recrutar a maquinaria para a síntese de RNA, e é capaz de ditar a ativação ou não de um gene ou conjunto de genes determinantes para qualquer estado fenotípico do sistema celular (ALPER et al., 2005; BLAZECK; ALPER, 2013). Dessa forma, a engenharia e construção de um sistema biológico responsivo a condições e sinais específicos, exige a determinação e coleta de partes genéticas que respondam a estímulos caracterizados dentro da aplicação a que ele se destina (PURNICK & WEISS, 2009).

1.1 Programabilidade biológica

Os avanços recentes envolvendo a engenharia de sistemas vivos complexos utilizando paradigmas teóricos das ciências da computação e outras áreas da

engenharia, agora aplicados à montagem de moléculas biológicas, constituiu a fundação para um novo campo da biotecnologia, conhecido como biologia sintética (ENDY, 2005). Foi por meio da descoberta da lógica matemática na regulação de genes na década de 1960, como por exemplo, o operon *lac*, por Monod e Jacob (1961) e as primeiras conquistas em engenharia genética que ocorreram na década de 1970, como a tecnologia de DNA recombinante, que abriram o caminho para esse novo campo. A biologia sintética amplia o espírito da engenharia genética para se concentrar em sistemas inteiros de genes e produtos gênicos, e não simplesmente a substituição única de elementos genéticos e sua avaliação funcional (PURNICK; WEISS, 2009; PEI; SCHMIDT, 2018). O objetivo da biologia sintética é ampliar ou modificar o comportamento natural dos organismos e projetá-los para executar novas tarefas.

Uma analogia útil para conceituar o objetivo e os métodos da biologia sintética é a hierarquia da engenharia da computação, dentro da qual cada parte constituinte é incorporada em um sistema mais complexo que fornece seu contexto (ANDRIANANTOANDRO, 2006). O design do novo comportamento ocorre de cima para baixo, com o topo da hierarquia em mente, mas é implementado de baixo para cima, a partir de seus componentes mais básicos. Na parte inferior da hierarquia estão DNA, RNA, proteínas e outras biomoléculas (lipídios e carboidratos, aminoácidos e nucleotídeos), análogos à camada física de transístores, capacitores e resistores na engenharia de computadores. A próxima camada, a camada do dispositivo, compreende reações bioquímicas que regulam o fluxo de informações e manipulam processos físicos, equivalentes às portas lógicas, responsáveis pelos cálculos em um computador. Na camada do módulo, uma biblioteca diversificada de dispositivos biológicos estabelece caminhos complexos que funcionam como circuitos integrados. A conexão desses módulos entre si e sua integração nas células hospedeiras permite estender ou modificar o comportamento das células de maneira programática (NIELSEN; SEGALL-SHAPIRO; VOIGT, 2013). Embora as células projetadas para operarem independentemente possam executar tarefas de complexidade variada, funções coordenadas mais sofisticadas são possíveis com populações de células que se comunicam, como no caso das redes de computadores (ANDRIANANTOANDRO, 2006).

É útil aplicar muitos conceitos existentes de campos bem estabelecidos das engenharias, incluindo a engenharia de software e elétrica à biologia sintética. Métodos e critérios como padronização, abstração, modularidade, previsibilidade, confiabilidade e uniformidade aumentam bastante a velocidade e a capacidade de rastreamento do construto sintético (PURNICK; WEISS, 2009). No entanto, é preciso ter cuidado ao adotar diretamente métodos e critérios aceitos da engenharia à biologia. Devemos ter em mente que a biologia sintética difere de todas as disciplinas de engenharia anteriores. Dispositivos e módulos biológicos não são objetos independentes e não são construídos na ausência de um meio biológico, pelo contrário, eles normalmente funcionam dentro de um ambiente celular. Quando biólogos sintéticos projetam dispositivos ou módulos, o fazem usando os recursos e máquinas das células hospedeiras, mas no processo também modificam as próprias células. Uma grande preocupação nesse processo é nossa incapacidade atual de prever completamente as funções de dispositivos simples em células projetadas e construir sistemas que executem tarefas complexas com precisão e confiabilidade (KWOK, 2010).

A falta de poder preditivo decorre de várias fontes de incerteza, algumas das quais significam a incompletude das informações disponíveis sobre as características biológicas inerentes das células. Os efeitos do ruído de expressão gênica, mutação, morte celular, ambientes extracelulares indefinidos e alterados, e interações com o contexto celular atualmente nos impedem de projetar células únicas com a mesma confiança com que projetamos computadores para executar tarefas específicas (NANDAGOPAL; ELOWITZ, 2011). No entanto, a maioria das aplicações ou tarefas que definimos em nossos sistemas biológicos sintéticos geralmente são concluídas por uma população de células, e não por uma única célula. Em um sistema sintético, a previsibilidade e a confiabilidade podem ser alcançadas de duas maneiras: estatisticamente utilizando um grande número de células independentes (HASTY et al., 2001; MCMILLEN et al., 2002) ou sincronizando células individuais por meio de comunicação intercelular para tornar cada célula mais previsível e confiável (TABOR et al., 2009). Mais importante, a comunicação intercelular pode coordenar tarefas em populações celulares heterogêneas para obter um comportamento altamente sofisticado (PRINDLE et al., 2012), com alguns sistemas multicelulares capazes de oferecer um certo grau de confiabilidade na execução de tarefas complexas (DIN et al., 2016).

Por meio dessa revolução na ótica dos fundamentos que definem a organização dos sistemas biológicos, o novo campo da Biologia Sintética propõe redefinir a organização natural desses sistemas, decompondo-os em partes e subconjuntos capazes de serem interconvertidos e reagrupados, de maneira a expressarem comportamentos novos e/ou não naturais, não previamente descritos, seguindo as mesmas regras e lógica da engenharia e computação (WEISS, 2003; ANDRIANANTOANDRO, 2006). O entendimento dos processos biológicos a partir dos princípios trazidos por essas outras disciplinas tem permitido combinar a linguagem comumente aplicada a sistemas de controle da engenharia elétrica às redes regulatórias presentes em células procarióticas e eucarióticas, e aperfeiçoar a descrição dos processos moleculares utilizando a simplificação de circuitos lógicos de processamento de informação, nos quais é possível desenhar diagramas como os da **Figura 1** (portas lógicas na parte central), em que a cascata de regulação do nosso sistema é esquematizada na forma de uma porta lógica, a fim de ilustrar a integração de sinais bioquímicos necessários à ativação de uma resposta biológica e passível de ser transplantada em diferentes organismos por meio de técnicas biomoleculares (HASTY, 2002; BROPHY, 2014).

Figura 1. Esquematização de respostas celulares personalizadas, aproveitando a modularidade inerente à sinalização celular e às redes genéticas regulatórias. Células geneticamente modificadas compreendem tipicamente uma cascata de três módulos intercambiáveis, que são: os *sensores*, como quinases ou proteínas receptoras intracelulares (R) para detectar substâncias químicas, ácidos nucleicos, proteínas, luz, pH e calor, etc.; os *circuitos internos de processamento de informação* que integram esses múltiplos sinais de entrada para tomar uma decisão lógica e, finalmente, os *atuadores* de resposta para produzir repórteres, toxinas, produtos químicos, elétrons, motilidade, mudanças de crescimento, etc. Adaptado de WANG; BUCK, 2012.

1.2 Circuitos genéticos

A conectividade em circuito de partes biológicas e sua capacidade de processar coletivamente operações lógicas foram apreciadas pela primeira vez há quase 50 anos (MONOD; JACOB, 1961). Isso inspirou tentativas de descrever esquemas de regulação biológica com modelos matemáticos (KAUFFMAN, 1974; GLASS, 1975) e aplicar analogias de circuitos elétricos a vias biológicas (MCADAMS; SHAPIRO, 1995). Enquanto isso, avanços na pesquisa genômica e na engenharia genética (por exemplo, tecnologia de DNA recombinante) estavam fornecendo o inventário e os métodos necessários para construir e montar fisicamente as peças biomoleculares fundamentais para ascensão dos circuitos genéticos. Como resultado, a biologia sintética nasceu com o objetivo amplo de possibilitar a engenharia ou 'fiação' de circuitos biológicos artificiais para manifestar novas formas lógicas de controle celular (ENDY, 2005). A biologia sintética, equipada com as abordagens como modularização, racionalização e modelagem, progrediu rapidamente e gerou um conjunto cada vez maior de dispositivos genéticos e módulos biológicos (PURNICK; WEISS, 2009). O projeto e a construção bem-sucedidos das primeiras redes genéticas sintéticas - a chave de alternância genética (GARDNER; CANTOR; COLLINS, 2000) e o repressilador (ELOWITZ; LEIBLER, 2000), mostraram que a metodologia baseada em engenharia poderia realmente ser usada para construir um comportamento sofisticado e computacional em sistemas biológicos (**Figura 2**). Nesses dois casos, elementos reguladores transcricionais básicos foram projetados e montados para realizar os equivalentes biológicos de armazenamento de memória e cronometragem, respectivamente. Dentro da estrutura fornecida por esses dois sistemas sintéticos, os circuitos biológicos podem ser construídos a partir de peças menores e bem definidas, de acordo com um design pré-estabelecido seguindo um modelo descritivo do comportamento almejado. Eles podem ser estudados e testados isoladamente, e seu comportamento pode ser avaliado em relação às previsões de modelos da dinâmica do sistema (NANDAGOPAL; ELOWITZ, 2011). Essa metodologia foi aplicada na construção de outros dispositivos biológicos, tais como computadores genéticos (FRIEDLAND ET AL., 2009), elementos de memória (HAM et al., 2008) e osciladores (STRICKER ET AL., 2008), bem como em outros dispositivos genéticos de inspiração eletrônica, incluindo geradores de pulso (BASU et al., 2004), portas lógicas digitais (ANDERSON; VOIGT;

ARKIN, 2007; WIN; SMOLKE, 2008), filtros (BASU et al., 2005; SOHKA et al., 2009) e módulos de comunicação (YOU et al., 2004).

Figura 2. Interruptores e osciladores que ocorrem em sistemas eletrônicos também são vistos na biologia e foram projetados em sistemas biológicos sintéticos. A, a trava de reset-set (RS) com base em portas lógicas NOR é um dispositivo biestável, pois possui dois estados estáveis que podem ser alternados dependendo de entradas especificadas (IPTG ou calor). Após a remoção da entrada, o circuito retém a memória do seu estado atual indefinidamente. B, a cronometragem eletrônica pode ser alcançada com circuitos básicos do oscilador - como o circuito LC (indutor L e capacitor C) - que atuam como ressonadores para produzir sinais eletrônicos periódicos. A cronometragem biológica é obtida com relógios circadianos e circuitos osciladores similares, que se baseiam, entre outros mecanismos reguladores, em ciclos interligados de feedback positivo e negativo dos genes que compõem o loop. Adaptado de KHALIL; COLLINS, 2010; CAMERON; BASHOR; COLLINS, 2014.

Os circuitos genéticos geralmente incluem três módulos funcionais: sensores, processadores e atuadores (**Figura 1**). Os sensores detectam entradas ambientais ou celulares, os processadores determinam a resposta apropriada para as entradas fornecidas e os atuadores transmitem os sinais que modificam a função celular (KHALIL; COLLINS, 2010). Em termos biológicos, um circuito sintético pode incluir regulação transcricional, pós-transcricional e/ou pós-traducional, com componentes como sequências regulatórias de DNA, RNAs não codificantes e proteínas, como fatores de transcrição (PURNICK; WEISS, 2009).

Um desafio fundamental na construção de circuitos genéticos tem sido a falta de partes funcionais que podem operar juntas em uma célula sem diafonia - um recurso importante para a construção de circuitos que exibem comportamento previsível. A maioria dos circuitos sintéticos construídos até o momento usava regulação transcricional e, portanto, nossa capacidade de construir circuitos complexos depende da disponibilidade de fatores de transcrição sintéticos que são eficazes

(capazes de regular seu gene alvo no nível de expressão desejado) e programáveis (capazes de agir em qualquer sequência de destino definida pelo usuário).

1.3 Controle da resposta biológica

Percepções de novos paradigmas mecanicistas no controle da expressão gênica permitiram o aperfeiçoamento dos sistemas de expressão para aplicações de bioprodução, controle e detecção, juntamente com uma maior compreensão da carga sintética e das possibilidades criativas de abordagens de biodesign (NIELSEN et al., 2016). Ferramentas e sistemas contemporâneos de expressão de genes bacterianos conferem um ajuste fino da expressão e uma maior previsibilidade e maximização da função desejada, minimizando efeitos dissonantes daqueles projetados. Esses avanços foram alcançados usando uma miríade de ferramentas reguladoras, operando em todos os níveis do chamado "dogma central" da biologia molecular. A própria evolução forneceu uma série de mecanismos reguladores que operam controlando o fluxo de informações em diferentes níveis (MCADAMS; SRINIVASAN; ARKIN, 2004). Nos últimos anos, houve melhorias na funcionalidade das ferramentas de regulação de genes, aprimorando a regulação de forma mais dinâmica e ajustável (BASHOR; COLLINS, 2018). Obter um equilíbrio entre a demanda bioenergética do sistema sintético implantado e a saúde evolutiva do hospedeiro é importante para uma variedade de aplicações biotecnológicas e para garantir a viabilidade e estabilidade celular do organismo recombinante (BORKOWSKI et al., 2016).

O fardo metabólico associado à integração de circuitos heterólogos é frequentemente causado por falta de ortogonalidade, competição por recursos (LIU et al., 2018; SABI; TULLER, 2019), como ribossomos entre sistemas heterólogos e nativos (DARLINGTON et al., 2018) e até a toxicidade de moléculas de RNAs mensageiros produzidas (MITTAL et al., 2018). No centro de todas as tentativas de equilibrar a demanda com a capacidade celular, é necessário ajustar com precisão o fluxo de informações do DNA ao RNA e às proteínas. Alguns avanços no desenvolvimento de formas de manipulação desse fluxo buscam explorar a capacidade de atuadores sintéticos ou heterólogos para minimizar os efeitos de ruído e excesso de carga metabólica dentro dos sistemas engendrados.

1.3.1 CRISPR

A capacidade de adicionar, remover ou alterar sequências de DNA é essencial para estudos que investigam a base genética de características com efeitos fenotípicos, incluindo alterações que geram mudanças propositas de tais características, como aquelas inseridas em projetos de biologia sintética. Com sua eficiência sem precedentes e facilidade de uso impressionante, uma das maiores inovações biotecnológicas da atualidade é tecnologia de edição de DNA baseada no sistema procarionótico de repetições palindrômicas curtas e intercaladas, regularmente agrupadas, do inglês, *clustered regularly interspersed short palindromic repeats*, ou CRISPR. O sistema CRISPR-Cas está revolucionando completamente a engenharia de genomas e o cenário biotecnológico como um todo. Em pouco mais de um ano, a edição com CRISPR-Cas9 foi implementada em vários modelos de organismos e tipos de células (PENNISI, 2013) e já começou a suplantiar tecnologias de edição de genoma existentes, como nucleases efetoras do tipo ativador de transcrição (TALENs) e nucleases de dedos de zinco (ZFNs).

A capacidade do complexo Cas9-gRNA de clivar sequências específicas de DNA inspirou seu uso como uma ferramenta de edição de genoma em células e organismos hospedeiros heterólogos, incluindo bactérias, leveduras e células de mamíferos (MALI et al., 2013; JIANG et al., 2013; DiCARLO et al., 2013). A mutagenese mediada por CRISPR-Cas9 é eficaz e conceitualmente simples, exigindo apenas a endonuclease Cas9 e um RNA guia (gRNA) complementar ao local de interesse. A principal restrição é a necessidade de um motivo protoespaçador adjacente (PAM) imediatamente a jusante da sequência alvo de gRNA no genoma. O PAM, um motivo de sequência curta necessário para o reconhecimento do alvo pelo complexo Cas9-gRNA, varia de acordo com a proteína Cas9 (MOJICA et al., 2009; SHAH et al., 2013); por exemplo, para Cas9 de *S. pyogenes*, o PAM é a sequência de três nucleotídeos NGG (JINEK et al., 2012). A capacidade de direcionar a Cas9 para praticamente qualquer alvo, alterando apenas a região de emparelhamento de base do gRNA, torna o CRISPR-Cas9 mais fácil de usar do que ZFNs e TALEs, os quais requerem engenharia de proteínas para especificidade de sequência.

Logo após o desenvolvimento da edição do genoma mediado por Cas9, um Cas9 desativado (dCas9) foi introduzido com duas mutações pontuais (D10A, H841A)

que abolem a atividade de endonuclease da proteína, mantendo sua capacidade de formar um complexo com gRNA e ser recrutado para sequências específicas de DNA (JINEK, et al., 2012; QI et al., 2013). Quando fundido com domínios efetores, o dCas9 pode reprimir ou ativar a transcrição dos genes alvo (BIKARD et al., 2013; GILBERT et al., 2013; PEREZ-PINERA et al., 2013; ZALATAN et al., 2015). O uso do dCas9 como repressor para inibir a expressão gênica foi chamado de CRISPR de interferência, ou CRISPRi, enquanto o uso da tecnologia para ativar os genes alvo é chamado de CRISPR de ativação, ou CRISPRa (GILBERT et al., 2014).

1.3.2 Fatores de transcrição sintéticos

Além da exploração dessas novas técnicas, abordagens tradicionais de engenharia de proteínas também são eficazes para fornecer reguladores transcricionais otimizados para responder à estímulos específicos, como fármacos e indutores ortogonais. Todavia, em outros modelos de circuito genético sintético que compreendem mais de um par ‘fator de transcrição (FT)-promotor’, é importante evitar a diafonia entre os FTs, - a capacidade dos elementos reguladores de funcionar na mesma célula sem diafonia é conhecida como ortogonalidade (WANG et al., 2011; BLOUNT et al., 2012). Além de evitar a diafonia, os componentes de um circuito genético geralmente precisam ser induzíveis; isto é, genes diferentes no circuito podem precisar ser ativados ou reprimidos em momentos diferentes para alcançar o comportamento desejado. Nas bactérias, isso pode ser feito acoplando a expressão de diferentes FTs heterólogos ou sintéticos a entradas moleculares distintas (XIE et al., 2011; WANG; BUCK, 2012; IYER et al., 2013; NIELSEN; VOIGT, 2014). A capacidade de reprimir e ativar genes diferentes simultaneamente na mesma célula deve permitir a construção de circuitos sofisticados que se assemelham mais às redes reguladoras dos genes endógenos.

Recentemente, nosso grupo desenvolveu um componente regulatório desenhado para responder à aspirina (MONTEIRO, 2019), um composto com propriedades farmacológicas bem descritas, com amplo histórico de uso e cuja segurança e eficácia são fortemente estabelecidos (DAVISON, 1971; BRAYFIELD, 2014). O regulador XylS é uma proteína responsável pela ativação de genes envolvidos no metabolismo de compostos aromáticos em *Pseudomonas putida*. No referido trabalho, utilizando ferramentas e estudos de biologia estrutural e modelagem computacional,

conseguiu-se determinar dentro do sítio de ligação que reconhece os alvos aromáticos presentes nessas vias metabólicas, uma região capaz de alterar a seletividade do regulador, por meio da substituição de um único aminoácido (A111V). A variante mutada teve uma resposta expressiva na presença de ácido salicílico, acetil salicílico e aspirina comercial, em comparação com a proteína original (MONTEIRO, 2019). A **Figura 3** mostra como na presença desses compostos, o regulador mutado XylS(A111V) sofre uma mudança de conformação e é capaz de reconhecer seu promotor endógeno, *Pm*. Ao posicionarmos esse regulador à montante do promotor reconhecido por FNR (**Figura 3B**), restringimos a sua expressão somente aos ambientes em que esse fator de transcrição está ativo, ao seja, regiões de hipóxia. A partir dessa arquitetura, é possível determinar a lógica do circuito, representada pela **Figura 3C**, em que apenas na presença de ambos os sinais, o circuito gera um sinal de resposta. Dada a intenção terapêutica deste projeto, é imperativo a utilização de compostos indutores com perfis farmacológicos conhecidos e seguros, facilmente administrados, com bom perfil de biodistribuição e poucos, se não nenhum, efeitos adversos, principalmente levando-se em conta o quadro clínico normalmente encontrado em pacientes oncológicos.

A ASPIRINA é um medicamento que atende a esses parâmetros. A aspirina, também conhecida como ácido acetilsalicílico (AAS), é um medicamento usado para tratar dor, febre ou inflamação (ASPIRIN, 2019). Também é usado a longo prazo para ajudar a prevenir outros ataques cardíacos, derrames isquêmicos e coágulos sanguíneos em pessoas de alto risco. A aspirina é um medicamento anti-inflamatório não esteroide (AINE) e funciona de maneira semelhante a outros AINEs, mas também suprime o funcionamento normal das plaquetas (ASPIRIN, 2019). A aspirina é um dos medicamentos mais amplamente utilizados no mundo, com um número estimado de 40.000 toneladas (50 a 120 bilhões de comprimidos) consumidos a cada ano (WARNER; MITCHELL, 2002; JONES, 2015). Está na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde, os medicamentos mais seguros e eficazes necessários em um sistema de saúde (WHO, 2019). Está disponível como um medicamento genérico, e em 2019, foi o 42º medicamento mais prescrito nos Estados Unidos, com mais de 19 milhões de prescrições (ASPIRIN, 2019; THE TOP 300 OF 2019, 2019).

Figura 3. Esquemática da função lógica do circuito sintético responsivo à hipóxia e aspirina. A) Porta lógica demonstrando a integração dos sinais reconhecidos pelo circuito sintético, em que a baixa concentração de O_2 funciona como Ativador da cascata, ativando a transcrição do gene *xylS* por meio do promotor de P_{FNR} . Após expressão, o regulador *XylS* assume conformação ativa na presença de aspirina, reconhecendo o seu sítio de ligação do promotor P_m e ativa a expressão do gene efector *clyA* como sinal de saída. B) Representação esquemática da cascata de ativação do circuito na forma de segmento de DNA. C) Esquema de porta lógica AND computando dois sinais de entrada e gerando uma resposta de saída; apenas na presença dos dois sinais, I_A e I_B , o circuito gera um sinal de saída, O .

A dependência do sistema de dois sinais de ativação torna o circuito muito mais seguro, diminuindo enormemente os efeitos citolíticos fora dos ambientes tumorais alvo, onde não ocorre hipóxia, ao mesmo tempo, permite o controle discriminado dos momentos de ativação, já que a administração do segundo sinal (AAS) é controlada externamente pelo corpo clínico responsável pelo tratamento. Dessa maneira, também é possível ajustar a ativação do circuito com o tempo de colonização do sítio tumoral pela bactéria, ao compasso em que elas são removidas ou eliminadas de outros ambientes e tecidos imunocompetentes pela ação do sistema imunológico (LAMBIN et al., 1998; SHABAHANG, 2004), restringindo ainda mais a probabilidade de uma ativação fora do(s) local(is) alvo(s).

Um sistema controlável de expressão gênica é usado para gerenciar o tempo e a localização da produção de moléculas bioativas *in vivo*. O desencadeamento preciso da expressão de medicamentos antitumorais pode maximizar seus efeitos terapêuticos enquanto minimiza a toxicidade sistêmica. Algumas moléculas antitumorais,

como agentes citotóxicos que são tóxicos para as células tumorais, bem como para as células normais do tecido, requerem controle rigoroso da produção, em vez de uma expressão constitutiva. A inserção de uma sequência promotora específica a montante do gene que codifica um agente antitumoral específico permite o controle da transcrição desses genes por sinais externos. As estratégias de regulação ou desencadeamento de genes pertencem principalmente a três categorias: gatilho extracelular (ROYO et al., 2007), detecção ambiental (FORBES, 2010; SILVA-ROCHA et al., 2011; SILVA-ROCHA; Pérez-Pantoja; De LORENZO, 2013) e auto-indução (SWOFFORD; VAN DESSEL; FORBES, 2015).

O uso do salicilato como indutor dentro do circuito funciona como um fator desencadeante externo (ROYO et al., 2007), outros exemplos descritos também incluem l-arabinose e irradiação γ (LOESSNER et al., 2007; HONG et al., 2014). Tanto a l-arabinose como o ácido acetilsalicílico (AAS) são gatilhos biológicos não tóxicos adequados que podem ser usados para controlar positivamente a expressão gênica sob o promotor P_{BAD} e o promotor P_m , respectivamente (LOESSNER et al., 2007; ROYO et al., 2007; HONG et al., 2014). O sistema P_{BAD} responde ao indutor extracelular l-arabinose através da proteína reguladora AraC, que é fortemente regulada. A administração intravenosa de l-arabinose pode ativar a expressão gênica em tumores colonizados com *Salmonella* carregando plasmídeos de expressão contendo P_{BAD} . O sistema de expressão AAS em *Salmonella* atenuada já foi usado anteriormente na regulação seletiva da expressão da enzima conversora de 5-FC citosina desaminase *in vivo*. A indução com AAS antes da administração do 5-FC resultou em uma redução significativa do crescimento do tumor (ROYO et al., 2007). Existem também métodos de controle temporal e espacial da expressão gênica, utilizando um o promotor RecA induzível por radiação (GANAI; ARENAS; FORBES, 2009). A radiação γ causa danos ao DNA e ativa a proteína RecA, que promove a lise do repressor LexA, induzindo a expressão gênica. Uma grande vantagem da radiação sobre o desencadeamento molecular é que a radiação pode penetrar diretamente no tecido do tumor e não está sujeita ao limite de difusão (**Figura 4**). A injeção sistêmica de *Salmonella* e a indução da expressão do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF - no inglês, *TRAIL* -, causaram um atraso significativo no crescimento de tumores mamários e reduziram o risco de morte em 76% (GANAI; ARENAS; FORBES, 2009). Esses exemplos

reforçam o arcabouço de estratégias de controle e ativação de dispositivos e módulos terapêuticos-carregados por agentes microbianos que podem ser aplicados em contextos de tratamento antitumoral.

Além da possibilidade de exploração da arquitetura biológica de microrganismos para inscrever vias de detecção e atuação terapêuticas, as próprias características do microambiente tumoral, que diferem das dos tecidos normais, incluindo baixa concentração de oxigênio ou hipóxia, baixo pH e necrose, podem ser utilizadas para melhorar a especificidade da colonização por *Salmonella* para o tecido tumoral. Por exemplo, sistemas de expressão induzíveis por hipóxia foram utilizados para restringir a expressão gênica por vetores de *Salmonella* à região hipóxica da massa do tumor. Os promotores induzíveis por hipóxia, HIP-1 e FF+20, são promotores regulados pelo fator de transcrição de redução de nitrato e fumarato (FNR), e são caracterizados pela presença de locais de ligação ao FNR (MENGESHA et al., 2006; RYAN et al., 2009). O FNR é um fator de transcrição responsivo à hipóxia que age como um sensor e regula a resposta global à transição entre o crescimento aeróbico e anaeróbico em *Salmonella*. Na ausência de oxigênio, os aglomerados de sulfeto de ferro induzem a formação de homodímeros de FNR que se ligam a locais específicos de DNA e promovem a transcrição. Sob condições aeróbicas, os aglomerados de sulfeto de ferro são desmontados e os dímeros de FNR se dissociam para formar monômeros que não se ligam ao DNA. Para monitorar os promotores de *Salmonella* que são ativados preferencialmente em tumores, Arrach e colaboradores (2008) clonaram uma biblioteca aleatória de fragmentos de DNA da bactéria *Salmonella* a montante do gene da proteína fluorescente verde (GFP) sem o promotor, e dois clones que continham regiões promotoras de *pflE* e *ansB* foram identificados como induzidos sob condições hipóxicas. Entretanto, há casos em que a ativação do promotor nos tumores pode não estar relacionada à baixa de oxigênio (ARRACH et al., 2008).

Figura 4. Sistemas de gatilhos externos. A, o sistema *pBAD*, que responde à L-arabinose extracelular, contém dois componentes: a proteína AraC sensível à arabinose e o promotor *pBAD*. O regulador expresso constitutivamente AraC induz a transcrição por ligação ao promotor *pBAD*. AraC é um regulador positivo e negativo do *pBAD*: ativa a transcrição na presença de arabinose e reprime a transcrição na sua ausência. B, o sistema em cascata de salicilato usa duas proteínas reguladoras sensíveis ao salicilato, NahR e XylS2, para manter uma regulação rígida. Na presença de salicilato, o NahR ativa a transcrição do promotor *Psal*, levando à expressão de XylS2. XylS2, que também é sensível ao salicilato, ativa a transcrição do promotor *Pm*. C, o sistema RecA detecta irradiação γ , que causa dano ao DNA. esse dano ativa RecA, o que induz à autoproteólise da LexA. A transcrição é induzida quando LexA, um repressor do promotor *pRecA*, é liberado do DNA. A regulação em cadeia aumenta a concentração de RecA quando o sistema está ativo. D, o sistema de redução de fumarato e nitrato (FNR) é ativado em ambientes de hipóxia. A ausência de oxigênio promove a dimerização do FNR, o qual induz a transcrição. Adaptado de FORBES, 2010.

1.4 Aplicação terapêutica

Como demonstrado, embora o uso de bactérias como alternativa terapêutica remonta a mais de um século, os recentes avanços na biologia sintética estão transformando bactérias geneticamente modificadas em terapias e diagnósticos "inteligentes" e tornando o seu uso clínico em uma realidade tangível.

As bactérias estabelecem íntimas relações com os microambientes os quais elas colonizam no corpo humano, respondem a uma série de sinais envolvidos nas patologias de doenças e são bem sintonizadas pela evolução para detectar e produzir

níveis fisiológicos de biomoléculas de interesse (FORBES, 2010). É a combinação desses recursos com as habilidades dos sistemas vivos, como quimiotaxia e secreção de biomoléculas, que permiti sistemas bacterianos projetados superarem um dia as terapias e diagnósticos tradicionais (**Figura 5**).

As aplicações de bactérias como formas engenhas de tratamento têm atindo um amplo espectro de enfermidades, como diabetes mellitus (TAKIISHI et al., 2017), doença inflamatória intestinal (BRAAT et al., 2006), infecção pelo HIV (LAGE-NAUR et al., 2011) e o próprio câncer (ZHENG et al., 2017). Os exemplos incluem bactérias projetadas para produzir biofármacos, os quais, de outra forma, seriam degradados no estômago ou na corrente sanguínea (McGREGOR, 2008; HANSON et al., 2014). Além disso, esses novos sistemas também são úteis para diminuir a exposição sistêmica a medicamentos significativamente tóxicos (STEIDLER et al., 2000; MOTTA et al., 2012), para ativar de novas maneiras o sistema imunológico, como por meio de vacinação com DNA e proteínas (SIZEMORE; BRANSTROM; SADOFF, 1995; STEIDLER et al., 1998) e para testes não invasivos, registrando sinais biológicos transitórios do paciente, tais quais metabólitos inflamatórios reativos (RIGLAR et al., 2017).

Os novos métodos de construção de organismos recombinantes têm permitido obter bactérias usadas para fornecer medicamentos ao corpo humano. Outra vantagem é a distribuição de terapias em locais do corpo acessíveis às bactérias, mas que são difíceis de serem alcançados por moléculas administradas por via oral ou parenteral, como o cólon ou o centro dos tumores e que, por vias tradicionais, seriam rapidamente degradados pelos processos de primeira passagem ou metabolização antes de chegar no seu tecido-alvo (SALTZMAN et al., 1996; STEIDLER et al., 1998; McGREGOR, 2008).

Há uma variedade de agentes citotóxicos que podem matar células cancerígenas efetivamente. No entanto, as terapias convencionais frequentemente eliminam as células cancerígenas às custas de danificar os tecidos normais, resultando em toxicidades inaceitáveis nos pacientes (CHABNER; ROBERTS Jr, 2005). Portanto, a erradicação das células cancerígenas sem causar danos colaterais é um dos principais objetivos de todos aqueles envolvidos no combate ao câncer.

Routes of administration and target tissues for engineered bacteria

Site-specific applications for therapeutic engineered bacteria

Figura 5. Exemplos de estratégias para administração terapêutica bacteriana. As bactérias recombinantes podem ser administradas através de uma variedade de rotas para atingir diferentes áreas do corpo, incluindo o intestino, células imunes em circulação e tumores sólidos. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, pode ser projetada para liberar toxinas, enzimas que clivam pró-fármacos e estimuladores imunes. *Listeria monocytogenes* tem sido utilizada para imunizar células imunes circulantes contra antígenos comuns de cânceres. No intestino, espécies bacterianas como *Lactococcus lactis* e *Escherichia coli* foram projetadas para liberar medicamentos diretamente no intestino ou por todo o corpo, para sensibilizar o sistema imunológico ou para proteger seu hospedeiro de ataques e toxinas microbianas. Adaptado de RIGLAR; SILVER, 2018.

Apesar de sua precisão aumentada de direcionamento contra células tumorais, a terapia alvo-dirigida, ou direcionada, está longe de ser perfeita (WIDAKOWICH et al., 2007). Primeiro, os agentes terapêuticos direcionados têm um espectro próprio de toxicidade, o qual, às vezes, está relacionado às funções normais das proteínas alvo (LYNCH et al., 2007). Segundo, os inibidores de moléculas pequenas podem não ser suficientemente específicos (IMAI; TAKAOKA, 2006). Terceiro, a resistência ou

recaída é frequentemente observada em pacientes tratados com terapias alvo-dirigidas, resultado das alterações ou seleção genética intrínseca a um subconjunto de células cancerígenas (ROTOW; BIVONA, 2017). E quarto, a maioria dos tumores não apresenta alterações genéticas atualmente acionáveis com terapias estabelecidas (JONES et al., 2015).

A imunoterapia pode ser vista como outra terapia direcionada, que normalmente envolve células T reativas a neoantígenos específicos de tumores ou antígenos associados a tumores (AATs) (COULIE et al., 2014). Ensaios clínicos recentes com bloqueadores de pontos de verificação (*checkpoint*) de células imunes mostraram resultados notáveis, incluindo efeitos terapêuticos duráveis em cânceres metastáticos avançados (POSTOW; CALLAHAN; WOLCHOK, 2015; TOPALIAN; DRAKE; PARDOLL, 2015). Geralmente, acredita-se que a sensibilidade ao bloqueio do ponto de verificação imune depende da carga neoantigênica dos tumores, bem como da extensão e composição dos infiltrados imunes no microambiente tumoral (TUMEH et al., 2014; RIZVI et al., 2015; LE et al., 2017). Infelizmente, os cânceres mais comuns não mostram mutações abundantes ou células imunes infiltrantes e, consequentemente, são insensíveis a esses bloqueadores de ponto de verificação (YARCHOAN; HOPKINS; JAFFEE, 2017). Grandes esforços estão sendo feitos para desenvolver abordagens que possam sensibilizar esses tumores à imunoterapia (RIBAS et al., 2017). As bactérias oncolíticas apresentam uma abordagem alternativa para superar os desafios das terapias e imunoterapias com alvo molecular, uma vez que não dependem da 'composição genética' do tumor e podem induzir uma resposta inflamatória intratumoral robusta.

Além de alvos moleculares, como oncoproteínas e neoantígenos, alterações patológicas únicas presentes no próprio tecido podem ser exploradas para o direcionamento tumoral. A vasculatura tumoral é geralmente irregular e caótica, levando à difusão insuficiente de oxigênio e nutrientes em algumas áreas de um tumor sólido (JAIN, 2013). As células cancerígenas nessas áreas hipóxicas estão dormentes, mas viáveis (FLUEGEN et al., 2017).

Além disso, as áreas com hipóxia podem ser responsáveis pela recidiva clínica após quimioterapia ou radioterapia, porque são pouco acessíveis à terapêutica administrada sistemicamente e é necessário oxigênio para uma radioterapia eficaz

(BROWN, 2007). Adicionalmente, baixos níveis de oxigênio afetam a função das células imunes *in vivo*, contribuindo para o privilégio imune de tumores sólidos (CHOUAIB et al., 2017). No entanto, são essas mesmas regiões de hipóxia e/ou necróticas que fornecem um nicho crítico para a colonização por bactérias.

Há uma longa história de observações que sugerem que infecções bacterianas naturais podem resultar em efeitos antitumorais contra tumores malignos. Em 1813, Vautier relatou que pacientes com câncer que desenvolveram gangrena gasosa apresentaram regressões de seus tumores (MOWDAY et al., 2016). Outros relatos históricos incluem observações de Busch (1866) que levou Fehleisen (1883) e subsequentemente William B. Coley a experimentar o agente infeccioso vivo de erisipela (mais tarde denominado *Streptococcus* sp. 'Grupo A' ou *Streptococcus pyogenes*) como um meio de tratar cancros (COLEY, 1891; COLEY, 1893; NAUTS; SWIFT; COLEY, 1946). A busca adicional pelo uso de bactérias no tratamento de cânceres foi reduzida mais tarde, porque o foco da atenção foi desviado para a então nova terapia de radiação. No entanto, o entusiasmo pelo uso de bactérias vivas no tratamento do câncer foi revivido em meados da década de 1990, quando a comunidade científica entendeu melhor o microambiente tumoral e a tecnologia do DNA recombinante permitiu a geração de cepas bacterianas mais potentes e menos tóxicas (FORBES, 2010). Muitas cepas bacterianas foram testadas em modelos animais e mostraram direcionamento preferencial para tumores sólidos, vários dos quais avançaram para ensaios clínicos (BERMUDES; ZHENG; KING, 2002; CHAKRABARTY, 2003; MINTON, 2003; HOFFMAN, 2011).

1.5 Propriedades Antitumorais Bacterianas

As bactérias vivas têm mecanismos únicos com os quais são capazes de se direcionarem preferencialmente para tumores sólidos. Quando administradas sistemicamente, as bactérias terapêuticas se disseminam para o tumor e para os tecidos saudáveis. Embora se demonstre que a *Salmonella* se abriga ou retém-se no microambiente tumoral enriquecido em certos metabólitos (KASINSKAS; FORBES, 2007), a quantidade inicial de bactérias entregues ao tumor geralmente não é maior do que a entregue aos tecidos normais (PAWELEK; LOW; BERMUDEZ, 1997; DIAZ Jr et al.,

2005; MIN et al., 2008). No entanto, as bactérias na circulação e outros tecidos normais são eliminadas em horas e dias, respectivamente, enquanto as do tumor continuam a proliferar, geralmente em números que excedem em muito as unidades de formação de colônias administradas inicialmente (LAMBIN et al., 1998; SHABAHANG, 2004). Essa colonização seletiva provavelmente é o resultado de um microambiente imunossupressor e bioquimicamente único, causado por alterações patológicas associadas a tumores sólidos (AGRAWAL et al., 2004; KASINSKAS; FORBES, 2007; WESTPHAL et al., 2008; JOYCE; FEARON, 2015). É importante ressaltar que as bactérias anaeróbias não colonizam lesões hipóxicas ou inflamatórias não relacionadas à neoplasia, como mostrado em experimentos com microrganismos anaeróbios obrigatórios e facultativos (DIAZ Jr et al., 2005; YU; ZHANG; SZALAY, 2008; STAEDTKE et al., 2015).

Curiosamente, algumas cepas de bactérias anaeróbias obrigatórias também foram observados em lesões micro-invasivas em que a necrose não era evidente e na vizinhança de vasos neoplásicos em modelos de glioma de rato (ROBERTS et al., 2014), aumentando a possibilidade de que essas estruturas neoplásicas forneçam microambientes suficientemente hipóxicos, bioquimicamente únicos e imuno-privilegiados para a colonização bacteriana.

A infecção bacteriana localizada causa regressão do tumor através de vários mecanismos (**Figura 6**). As bactérias têm atividades antitumorais intrínsecas (MIDDLEBROOK; DORLAND, 1984; BETTEGOWDA et al., 2006; CHEONG et al., 2006), mas diferentes cepas de bactérias ou bactérias em diferentes microambientes podem implantar mecanismos distintos para destruir tumores sólidos.

Figura 6. Mecanismos bacterianos antitumorais. A multiplicação intracelular não controlada de *Salmonella* spp. pode levar ao rompimento das células tumorais invadidas. Como alternativa, bactérias intracelulares podem matar células tumorais induzindo apoptose ou autofagia. Macrófagos e células dendríticas (DCs) em tumores colonizados por *Salmonella* spp. secretam interleucina-1 β (IL-1 β), responsável pela atividade antitumoral. A secreção elevada de IL-1 β requer sinalização do receptor Toll-like 4 (TLR4) induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e ativação do inflamassoma em macrófagos após a fagocitose de células tumorais danificadas pela *Salmonella* spp. O LPS também provoca a expressão do fator de necrose tumoral (TNF) por meio de CD14 (co-receptor para LPS), TLR4 e resposta primária de diferenciação mieloide 88 (MYD88), levando à ruptura da vasculatura do tumor. A flagelina, uma proteína da subunidade do flagelo bacteriano, melhora a resposta antitumoral dependente de célula T CD8 $^{+}$ através da ativação de TLR5 e diminui a frequência de células T reguladoras (T $_{reg}$). A flagelina também pode suprimir diretamente a proliferação de células tumorais através da sinalização de TLR5. Além disso, foi demonstrado que a flagelina induz uma resposta antitumoral mediada por células *natural killers* (NK), dependente de perforina. A flagelina também pode ativar células NK para produzir interferon- γ (IFN γ), uma citocina crítica para imunidade inata e adaptativa por meio de uma via independente de TLR, envolvendo IL-18 e MYD88. A *Salmonella* spp. induz a regulação positiva da conexina (Cx43), levando à formação de junções entre as células tumorais e as DCs, o que promove a transferência e a apresentação cruzada de peptídeos processados de tumores antígenicos. A regulação positiva de Cx43 nas células tumorais também reduz a expressão da enzima imunossupressora indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO). A apresentação cruzada de antígenos tumorais por DCs e a expressão diminuída de IDO ativam ainda mais as células T CD8 $^{+}$. Adaptado de ZHOU, S. et al, 2018.

Além dos efeitos antitumorais intrínsecos, a infecção bacteriana induz respostas imunes inatas e adaptativas contra bactérias colonizadoras de tumores e células tumorais (AVOGADRI et al., 2005; LEE; WU; SHIAU, 2008; LESCHNER et al., 2009; LEE et al., 2011). As respostas imunes do hospedeiro são mais críticas para os efeitos antitumorais de bactérias como *Salmonella* spp. que não são suficientemente

citotóxicas para as células tumorais (AVOGADRI et al., 2005; ZHANG et al., 2016). É provável que o mecanismo dominante varie de acordo com as espécies bacterianas utilizadas na terapia, os tipos de tumor que estão sendo tratados e até as fases da interação bactéria-hospedeiro. É importante ressaltar que as bactérias podem ser geneticamente modificadas para melhorar ainda mais suas atividades antitumorais utilizando os princípios de biologia sintética abordados anteriormente, tornando-as uma plataforma versátil para fornecer cargas terapêuticas com base nas necessidades clínicas específicas de cada caso (FORBES, 2010; CHAKRABARTY; FIALHO, 2019).

As bactérias podem ser atenuadas por razões de segurança ou projetadas para adquirir atividades antitumorais aprimoradas. Uma grande coleção de cepas bacterianas projetadas foi gerada em laboratórios em todo o mundo para uma variedade de propósitos, todos eles visando melhorar o índice terapêutico quando as bactérias são usadas sozinhas ou em combinação com outras abordagens terapêuticas antitumorais (RIGLAR; SILVER, 2018).

Bactérias atenuadas sozinhas geralmente não conseguem erradicar tumores sólidos. A entrega de cargas terapêuticas por bactérias dirigidas a tumores para aumentar sua eficácia foi descrita pela primeira vez em meados da década de 1990 (FOX et al., 1996; SALTZMAN et al., 1996). A carga terapêutica entregue pelo agente bacteriano pode estar na forma de DNA, RNA ou proteína, dependendo do uso pretendido e do tipo de bactéria liberadora. Na maioria dos casos, as bactérias são transformadas com plasmídeos que transportam cassetes de expressão gênica que direcionam a expressão de proteínas terapêuticas nas próprias bactérias. Muitas proteínas precisam ser secretadas para alcançar seus efeitos biológicos (RUSSMANN et al., 1998; WALKER; STAN; POLIZZI, 2017). Como alternativa, as cepas de vetores podem ser modificadas de modo que a lise bacteriana seja induzida para a liberação da carga terapêutica, uma vez que uma colonização robusta do tumor tenha sido estabelecida (CAMACHO et al., 2016; DIN et al., 2016; CHOWDHURY et al., 2019). Entretanto, a abordagem mais direta para melhorar a atividade antitumoral são vetores bacterianos que expressam agentes citotóxicos. Essa estratégia requer que os vetores bacterianos atinjam tumores com especificidade suficiente ou o uso de promotores induzíveis para um melhor controle da expressão gênica, a fim de evitar toxicidade para os tecidos normais. Várias linhagens bacterianas foram projetadas para

expressar a potente toxina bacteriana citolisina A, ClyA ou HlyE, sob o controle de promotores ativados por hipóxia. Mais recentemente, a citolisina bacteriana HlyE de *E. coli* foi expressa em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, o que a tornou eficiente na morte de células 4T1 de carcinoma mamário *in vitro* e *in vivo* (RYAN et al., 2009). Resultados semelhantes foram obtidos usando a citolisina homóloga de *S. typhimurium*, controlada pelo promotor induzível P_{BAD} (NGUYEN et al., 2010). As toxinas bacterianas são de interesse especial para serem usadas na terapia de câncer mediada por bactérias, pois sua expressão, secreção e funcionalidade são mais fáceis de realizar do que a expressão de proteínas eucarióticas.

A exploração de bactérias recombinantes que expressam substâncias terapêuticas é uma maneira óbvia de melhorar a eficácia antitumoral, uma vez que as bactérias atenuadas não são suficientes por si só como ferramenta terapêutica robusta (YU; ZHANG; SZALAY, 2008). Na população heterogênea de pacientes com câncer, são necessárias bactérias mais eficazes. Aqui, a dificuldade é restringir a expressão de uma substância tóxica ao tecido neoplásico, deixando outros órgãos intactos. Dessa forma, o uso de promotores ativos apenas em tumores oferece grande apelo e cerceia a liberação de toxinas às áreas de interesse. Por exemplo, os promotores que respondem à hipóxia seriam ativos apenas sob condições hipóxicas nos tumores (MENGESHA et al., 2006). A expressão de uma citolisina bacteriana por meio desse promotor resultou em um efeito antitumoral aprimorado no trabalho de Ryan et al (2009). Uma desvantagem desses promotores ativados por hipóxia é que áreas tumorais bem-oxigenadas podem não ser afetadas e, portanto, o tumor pode crescer novamente. No entanto, a expressão específica dentro de um cancro é uma estratégia inteligente, e a existência de tais promotores pode ser demonstrada em experimentos de rastreamento usando matrizes (ARRACH et al., 2008), bibliotecas de armadilhas de promotores, junto com métodos informatizados (DEYNEKO et al., 2016).

A combinação de promotores sensíveis à sinais ambientais e promotores induzíveis pode representar outra ferramenta para controlar a expressão de moléculas tóxicas por bactérias apenas dentro do núcleo tumoral. Eles devem ser ativados em qualquer momento desejado pela administração de uma substância indutora, por exemplo, quando um número ideal de bactérias se acumula no tumor (ROYO et al., 2007; RYAN et al., 2009; CHOWDHURY et al., 2019). Além de controlar a expressão

de moléculas terapêuticas, esses promotores também podem ser usados para eliminar bactérias através da expressão de genes suicidas, como o gene *E*, do bacteriófago Φ X174, a fim de encerrar a terapia quando ocorrem efeitos colaterais negativos ou após a erradicação bem-sucedida do tumor (LOESSNER et al. 2007).

Um dos genes envolvidos nas vias de sinalização durante a mudança de crescimento aeróbico para anaerobiose em *E. coli* é o gene responsável pela regulação de nitrato e fumarato, o *fnr* (CRACK, et al., 2008). Alguns promotores contendo sítio de ligação ao fator de transcrição FNR são positivamente regulados durante condições ambientais de hipóxia (MENGESHA, et al., 2006). Entretanto, existem alguns tecidos e regiões do corpo que naturalmente possuem baixas concentrações de oxigênio, oferecendo um ambiente favorável ao crescimento desses organismos, como a porção distal do intestino delgado (McKEOWN, 2014). Além dessas áreas naturalmente depravadas de oxigênio, alguns quadros fisiopatológicos também podem induzir condições de baixa oxigenação, como infecção (ARENA, 2017), isquemia tecidual por injúria (LASSMANN, 2003) e inflamação (ELTZSCHIG; CARMELIET, 2011).

Deyneko e colegas utilizaram um sistema de triagem e clonagem em larga escala para construir e identificar uma sequência promotora reconhecida pelo fator FNR, cuja ativação ocorresse especificamente em ambientes tumorais (DEYNEKO, 2016). Dentre as sequências avaliadas, apenas uma apresentou ativação exclusiva em tumores, e portanto, foi escolhida para ser incorporada ao nosso circuito sintético como porta de controle da ativação cascata de regulação. A análise bioinformática realizada pelo grupo de Deyneko reuniu variações nas sequências consenso do sítio de ligação do fator de transcrição e dos fatores sigma 70, construindo variantes mutantes e as testaram em diversos tecidos para avaliar a expressão seletiva em comparação com células cancerosas.

Os princípios de controle oferecidos por outras disciplinas da engenharia, disponibilizam conceitos estratégicos para reforçar ainda mais os aspectos de segurança no design do nosso circuito terapêutico. Além da implementação de um promotor específico para oferecer ativação exclusivamente dentro do cenário tumoral, por meio da ligação de um fator de transcrição induzido por hipóxia (FNR), podemos instalar uma cascata de regulação cuja arquitetura impõe a presença de um segundo sinal para permitir a expressão do efetor final do circuito (**Figura 3**). Dessa forma, é

possível combinar o sinal fisiológico encontrado no leito tumoral com outro sinal de entrada para garantir o maior controle sobre o sistema (CHENG; LU, 2012).

Esses diferentes sistemas de regulação de genes são ferramentas poderosas para ajustar a expressão de genes bacterianos no local alvo. Além de usar um sistema sozinho, também é possível imaginar a combinação de vários sistemas, por exemplo, diferentes promotores que são ativos em diferentes partes do tumor e aperfeiçoam as bactérias como arma para o tratamento do câncer.

A crescente incidência de mortes por câncer e as limitações dos tratamentos convencionais exigem novas estratégias terapêuticas. O uso de bactérias que colonizam tumores, bem como sítios de metástases e levam à sua erradicação, é uma dessas abordagens promissoras. Muitas cepas bacterianas demonstraram sua aplicabilidade geral ao atingirem tumores e terem um efeito lítico e imunomodulador antitumoral. No entanto, a bactéria anticâncer ideal deve atender a ambos os critérios para ser segura e eficiente em sua aplicação. O que apareceu como um problema insolúvel quando essa abordagem terapêutica foi explorada pela primeira vez há mais de 100 anos, hoje em dia pode ser superado usando métodos moleculares de biologia sintética para adaptar as bactérias da maneira desejada. Portanto, o desenvolvimento de uma cepa anticâncer bacteriana ideal é um objetivo alcançável que permite criar esperanças adicionais para a possibilidade de conquistar essa doença devastadora.

2 OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Aplicar conceitos de Biologia Sintética na construção de um agente terapêutico microbiano capaz de utilizar as competências dos sistemas biológicos no combate ao câncer e oferecer uma estratégia mais segura e eficaz no tratamento dessa doença.

Objetivos Específicos

- A) Encontrar promotores induzíveis à hipóxia capazes de reconhecer a queda ou ausência de oxigênio do meio externo e promover a ativação de genes específicos posicionados à jusante dentro de um circuito genético sintético.

- B) Construir um circuito genético capaz de integrar os sinais fisiopatológicos do leito tumoral à administração de um agente farmacológico externo e responder de forma a obedecer à lógica programática de uma porta AND.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens e meios de cultura

Para construção dos circuitos sintéticos e clonagens das partes genéticas (promotores, sequências codificantes), foi utilizada a linhagem laboratorial DH10B de *Escherichia coli* (CASALI, 2003). Os testes de caracterização de todas as construções também foram feitos utilizando a mesma linhagem DH10B anterior e a linhagem atenuada SB300 de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (KANIGA et al. 1994), cordialmente cedida pelo Professor Dr. Dario S. Zamboni da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Os meios utilizados para cultivar as bactérias foram (a) meio LB (1% NaCl, 1% triptona, 0,5% extrato de levedura) para as clonagens moleculares e (b) meio mínimo M9 (sais M9 – 60g Na₂HPO₄, 30 g de KH₂PO₄, 10 g de NH₄Cl e 5 g de NaCl em 1 L, MgSO₄ 2 mM, CaCl₂ 0,1 mM, 0,1% cas-aminoácidos, 1% glicerol) filtrado para os ensaios de expressão medidos em microplaca de 96 poços (SAMBROOK et al. 1989).

3.2 Plasmídeos e partes utilizadas

Todas as construções dedicadas ao sistema responsivo à hipóxia foram feitas utilizando o plasmídeo de baixo número de cópias e baixo espectro de hospedeiros pMR1 (**Figura 7**).

No projeto, foram construídos vetores com uma cascata de regulação na qual a expressão do regulador genético, otimizado por meio de uma mutação pontual para responder à salicilato, XylS(A111V), está sob controle de um promotor ativado pelo fator de transcrição FNR, sensível à hipóxia (SPIRO & GUEST, 1990; DEYNEKO et al, 2016; MONTEIRO et al. 2019). Em condições de anaerobiose, o fator de transcrição FNR se liga a este promotor e ativa o circuito, de maneira a aumentar a expressão de XylS(A111V), que, na presença de salicilato, assume conformação ativa e promove a expressão do último gene da cascata. Foram clonados versões do circuito com variações no último gene da cascata, podendo ser um gene efetor – uma proteína citolítica (ClyA, também chamada de HlyE) capaz de formar poros na membranas de células tumorais (RYAN, 2009) –, ou um gene repórter para indicar a ativação do circuito sintético – a proteína fluorescente GFP ou a FbFP, uma proteína alternativa

cuja fluorescência, diferentemente da GFP, independe de oxigênio (DREPPER, 2007). A utilização da proteína FbFP, foi usada por ser capaz de sinalizar a atividade do circuito tanto em condições de hipóxia quanto normóxia. Alternativamente, a proteína GFP, por emitir fluorescência apenas em condições aeróbicas, permitiu inferir a depleção de oxigênio dentro do sistema de incubação e a efetiva obtenção de hipóxia ($[O_2] > 1\%$).

Figura 7. Plasmídeos utilizados nesse estudo. (a) pMR1, plasmídeo original de baixo número de cópia contendo o gene repórter GFP/iva usado para clonar os promotores no sítio de multiclonagem MCS. (b) pMR1-FbFP, usado para inserir os promotores induzíveis à montante do gene repórter FbFP. (c) vetor contendo a arquitetura do plasmídeo contendo o regulador XylS sob controle do promotor P_{FNR} e seu promotor P_m controlando a expressão do efetor final.

Para garantir a ativação do sistema apenas em ambientes com baixa concentração de oxigênio, foi escolhido o promotor $P_{FNR2.3}$ induzível por hipóxia retirado da literatura (DEYNEKO et al. 2016). Esse promotor é reconhecido pelo fator de transcrição FNR que, em seu contexto natural, é responsável pela ativação de genes importantes para adaptação da bactéria *E. coli* a condições anaeróbicas (BELL et al. 1990; SPIRO & GUEST, 1990).

3.2.1 Segunda coleção de Promotores de hipóxia

Posteriormente, expandimos o catálogo de promotores, incluindo quatro novos candidatos (*pepT*, *HIP-opt*, *fdhF* e *fdhF-mut*) para examinar a efetividade de resposta do circuito à anaerobiose (Tabela 1). Após inserção e clonagem das correspondentes sequências de cada promotor, repetiu-se o mesmo ensaio com placas de 96 poços, porém sem a presença de indutores, pois os promotores a serem caracterizados foram clonados diretamente à montante dos genes repórteres, sem a presença do

regulador XylS. Primeiramente, foram utilizados pontos de medição nos tempos 0 e 8 horas para medir a fluorescência de ambos os grupos (normóxia e hipóxia). As placas foram retiradas das câmaras e a fluorescência foi medida usando um leitor de placas Infinite M1000 Pro (Tecan Austria GmbH). Para investigar o efeito de períodos mais longos de incubação anaeróbica na indução dos promotores, estendemos o período de incubação para 48 horas, e as medições foram realizadas nos tempos 0, 8, 12, 16, 24, 32 e 48 horas.

Tabela 1 Segundo grupo de promotores usados para avaliar expressão sob condições de hipóxia.

Promotor	Plasmídeo	Repórteres	Leitura
Promotores induzíveis por hipóxia			
fdhF	pMR1	GFP	Controle [O ₂]
fdhFmut			
HIP-opt			
pepT			
fdhF		FbFP	Nível de expressão em hipóxia
fdhFmut			
HIP-opt			
pepT			
Promotores constitutivos			
<i>pJ100</i>	pMR1	GFP	Controle [O ₂]
<i>pJ106</i>			
<i>pJ113</i>			
<i>pJ100</i>		FbFP	Nível de expressão em hipóxia
<i>pJ106</i>			
<i>pJ113</i>			
Sem promotor			Controle (-)

Adicionalmente, para servirem de controles positivos durante a caracterização dos promotores induzíveis por hipóxia, um conjunto de quatro promotores constitutivos foi escolhido do Catálogo de Promotores do Repositório de partes biológicas padronizadas da *iGEM Foundation* (<http://parts.igem.org/Promoters/Catalog/Anderson>) com base na sua força relativa de expressão: BBa_J23100 (100%), BBa_J23106

(60%), BBa_J23113 (1%) e BBa_J23114 (10%). Com os valores de expressão em hipóxia e normóxia, calculou-se a multiplicidade de aumento ou diminuição de expressão (*fold change*) em função das duas condições de cultivo, conforme a equação:

Equação 1
$$Fold\ Change = Log_2 \left[\left(\frac{(AU/OD)_{Hipóxia}}{(AU/OD)_{Normóxia}} \right) \right]$$

3.3 Construções e clonagens

O primeiro circuito contendo o regulador XylS sob controle do promotor $P_{FNR2.3}$ (**Figura 8**) foi construído a partir do plasmídeo pMR1-XylS-Pm-A111V (MONTEIRO, 2019). Inserimos o promotor sintético $P_{FNR2.3}$ à montante do gene *xylS* por meio de reação de PCR, conforme esquema da **Figura 8**. Optamos por dividir a sequência promotora de 61 pares de bases entre dois oligonucleotídeos sintéticos (*primers*), pMR1_Pfnr_F e pMR1_Pfnr_R (Tabela 2), encomendados junto à empresa Integrated DNA Technologies (IDT). Cada um desses *primers* foi desenhado para amplificar uma região do vetor em conjunto com dois *primers* já disponíveis no laboratório, 5_*xylS*_EcoRI e 3_Pm_BamHI, cujos sítios de anelamento permitem ampliar o gene *xyls* e o promotor P_m , respectivamente. Além disso, eles contêm as sequências dos sítios de restrição para as enzimas EcoRI e BamHI em suas extremidades 5'. Dessa forma, cada reação de PCR originou um fragmento de DNA contendo uma porção da região promotora $P_{FNR2.3}$ com 31 pares de bases de pareamento entre eles. Em seguida, repetiu-se a reação de PCR utilizando os dois fragmentos amplificados e os *primers* 5_*xylS*_EcoRI e 3_Pm_BamHI para obter o cassete com a promotor $P_{FNR2.3}$.

Figura 8. Esquema do promotor sintético $P_{FNR2.3}$ mostrando o fator de transcrição FNR ligado ao seu sítio de ligação (CGTTGATCATGATCAA) e os sítios -35 e -10 de reconhecimento aos fatores sigma.

Ligou-se ambos os fragmentos digeridos, vetor e cassete, com a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific), em uma reação *overnight* a 16 °C, seguindo o

protocolo sugerido pelo fabricante. Ao final do protocolo, obteve-se o vetor pMR1- $P_{FNR2.3}$ -XylS- P_m .

Após ligação, 2 μ l de vetor foi usado para transformar 50 μ l de células eletrocompetentes de *E. coli* DH10B por eletroporação. Em seguida, as células foram plaqueadas em LB-ágar com cloranfenicol e encubadas *overnight* para o crescimento de colônias recombinantes.

Figura 9. Esquematização da estratégia de clonagem para inserir o promotor $P_{FNR2.3}$ no vetor 1 (pMR1-XylS-Pm-A111V). (a) amplificação por reação de PCR em duas etapas para (I) obtenção dos fragmentos 2 com os dois segmentos do promotor $P_{FNR2.3}$ contendo uma zona de complementaridade de 31 pb (caixa em vermelho), seguido extração e purificação para (II) segunda reação de PCR para amplificar o cassete 3 contendo o promotor inteiro (área tracejada). (b) inserção do cassete 3 purificado no vetor 1, gerando o novo vetor 4.

As versões do circuito contendo o gene da proteína fluorescente independente de oxigênio, FbFP, ou da proteína citolítica, ClyA, foram obtidas seguindo a seguinte estratégia: o gene da proteína FbFP foi sintetizado diretamente pela empresa IDT, contendo os sítios de restrição das enzimas KpnI e XhoI nas extremidades 5' e 3', respectivamente. O gene *clyA*, por sua vez, foi amplificado diretamente do cromossomo de *E. coli* DH10B utilizando *primers* sintéticos 5_HlyE_KpnI e 3_HlyE_XhoI contendo os sítios de restrição para as mesmas enzimas KpnI e XhoI. Consequentemente, os insertos foram clonados no vetor pMR1- $P_{FNR2.3}$ -XylS- P_m utilizando o mesmo protocolo de digestão, ligação e transformação descrito acima, utilizando o par de enzimas KpnI e XhoI (**Figura 10**). A **Tabela 2** apresenta a lista de primers usados neste trabalho e a **Tabela 3** contém a sequência do gene *fbfp* encomendado na forma de gBlock à empresa IDT.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para a montagem dos circuitos sintéticos.

Primers	Sequência 5' → 3'	Enzima de restrição
5_xylS_EcoRI	<u>GAATTCT</u> CAAGCCACTTCCTTTTTGCATTG	<u>EcoRI</u>
3_Pm_BamHI	<u>GGATCC</u> ATTATTGTTTCTGTTGCATAAAGCC	BamHI
5_HlyE_KpnI	CGCGGGT <u>ACCT</u> AGAAATTAAGAGGAGAAATTAAGCATGAC- TGAAATCGTTGCAGA	KpnI
3_HlyE_XhoI	CGCGCTCGAGTCAGACTTCAGGAACCTCAAAGAGT	XhoI
pMR1_fdhF_F	AATGTGGCATAAAAGATGCATACTGTAGTCGGGATCCTTG- CGATCG	<u>EcoRI</u>
pMR1_fdhF_R	TTATGTGGGGTCATTCCCTGATATTACGGGG <u>GAATTC</u> AGCCT- TAATTAATAATTGC	BamHI
pMR1_fdhFmut_F	AATGTGGCATAAAAGATGCATACTGTAGTCGGGATCCTTG- CGATCG	<u>EcoRI</u>
pMR1_fdhFmut_R	ATTGATGGGGTCAATTCTTGATATTACGGGG <u>GAATTC</u> AGCCT- TAATTAATAATTGC	BamHI
pMR1_HIPopt_F	GTCTTTTCTTGCTTAATAATGTTGTCAGGATCCTTGCGATCG	<u>EcoRI</u>
pMR1_HIPopt_R	AAATATTGATTCAGATCAATTTTATCC <u>GAATTC</u> AGCCTTAAT- TAAATTC	BamHI
pMR1_pepT_F	CTTTTCTTGCTTATTAATAATGTTGTCAGGATCCTTGCGATCG	<u>EcoRI</u>
pMR1_pepT_R	ACAAATATTGCGTCAGGTCACCTTTTATC <u>GAATTC</u> AGCCTTAAT- TTAAATTCG	BamHI
pMR1_pJ23100_F	AGGTACAGTGCTAGCAAGTAGTGGATCCTTGCGATC	<u>EcoRI</u>
pMR1_pJ23100_R	AGGACTGAGCTAGCCGTCAAT <u>GAATTC</u> AGCCTTAATTAATA- TTTCG	BamHI
pMR1_pJ23106_F	AGGTACAATGCTAGCAAGTAGTGGATCCTTGCGATC	<u>EcoRI</u>
pMR1_pJ23106_R	AGGACTGAGCTAGCCGTAAAT <u>GAATTC</u> AGCCTTAATTAATA- TTTCG	BamHI
pMR1_pJ23113_F	AGGGATTATGCTAGCAAGTAGTGGATCCTTGCGATC	<u>EcoRI</u>
pMR1_pJ23113_R	AGGACTGAGCTAGCCATCAGT <u>GAATTC</u> AGCCTTAATTAATA- TTTCG	BamHI
pMR1_Pfnr_R	GTTTAAAGACTATACCAACTTGATTAAATTC TTGTAATAAA- CATTAAAGAGGAGAAAATGGATTTTGTCTTATTGAACGAG	-
pMR1_Pfnr_F	GAATTAATCAAGTTGGTATAGTCTTAAACT GTCTTGAT- CATGATCAACGGCAGGTACATCAGAACAGTAC	-

Em **negrito** estão as sequências complementares para o anelamento dos fragmentos de PCR e amplificação do cassete completo contendo o promotor P_{FNR}.

Figura 10. Esquema da estratégia de substituição dos genes repórteres no circuito P_{FNR} -XylS-Pm-'Efetor'.

A, o plasmídeo pMR1-XylS-Pm é usado de vetor. Após 1 (digestão), o vetor aberto é extraído por eletroforese em gel de agarose e purificado; segue-se com 2 (ligação) utilizando inserto com a sequência pré-digerida dos novos 'Efetores': B, fragmento fita dupla de DNA quimicamente sintetizado (gBlock®) do gene FbFP ou, C, produto de PCR usando primers para amplificar o gene *clyA* diretamente do cromossomo de *E. coli* flanqueado pelos sítios de restrição das enzimas KpnI e XhoI.

Tabela 3. Sequência do fragmento de DNA dupla (gBlock) com o gene FbFP de *E. coli*.

gBlock – EcFbFP

```
CGCGGGTACCTAGAAATTAAGAGGAGAAATTAAGCATGGCGTCGTTCCAGTCGTTCCGG-
CATCCCAGGCCAGCTGGAAGTCATCAAGAAGGCGCTGGATCACGTGCGCGTCGGCGTGGTCATC
ACCGATCCCGCGCTGGAAGATAACCCGATCGTCTACGTGAACCAGGGCTTCGTGCAGATGAC-
CGGCTACGAGACCGAGGAAATCCTGGGCAAGAACGCGCGCTTCCTCCAGGGGAAGCACACCGAT
CCGGCGGAAGTGGACAACATCCGCACCGCGCTGCAAAATAAAGAACCGGTCACCGTG-
CAGATCCAGAACTACAAGAAGGACGGCACGATGTTCTGGAACGAACTGAACATCGATCCGATGG
AAATCGAGGATAAGACGTATTTCTGTCGGCATCCAGAACGACATCACCAAGCAGAAGGAA-
TATGAAAAGCTGCTGGAGTAACCTCGAGCGCG
```

3.4 Construção vetores de caracterização dos novos promotores

Buscamos na literatura mais quatro sequências de promotores (*pepT*, *HIP-opt*, *fdhF* e *fdhF-mut*) capazes de responder à hipóxia e serem reconhecidos pelo FNR, entretanto, diferentemente do promotor $P_{FNR2,3}$, os caracterizamos por meio do controle direto da expressão dos genes repórteres em condições de baixa de oxigênio, ao invés inseri-lo no circuito para regular a transcrição de XylS. Também incluímos três promotores constitutivos com forças de expressão variada, escolhidos do

Catálogo de Promotores do Repositório de partes biológicas padronizadas da *iGEM Foundation*, para servirem de controle positivo.

Inserimos as novas sequências à montante dos genes *gfp* e *fbfp*, cada qual em um vetor separado. Utilizamos um protocolo de mutação sítio-dirigida (*SDM*) em que dividimos as sequências dos promotores entre dois *primers* posicionados de forma divergente, com as extremidades 3' de cada um apontando em direções opostas (KUNKEL, 1985). Após a amplificação do plasmídeo por meio de PCR, foi adicionada à reação a enzima DpnI, a qual é capaz de reconhecer e clivar apenas sítios de ligação modificados por metilação, uma modificação que afeta somente vetores derivados diretamente de replicação bacteriana, e, dessa forma, mantém intacto os fragmentos produtos da PCR (**Figura 11**). Com isso, é possível minimizar a obtenção de clones falso positivos, aqueles contendo o plasmídeo inicial, capaz de conferir resistência ao antibiótico de seleção, mas sem carregar o novo promotor clonado.

Figura 11. Esquema do processo de obtenção da biblioteca dos plasmídeos com a coleção de promotores induzíveis (*fdhF*, *fdhFmut*, *HIP-opt* e *pepT*) e constitutivos (*pJ100*, *pJ106*, *pJ113* e *pJ114*). O vetor original pMR1 é amplificado com os pares de *primers* contendo, cada um, uma parte da sequência promotora, em seguida, o produto de PCR é incubado com um mix das enzimas *kinase*, *ligase* e DpnI para uma rápida incorporação dos insertos no vetor.

Prosseguiu-se com a reação de ligação, utilizando a enzima T4 ligase e, em seguida, usamos 5 µl da reação para transformar células de *E. coli* DH10B quimio-competentes, as quais foram plaqueadas e crescidas *overnight* a 37 °C. Após seleção e extração do DNA plasmidial de alguns clones das placas, sequenciamos o DNA para confirmar a presença e identidade dos promotores clonados.

3.5 Curva de crescimento e análise da expressão gênica

3.5.1 Circuito XylS

A medição do nível de expressão e crescimento das cepas transformadas com a coleção de vetores construídos, foi feita em placas de 96 poços utilizando o leitor espectrofotométrico Victor X3 (PerkinElmer, Inc.). Para cada ensaio, primeiramente eram preparados pré-inóculos a partir de uma colônia isolada da bactéria em 1 ml de meio M9 em tubo tipo Eppendorf de 2 ml, com o antibiótico adequado para seleção do vetor. A cultura era então incubada a 37 °C e 220 rpm por 16 horas. Após a incubação, inoculava-se em cada poço da placa 10 µl de células em 190 µl de meio M9 com antibiótico adequado. Para construções contendo o regulador XylS, a solução do meio também continha concentrações crescentes (0, 100, 250, 500 e 1000 mM) de indutor específico (ácido salicílico, ácido acetil-salicílico ou ácido 3-metil-benzóico), em que cada composto possui uma força de indução diferente. Todos os ensaios eram feitos com triplicatas técnicas e biológicas.

Os níveis de expressão eram calculados a partir dos valores médios de fluorescência das replicatas em unidades arbitrários (AU), normalizados pela densidade ótica (OD_{600}), de maneira a compensar por diferenças de expressão causadas pela variação no crescimento celular, conforme descrito pela equação 1:

Equação 2
$$\text{Expressão gênica (AU/OD 600)} = \frac{\text{média triplicata fluorescência}}{\text{média triplicata densidade ótica}}$$

3.6 Sistema de hipóxia

Para incubação dos clones em condição de anaerobiose, inicialmente foi usada a incubadora multigás (CO_2/O_2) cell/Q modelo MCO-170M-PA (Panasonic Ltda.), gentilmente cedida pelo Professor Dr. Gustavo Goldman, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP Ribeirão Preto. As células foram cultivadas em placas de 96 poços conforme descrito na sessão 2.5. Após preparo das placas, foi feita a medição inicial de fluorescência e OD_{600} no tempo zero. Em seguida, elas foram imediatamente transportadas e incubadas por 6 horas na incubadora cell/Q com atmosfera de >1% O_2 e 5% CO_2 e, então, trazidas novamente ao laboratório e medidas no leitor de placas.

Os ensaios subsequentes foram realizados em um sistema próprio de incubação em hipóxia montado no laboratório, desenvolvido a partir de um recipiente plástico de 3 litros com tampa de vedação hermética para uso doméstico. Além do fechamento hermético para prevenir a entrada de ar contendo oxigênio, o sistema incluía um sachê Oxid AnaeroGen 2.5L (Thermo Scientific™) para remoção do oxigênio presente no ar do interior da câmara, por meio de reação de conversão de O_2 em CO_2 . Para acelerar o consumo do oxigênio interno, também era adicionada uma vela redonda pequena do tipo Brigitte acesa no interior da câmara, ao lado das placas. Após o posicionamento de todos os componentes do sistema (placa de 96 poços, sachê Oxid AnaeroGen e vela acesa), o recipiente era tampado e selado com fita branca na junção entre a tampa e a parede da câmara. Um esquema do sistema montado pode ser visto na **Figura 12**.

Figura 12. Sistema de incubação doméstico para (A) cultivo em hipóxia, composta por (i) câmara hermética, (ii) sachê com reagente para consumo do oxigênio interno e (iii) placa de 96 poços com inóculos em meio M9 Cas amino-ácido; e (B) controle em normóxia, com mesmo inóculo.

Alguns dos ensaios foram feitos com o meio de cultura M9 desgaseificado. As soluções contendo o meio foram inseridas em uma câmara para baixa pressão e, utilizando um sistema de vácuo disponível, grande parte dos gases dissolvidos foram removidos da solução na forma de bolhas. Após uma a duas horas sob pressão negativa, não se detectava mais o surgimento de bolhas liberadas da solução. As soluções de meio eram usadas imediatamente após desgaseificação.

3.7 Análise dos dados

A análise dos dados, elaboração dos gráficos de curva de crescimento e expressão gênica foram feitas utilizando o programa Microsoft Excel® do Pacote Office 2016.

4 RESULTADOS

4.1 Circuito XylS FNR

A arquitetura básica do circuito que foi montado é composta de uma cascata de regulação na qual a expressão do regulador genético responsivo à salicilato, XylS, descrito no trabalho de Silva-Rocha e colegas sobre otimização sítio-dirigida de reguladores transcricionais, está sob controle de um promotor sensível à hipóxia (P_{FNR}). Em condições de anaerobiose, o fator de transcrição FNR sofre dimerização e se liga ao seu sítio de ligação dentro do seu promotor, ativando a sinalização do circuito. O regulador XylS, posicionado à jusante do promotor P_{FNR} , é então expresso e, na presença de um indutor apropriado, um composto aromático substituído, como por exemplo, o ácido acetil-salicílico, assume conformação ativa e promove a expressão do último gene da cascata (**Figura 3**).

Selecionamos com base na literatura (DEYNEKO et al., 2016) um promotor de FNR otimizado para apresentar expressão exclusivamente dentro do ambiente tumoral, ao mesmo tempo que não apresenta ativação em outros tecidos. O promotor $P_{FNR2.3}$ foi inserido junto com o cassete XylS-*Pm* no vetor de trabalho pMR1, resultando no novo plasmídeo pMR1- $P_{FNR2.3}$ -XylS-*Pm* (**Figura 13**).

Figura 13. A, Representação geral do plasmídeo pMR1 contendo o gene *xyIS*. B, diferentes construções obtidas dependendo da inclusão do promotor P_{FNR} à montante do gene *xyIS* e do gene repórter usado.

Em posse do novo vetor clonado, pudemos substituir o gene repórter original do circuito, a proteína GFP/*va*, pelas sequências das proteínas FbFP e ClyA por meio de digestão usando as enzimas KpnI e XhoI, e, dessa forma, obter os plasmídeos pMR1- $P_{FNR2.3}$ -XylS-*Pm*-FbFP e pMR1- $P_{FNR2.3}$ -XylS-*Pm*-ClyA, respectivamente. Após clonagem, os vetores foram confirmados através de reação de digestão utilizando o mesmo par de enzimas (**Figura 14**).

Também optamos por construir uma versão do vetor original pMR1-XylS-*Pm*-A111V com a proteína FbFP para avaliar sua ativação em hipóxia. Utilizando o mesmo par de enzimas, EcoRI e BamHI, trocamos o cassette $P_{FNR2.3}$ -XylS-*Pm* do vetor recém construído pelo cassette XylS-*Pm*, com o promotor nativo do gene *xylS*, do vetor pMR1-XylS-*Pm*-A111V. Dessa forma, adicionamos o plasmídeo pMR1-XylS-*Pm*-FbFP à nossa coleção (**Figura 15**).

Figura 14. A, Eletroforese em gel de agarose 1% TAE da reação de digestão do vetor (A) pMR1- P_{FNR} -XylS-*Pm* com as enzimas EcoRI e BamHI, com o cassette P_{FNR} -XylS-*Pm*.corresponde à banda de tamanho 1300 pb e o vetor aberto a de 4000 pb; B, pMR1- P_{FNR} -XylS-FbFP e, C, pMR1- P_{FNR} -XylS-ClyA com as enzimas KpnI e XhoI. As bandas com tamanhos próximos a 400 pb e 900 pb correspondem aos fragmentos com os genes *fbfp* e *clyA*, respectivamente.

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose 1% TAE da reação de digestão com as enzimas EcoRI e BamHI para confirmação das células transformadas com o vetor pMR1-XylS-FbFP. O tamanho do cassete XylS-FbFP, derivado do vetor pMR1-XylS(A111V), é de 1791 pb, o clone positivo está indicado pelo + vermelho. (C+): controle positivo = vetor pMR1-XylS(A111V); (C-): controle negativo = vetor pMR1-P_{FNR}-XylS-FbFP, ambos os controles foram submetidos a mesma reação de digestão.

Após obter a biblioteca de vetores listada na **Tabela 4**, transformamos, por meio de eletroporação, uma linhagem eletrocompetente de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DZ-146 SB300 (KANIGA et al., 1994).

Tabela 4. Lista dos vetores usados para transformar a linhagem de *Salmonella* spp. Typhimurium.

Vetor	Ref.	Promotor	Ref.	Efector
pMR1	GUAZZARONI, 2014	P _{lac}	HASAN, 1987	GFP
pMR1-XylS(A111V)	MONTEIRO, 2018	P _s	MARQUÉS et al., 1998	GFP
pMR1-XylS-FbFP	Este trabalho			FbFP
pMR1-P _{FNR2.3} -XylS-Pm	Este trabalho	P _{FNR2.3}	DEYNEKO et al., 2016	GFP
pMR1-P _{FNR2.3} -XylS-FbFP	Este trabalho			FbFP

4.2 Caracterização do circuito XylS-Pm em *E. coli* & *Salmonella*

Para caracterizar o comportamento dos circuitos, usamos a coleção de vetores da **Tabela 4**, clonados em *E. coli* e *Salmonella* spp. Typhimurium, para avaliar a eficácia da resposta do promotor sintético P_{FNR2.3} à condição de hipóxia. Todos os circuitos continham ou gene para expressão da proteína verde fluorescente, GFP/*va*, ou a proteína fluorescente independente de oxigênio, FbFP. O marcador GFP/*va* possui

uma cauda de degradação LVA conectada ao seu domínio terminal C, o que reduz o acúmulo de GFP e aumenta a renovação das proteínas. Dessa forma, obtém-se uma medida de fluorescência mais precisa na análise dos padrões de expressão (ANDERSEN et al. 1998). A dependência da molécula de GFP por oxigênio para maturar seu sítio cromóforo e emitir sinal fluorescente serve de indicador sobre a condição de crescimento do nosso sistema (com oxigênio ou sem oxigênio) e permite inferir se houve efetiva hipóxia durante a incubação das linhagens. Por outro lado, a proteína FbFP utiliza um mononucleotídeo de flavina como cromóforo e permite que ela apresente luminosidade em ambos os ambientes: aqueles dotados ou com ausência de oxigênio (DREPPER, 2007). O nível de expressão de cada promotor foi determinado por meio da comparação das médias das fluorescências obtidas por cada construção crescida como descrito em 2.5.

A **Figura 16** mostra as curvas de crescimento exibindo o efeito de cada construção.

Utilizamos a câmara de hipóxia cell/Q para gerar a condição de anaerobiose ($[O_2] < 1\%$) e medimos a fluorescência em cada circuito nos tempos zero e seis horas após incubação. As **Figuras 17 e 18** mostram os resultados do comportamento de cada circuito nos dois organismos em condições de hipóxia e normóxia, e o efeito de glicose (0,4%) no sistema – a glicose causa a repressão catabólica do fator de transcrição CRP, cujo sítio de ligação é significativamente semelhante ao sítio do FNR (SPIRO et al. 1990; ISHIZUKA et al. 1994), de tal forma que decidimos incluir essa condição para investigar a possibilidade da ativação do circuito pela ligação do CRP no promotor $P_{FNR2.3}$.

Os experimentos repetidos com a inclusão de glicose (0,4%), em que podemos assumir a inibição de CRP, apresentam o mesmo perfil de expressão das construções testadas sem glicose.

Após 6 horas de indução, nota-se a queda absoluta de fluorescência das células abrigando o circuito com a GFP/*va* quando crescidas em condição de hipóxia, tanto em *E. coli*, caindo de 860.000 para 130.000 ($\Delta_{AU/OD} = 85\%$), quanto em *Salmonella*, indo de 1.520.000 para 535.000 ($\Delta_{AU/OD} = 65\%$), na situação de maior expressão: utilizando 500 μ M de 3-metil-benzoato, com o regulador XylS sendo expresso

constitutivamente sob controle de seu promotor natural, P_s (**Figuras 17, a e b, e 18, a e b**) (KOUTINAS et al. 2010).

Figura 16. Curva de crescimento de células de *E. coli* carregando as construções listadas na Tabela 6. A, todas as 16 construções reunidas. B e C, células apenas com promotores constitutivos e induzíveis, respectivamente.

Na substituição do promotor *Ps* pelo promotor sintético $P_{FNR2.3}$, também ocorre a mesma queda brusca de fluorescência da GFP/*va*, entretanto, as construções induzidas com salicilato e ácido acetil-salicílico não apresentam expressão significativa em nenhuma condição, seja de normóxia ou hipóxia. Essa queda na fluorescência com o indutor 3-MBz é mais percebida no teste com *E. coli* (Figura 17, c e d) do que nos clones de *Salmonella* spp. Typhimurium (Figura 18, c e d).

Figura 17. Atividade dos circuitos sintéticos com GFP como gene repórter em *E. coli*. Condições de hipóxia ou normóxia e, com ou sem a presença de glicose no meio, utilizando 0,5 ou 1 mM dos indutores 3-metil-benzoato (3MBz), salicilato (Sal) e ácido acetil-salicílico (ASA). A, Circuito XylS-GFP/*va* sob controle do promotor nativo *Ps* sem adição de glicose. B, Circuito XylS-GFP/*va* sob controle do promotor nativo *Ps* com adição de glicose. C, Circuito XylS-GFP/*va* sob controle do promotor sintético $P_{FNR2.3}$ sem adição de glicose. D, Circuito XylS-GFP/*va* sob controle do promotor sintético $P_{FNR2.3}$ com adição de glicose. A condição de teste sem glicose serviu de Controle para avaliar o possível efeito de indução do promotor sintético pelo fator de transcrição CRP.

Figura 18. Atividade dos circuitos sintéticos com GFP como gene repórter em *Salmonella* spp. Typhimurium. Condições de hipóxia ou normóxia e, com ou sem a presença de glicose no meio, utilizando 0,5 ou 1 mM dos indutores 3-metil-benzoato (3MBz), salicilato (Sal) e ácido acetil-salicílico (ASA). A, Circuito XylS-GFP/*iva* sob controle do promotor nativo *Ps* sem adição de glicose. B, Circuito XylS-GFP/*iva* sob controle do promotor nativo *Ps* com adição de glicose. C, Circuito XylS-GFP/*iva* sob controle do promotor sintético *P_{FNR}* sem adição de glicose. D, Circuito XylS-GFP/*iva* sob controle do promotor sintético *P_{FNR}* com adição de glicose. A condição de teste sem glicose serviu de Controle para avaliar o possível efeito de indução do promotor sintético pelo fator de transcrição CRP.

Figura 19 Atividade dos circuitos sintéticos com FbFP como gene repórter em *E. coli*. Condições de hipóxia ou normóxia e, com ou sem a presença de glicose no meio, utilizando 0,5 ou 1 mM dos indutores 3-metil-benzoato (3MBz), salicilato (Sal) e ácido acetil-salicílico (ASA). A, Circuito XylS-FbFP sob controle do promotor nativo *Ps* sem adição de glicose. B, Circuito XylS-FbFP sob controle do promotor nativo *Ps* com adição de glicose. C, Circuito XylS-FbFP sob controle do promotor sintético *P_{FNR2.3}* sem adição de glicose. D, Circuito XylS-FbFP sob controle do promotor sintético *P_{FNR2.3}* com adição de glicose. A condição de teste sem glicose serviu de Controle para avaliar o possível efeito de indução do promotor sintético pelo fator de transcrição CRP.

Figura 20. Atividade dos circuitos sintéticos com FbFP como gene repórter em *Salmonella*. Condições de hipóxia ou normóxia e, com ou sem a presença de glicose no meio, utilizando 0,5 ou 1 mM dos indutores 3-metil-benzoato (3MBz), salicilato (Sal) e ácido acetil-salicílico (ASA). A, Circuito XylS-FbFP sob controle do promotor nativo P_s sem adição de glicose. B, Circuito XylS-FbFP sob controle do promotor nativo P_s com adição de glicose. C, Circuito XylS-FbFP sob controle do promotor sintético $P_{FNR2.3}$ sem adição de glicose. D, Circuito XylS-FbFP sob controle do promotor sintético $P_{FNR2.3}$ com adição de glicose. A condição de teste sem glicose serviu de Controle para avaliar o possível efeito de indução do promotor sintético pelo fator de transcrição CRP.

Os circuitos genéticos contendo a proteína FbFP, por outro lado, apresentam fluorescência em ambas as condições de cultivo (normóxia e hipóxia). Para os circuitos expressos em *E. coli*, os níveis de fluorescência foram semelhantes quando induzidos com 3-MBz nas condições Controle e Glicose, porém, apresentaram leve queda na condição Controle (sem glicose) nos circuitos XylS- P_s (Figura 19, a e b). Já os clones de *E. coli* cultivados com glicose e as cepas de *Salmonella*, nos dois casos,

demonstraram ligeira maior expressão com os indutores mais fortes, 3 metil-benzoato (3-MBz) e salicilato (Sal) (**Figuras 19**, a e b, e **20**, a e b).

As versões contendo o promotor $P_{FNR2.3}$ novamente apresentaram menor resposta nas duas condições, mas ainda com o perfil de expressão similar ao do circuito XylS-Pm (**Figuras 19**, c e d, e **20**, c e d).

4.3 Clonagem dos promotores pepT, HIP-opt, fdhF, fdhF-mut

Devido à baixa responsividade do promotor $P_{FNR2.3}$ às condições de hipóxia, buscamos explorar novos promotores induzíveis reconhecidos pelo fator de transcrição FNR. Seleccionamos quatro novos promotores que apresentam sítios de ligação semelhantes à sequência consenso do fator FNR (NNNNANAN-**TTGAT**-NNAN-**ATCAA**-TNNN) (MILLER et al., 1991). Eles estão descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5. Lista de promotores candidatos a induzir a ativação do circuito em resposta à condição de hipóxia.

Promotor	Sequência	Referência
HIP-1	GGATAAA ATTGAT CTGAAT CAATATTTGTC TTTTCT TGCTTAA- TAAT GTTGTC	MENGESHA et al., 2006
pepT	GATAAA GTGAC CTGACG CAATATTTGTC TTTTCTT- GCTTATTAATAATGTTGTCA	MILLER et al., 1991
fdhF	CCCGTAATATCAGGGA ATGAC CCACATAAAAT GTGG- CATAAA GAT GC ATACTGTAGTCG	BIRKMANN et al., 1987
fdhF mut	CCCGTAATATCA AGATTTGAC CCCATCTAAAT GTGG- CATAAA GAT GC ATACTGTAGTCG	ANDERSON et al., 2006

Em negrito estão marcadas as bases consenso do sítio de ligação de FNR, sublinhado estão as caixas de reconhecimento pela RNA polimerase, em vermelho são mutações de bases para melhorar a resposta do promotor à hipóxia.

Clonamos o novo conjunto de promotores constitutivos e potencialmente responsivos a hipóxia seguindo o método de mutagenese sítio-dirigida, descrito na seção **2.3**, de maneira a obter a família com 16 construções, conforme **Tabela 6**.

Utilizamos como sistema de expressão inicial o vetor pMR1-FbFP para inserir, por meio da reação de PCR, os novos promotores à montante dos genes repórteres. Esse processo gerou as linhagens pMR1-pepT-FbFP, pMR1-HIP-FbFP, pMR1-fdhF-FbFP e pMR1-fdhFmut-FbFP (**Figura 21**). Da mesma forma, porém usando o vetor pMR1 contendo como gene repórter a proteína GFP/*va*, clonamos as sequências dos promotores constitutivos pJ100, pJ106 e pJ113 (**Figura 22**).

Tabela 6. Lista de construções obtidas para caracterização dos promotores induzíveis por hipóxia.

Plasmídeo	Promotor	Repórter		Linhagem <i>E. coli</i>
		GFP	FbFP	
-	-	-	-	<i>DH10B</i>
pMR1-GFP	-	X	-	<i>DH10B</i>
pMR1-FbFP	-	-	X	<i>DH10B</i>
pMR1-pJ100-GFP	pJ100	X	-	<i>DH10B</i>
pMR1-pJ100-FbFP		-	X	<i>DH10B</i>
pMR1-pJ106-GFP	pJ106	X	-	<i>DH10B</i>
pMR1-pJ106-FbFP		-	X	<i>DH10B</i>
pMR1-pJ113-GFP	pJ113	X	-	<i>DH10B</i>
pMR1-pJ113-FbFP		-	X	<i>DH10B</i>
pMR1-fdhF-GFP	fdhF	X	-	<i>DH10B</i>
pMR1-fdhF-FbFP		-	X	<i>DH10B</i>
pMR1-fdhFmut-GFP	fdhF-mut	X	-	<i>DH10B</i>
pMR1-fdhFmut-FbFP		-	X	<i>DH10B</i>
pMR1-HIP-GFP	HIP-opt	X	-	<i>DH10B</i>
pMR1-HIP-FbFP		-	X	<i>DH10B</i>
pMR1-pepT-GFP	pepT	X	-	<i>DH10B</i>
pMR1-pepT-FbFP		-	X	<i>DH10B</i>

Após a clonagem bem-sucedida dos promotores nos vetores, optamos por obter a interconversão das proteínas fluorescentes, a fim de termos construções com ambos os sistemas repórteres: dependente e independente de oxigênio (GFP para os promotores induzíveis e FbFP para os constitutivos). Seguimos com a digestão utilizando as enzimas KpnI e XhoI para liberação do fragmento contendo o gene repórter de um vetor, seguido pela ligação do fragmento junto ao outro vetor aberto, já digerido pelo mesmo par de enzimas. Por fim, obtivemos todas as construções com ambos os repórteres almejados (**Figura 23** mostrando um gel da reação de PCR a clonagem dos promotores induzíveis).

Figura 21. Eletroforese em gel de agarose 1% TAE da reação de digestão com as enzimas KpnI e XhoI para confirmação das células transformadas com o vetor pMR1- P_{FNR} -FbFP, em que $P_{FNR} = P_{fdhF}$, $P_{fdhF-mut}$, $P_{HIP-opt}$ ou P_{pepT} . A banda superior em cada coluna corresponde ao vetor aberto de aproximadamente 3000 pb e a banda inferior corresponde ao segmento de 400 pb da FbFP.

Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 1% TAE da reação de digestão com as enzimas KpnI e XhoI para confirmação das células transformadas com o vetor pMR1- P_{FNR} -GFP, em que $P_{FNR} = P_{j100}$, P_{j106} , P_{j113} . A banda superior em cada coluna corresponde ao vetor aberto e a banda inferior corresponde ao segmento de 700 pb da GFP.

Figura 23. Eletroforese em gel de agarose 1% TAE da reação de PCR de colônia para confirmação de clones positivos usando primers para amplificar o cassete P_{FNR} -Repórter (FbFP ou GFP). Índices no topo de cada coluna indicam o promotor clonado (1- pepT, 2- HIP-opt, 3- fdhF-mut e 4- fdhF) e o # clone selecionado após transformação (1 a 4).

4.4 Caracterização dos promotores pepT, HIP-opt, fdhF, fdhF-mut

Os plasmídeos da **Tabela 6** foram clonados em células de *E. coli* DH10B quimio-competentes e suas sequências foram confirmadas por sequenciamento. Para a caracterização dos promotores escolhidos foram feitas construções contendo o gene para expressão da proteína verde fluorescente, GFP/*va*, e a proteína fluorescente independente de oxigênio, FbFP, sob controle dos promotores sintéticos no vetor pMR1, semelhante à caracterização do promotor $P_{FNR2.3}$. Seguindo o mesmo método da sessão **2.5**, o nível de expressão de cada promotor foi determinado por meio da comparação das médias das fluorescências obtidas por cada construção.

Utilizamos como controles positivos para os dados de expressão os promotores constitutivos, pJ100, pJ106 e pJ113, cuja força de expressão relativa esperada é 100%, 60% e 1%, respectivamente, com base nos dados de análise de expressão da *iGEM Foundation* (<http://parts.igem.org/Promoters/Catalog/Anderson>). A **Figura 24** revela a presença de sinais significativos de fluorescência apenas no sistema sob condição de aerobiose, incubado sem restrição de oxigênio, durante os vários tempos de medição. De maneira contrária, os níveis de fluorescência da GFP/*va* se mantêm muito baixos, semelhantes aos níveis do controle negativo (Ø – clone sem sequência promotora controlando a expressão do gene repórter), nos clones incubados anaerobicamente. A mesma comparação foi feita com os promotores induzíveis e, mesmo todas as construções apresentando baixa expressão, também se observou maior sinal de fluorescência quando os clones portando GFP foram incubados em normóxia (**Figura 25**).

Figura 24. Nível de expressão dos promotores constitutivos controlando a expressão do gene repórter GFP em (a) condição controle de Normóxia e (b) Hipóxia ao longo de 48 horas. DH10B representa células sem plasmídeos, Ø representa o controle negativo com células transformadas com o vetor sem promotor pMR1.

Figura 25. Nível de expressão dos potenciais promotores induzíveis controlando a expressão do gene repórter GFP em (a) condição controle de Normóxia e (b) Hipóxia ao longo de 48 horas. Ø representa o controle negativo com células transformadas com o vetor sem promotor pMR1.

Todavia, o nível de fluorescência da proteína FbFP apresentou queda quando incubada em condições de hipóxia em ambos os conjuntos de promotores testados, constitutivos e induzíveis (**Figura 26 e 27**).

Figura 26. Nível de expressão dos promotores constitutivos controlando a expressão do gene repórter FbFP em (a) condição controle de Normóxia e (b) Hipóxia ao longo de 48 horas. DH10B representa células sem plasmídeos, Ø representa o controle negativo com células transformadas com o vetor sem promotor pMR1.

Figura 27. Nível de expressão dos potenciais promotores induzíveis controlando a expressão do gene repórter FbFP em (a) condição controle de Normóxia e (b) Hipóxia ao longo de 48 horas. Ø representa o controle negativo com células transformadas com o vetor sem promotor pMR1.

A **Figura 28** mostra a variação dos níveis de fluorescência em hipóxia e normóxia para cada promotor induzível ao longo do período de 48 horas. Apenas no momento inicial de incubação, tempo 0, é possível observar maior fluorescência em hipóxia; entretanto, esses valores não se distanciam muito do controle sem promotor. Em todos os outros casos, com exceção da construção pepT-GFP/*va* no tempo 8 h, a variação (*Fold Change*) não ultrapassa significativamente valores de duas vezes menos fluorescência nas condições de hipóxia do que em normóxia, em que $\log_2 [\text{Fold change (Hipóxia/Normóxia)}] \approx -1$.

Figura 28. Multiplicidade (*fold change*) da ativação da expressão dos promotores induzíveis em hipóxia em relação à condição de normóxia (H/N) nos vários tempos de medição.

5 DISCUSSÃO

A base teórica do direcionamento tumoral bacteriano é sólida. No entanto, são necessários aprimoramentos para melhorar a localização, colonização, perfil de efeitos colaterais e eficácia clínica. Com base nas abordagens trazidas pela biologia sintética, buscamos redesenhar dois agentes bacterianos com propriedades oncolíticas previamente descritas, as Enterobactérias *Escherichia coli* e *Salmonella entérica* serovar Typhimurium, por meio da concatenação de propriedades microbiológicas específicas presentes nesses organismos, a detecção de e sobrevivência em um ambiente exaurido de oxigênio (hipóxia), e a resposta a um fármaco clinicamente aprovado, o ácido acetilsalicílico, ou aspirina. No contexto da produção de agentes terapêuticos bacterianos nossa estratégia se baseou em elementos genéticos capazes de reconhecer esses dois sinais, um promotor induzível e um regulador proteico, sob a arquitetura de uma cascata de regulação que permite restringir a atividade citolítica das nossas cepas recombinantes aos sítios de atividade tumoral.

A avaliação e caracterização das nossas construções exigiram a realização dos experimentos em condições de baixa concentração de oxigênio, para induzir anaerobiose nos inóculos. Primeiramente, utilizamos uma câmara de incubação com controle de gases (cell/Q), entretanto, a demanda por abastecimento com cilindros de CO₂ nos incentivou a desenvolver um sistema doméstico que oferecesse um ambiente pobre ou exaurido de oxigênio. Para tal, utilizamos um recipiente plástico com vedação hermética, capaz de prevenir a entrada do oxigênio atmosférico e um catalisador químico (Oxoid™ AnaeroGen™, ThermoFisher Scientific Inc.) que converte o O₂ interno em CO₂ (**Figura 12**). O sistema demonstrou enorme simplicidade operacional e eficiência na geração de hipóxia, além de baixo custo. A avaliação da depleção de oxigênio foi feita indiretamente através da medição da fluorescência da proteína repórter GFP, como descrito na seção 3.2, o que permite dispensar a inclusão de aparelhagem com sensores específicos para monitorar a concentração de oxigênio.

Dentro da nossa busca em explorar o repertório de funções biológicas que as células microbianas podem incorporar em seus quadros fisiológicos e metabólicos, procuramos convergir uma plataforma que oferecesse opções de manipulação de fácil acesso e propriedades microbianas em consonância com a aplicação clínica pretendida. Atualmente, células projetadas podem ser construídas adotando uma

combinação de ferramentas de edição de genoma (MOORE; CHANDRAHAS; BLERIS, 2014; BERNDT; DEISSEROTH, 2015; KNOTT; DOUDNA, 2018), síntese química ou enzimática de DNA (CHANG, 1975; HUGHES; ELLINGTON, 2017) e tecnologias de montagem de DNA (CASINI, A. et al., 2015) - cumprindo, assim, o objetivo prático da biologia sintética, ou seja, a construção de células vivas a partir de partes individuais, que são propositadamente projetadas para produzir uma atividade funcional (JULLESSON et al., 2015). Alguns obstáculos importantes, no entanto, acabam de começar a ser levados em consideração. As células controlam naturalmente o fluxo de expressão gênica usando uma variedade sofisticada de camadas de regulação por meio da modificação de moléculas de RNA, proteínas e DNA, e essas redes reguladoras lhes permitem responder efetivamente a seus ambientes e sugestões externas. Portanto, espera-se que a adição de novas funções biológicas codificadas geneticamente a essas redes complexas tenha consequências diferentes, dependendo do organismo em que são introduzidas, pois essas camadas regulatórias seriam igualmente diferentes entre as espécies (FISCHBACH; VOIGT, 2010; JULLESSON, 2015). Vários hospedeiros bacterianos foram adotados para montar circuitos genéticos para fins específicos (JULLESSON, 2015; AWAN; SHAW; ELLIS, 2016) e, na maioria dos casos, a seleção da célula hospedeira foi meramente ditada por sua disponibilidade e/ou uso tradicional. No entanto, a biologia sintética visa, em última análise, programar células que possam executar as funções implantadas de maneira previsível, e esse objetivo exige a adoção de hospedeiros determinados e domesticados, que apresentam características distintas, dependendo da aplicação prevista (DELAYE, L.; MOYA, 2010; NIKEL; MARTÍNEZ-GARCÍA; DE LORENZO, 2014). No sentido mais amplo do termo, um chassi biológico pode ser definido como a contenção física, metabólica e regulatória para conectar e desconectar circuitos genéticos e dispositivos reguladores. Essa ampla definição incorpora um ponto de vista claro da engenharia, no qual um conjunto de peças predefinidas é montado de maneira racional e padronizada, levando ao objeto final (ENDY, 2005). Além disso, e conforme proposto por Danchin e Sekowska (2013), o conceito de chassi abrange a noção de que existe uma clara distinção entre um programa ou software que codifica a(s) função(s) de destino e uma máquina ou hardware (ou seja, o próprio chassi) que expressa e executa o programa.

Fora da questão de biologia sintética por si só, a escolha de um hospedeiro bacteriano adequado tem grandes implicações nas considerações envolvendo a aplicação em que se propõe utilizar o agente recombinante. Para que um sistema genético projetado funcione em um chassi, o chassi deve fornecer à célula energia, materiais para síntese de proteínas e materiais que essas proteínas usarão conforme exercem suas funções (CANTON, 2008). O chassi cuidará de todo o material necessário para atender às especificações exigidas pelo circuito projetado, especialmente considerando as características dos elementos genéticos empregados – como promotores e RBS. Quanto melhor o chassi for entendido e melhor fornecer materiais para o sistema engendrado, melhores serão os resultados. A grande proximidade filogenética entre as espécies *Escherichia coli* e *Salmonella enterica*, as quais pertencem à mesma família, Enterobacteriaceae, viabilizou a nossa estratégia de realizar a construção e clonagem de todos os vetores utilizando o organismo modelo *E. coli* linhagem DH10B, e posteriormente transplantarmos os plasmídeos para a linhagem de interesse *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (KARBERG; OLSEN; DAVIS, 2011), a qual observou-se em outros trabalhos ser capaz de acumular-se preferencialmente em tecidos tumorais em comparação com tecidos saudáveis, tais como fígado e baço (ZHAO, 2006). Ambas possuem significativa semelhança de uso de códons de leitura e compartilham a proteína ClyA (ou HlyE), no gabarito de toxinas citolíticas (HUNT, 2010; KARBERG; OLSEN; DAVIS, 2011) – a qual é usada como efetor do nosso circuito.

Entretanto, mesmo em vista da proximidade filogenética entre as bactérias, ainda é esperado observar uma diferença nos dados experimentais de expressão, em função da complexidade biológica particular de cada organismo (CANTON, 2008). Os circuitos expressos em *Salmonella* atingiram valores maiores do que duas vezes aqueles expressos em *E. coli* (**Figuras 17-18 e 19-20**). Isso pode implicar nas quantidades expressas e secretadas de ClyA por cada organismo, quando transformados com a versão final do circuito, de tal forma que doses menores de inóculo sejam necessárias usando *Salmonella* spp. como organismo hospedeiro. Consequentemente, seria importante avaliar esse efeito sobre a determinação da janela terapêutica (intervalo de concentração entre a dose mínima que apresenta atividade terapêutica e a dose máxima anterior ao surgimento de efeitos adversos), pois ao mesmo tempo que menores concentrações de bactéria implicam em menor risco de efeitos tóxicos, como

sepsse em função do tratamento (WEI et al., 2007; SEDIGHI et al, 2019), também poderiam acarretar na ineficiência do inóculo em colonizar os sítios tumorais e atingir um efeito oncolítico, devido aos processos de eliminação, ativos - através do sistema imune - ou passivos – baixa retenção celular no tecido alvo (DANHIER; FERON; PRÉAT, 2010; BERMUDES, 2019).

Todavia, é possível observar que nas construções contendo o promotor sintético $P_{FNR2.3}$, controlando a expressão do regulador XylS, os níveis de expressão são significativamente menores do que as construções reguladas pelo seu promotor nativo (**Figuras 17 e 18**). Dado que o promotor P_s funciona como um promotor constitutivo e oferece um nível basal de expressão que mantém quantidades suficientes do regulador XylS no citoplasma do chassi, de maneira a responder à presença dos indutores adicionados e resultar em níveis significativos de expressão dos genes repórter. Porém, quando sob a regulação do promotor sintético $P_{FNR2.3}$, a expressão fica próxima dos níveis basais, semelhantes aqueles obtidos sem a adição de indutores. Por meio dos circuitos expressando a proteína FbFP como repórter (**Figuras 19 e 20**), podemos inferir que a atividade do nosso promotor sintético não responde às concentrações de oxigênio do ambiente, pois os níveis de expressão tanto na presença (normóxia) quanto na ausência de O_2 (hipóxia) são praticamente idênticos. Adicionalmente, pode-se perceber que a indução causada pela adição do 3-metil-benzoato (3-MBz) causa um aumento discreto em ambas as condições de incubação. O 3-MBz é um dos indutores nativos do regulador XylS e demonstra o maior nível de indução em todos casos testados. A baixa fluorescência observada quando utilizando-o como sinal de entrada do circuito revela a baixa competência do promotor sintético em promover a transcrição do regulador, mesmo na presença do sinal de hipóxia.

Diversos fatores podem influenciar na capacidade do promotor em causar a transcrição da região codificadora (*CDS*) e gerar o sinal, denunciando sua atividade, tais como:

- i. dependência do contexto genético (MONTEIRO; ARRUDA; SILVA-ROCHA, 2018);
- ii. repressão por outros fatores (AMORES; GUAZZARONI; SILVA-ROCHA, 2015);

- iii. eficiência do reconhecimento com o sítio de ligação (BELL; COLE; BUSBY, 1990);
- iv. espaçamento entre os elementos que compõe um promotor (HAMMER; MIJAKOVIC; JENSEN, 2006);
- v. expressão do fator de transcrição atuante do sistema (FRANKEL; KIM, 1991);
- vi. otimização para ambientes intratumorais e não necessariamente à hipóxia (DEYNEKO, 2006).

Os circuitos genéticos sintéticos são construídos religando os fatores de transcrição e os promotores para criar novas topologias (ELOWITZ; LEIBLER, 2000; GARDNER; CANTOR; COLLINS, 2000; ATKINSON, 2003). Promotores, que iniciam a transcrição em resposta a fatores de transcrição e ligantes associados, são tipicamente derivados de componentes endógenos do hospedeiro ou espécies relacionadas para garantir a compatibilidade com o mecanismo de transcrição do hospedeiro. No entanto, as taxas de transcrição de promotores nativos e suas respostas aos indutores variam muito, pois são sintonizadas para responder a taxas adequadas ao seu ambiente natural (LANZER, M.; BUJARD, 1988; BROWNING; BUSBY, 2004). Essa incongruência potencial pode causar problemas na construção de circuitos de genes, pois a multiplicidade de indução de um promotor natural pode não corresponder àquela observado no contexto dentro do circuito sintético, e isso cause que o sistema não se comporte como projetado.

O primeiro passo no ajuste de um promotor é geralmente alterar sua produção geral, isto é, aumentar ou diminuir a quantidade de proteína produzida (ALPER et al., 2005). Isso pode ser alcançado de várias maneiras. Por exemplo, o número de cópias do gene pode ser alterado colocando-o em diferentes plasmídeos ou integrando-o várias vezes no cromossomo (MOHAN et al., 2008; ENGLAENDER et al., 2017), montando-se bibliotecas de promotores constitutivos e as testando para atingir os níveis de expressão alvo (MUTALIK et al., 2013). Além disso, embora não seja tecnicamente parte do promotor, a região 5' não traduzida (5' UTR) pode ser manipulada para alterar as taxas de tradução e, portanto, a produção das proteínas (SALIS; MIRSKY; VOIGT, 2009).

Muitas tentativas foram feitas para projetar sistemas de transcrição que são mais adequados para uso em circuitos genéticos sintéticos (COX; SURETTE;

ELOWITZ, 2007). O ajuste dessas vias regulatórias envolve a construção e teste de circuitos com sítios -35 e -10 pré-caracterizados (DAVIS; RUBIN; SAUER, 2011) e sequências Shine-Dalgarno (SALIS; MIRSKY; VOIGT, 2009) de forças variáveis até que as propriedades desejadas (por exemplo, vazamento ou multiplicidade de indução – *fold change*) sejam empiricamente alcançadas; no entanto, essa abordagem pode ser extremamente trabalhosa e dispendiosa. Além disso, embora esses métodos possam ajudar a controlar a expressão gênica, eles alteram universalmente a produção de proteínas, independentemente da concentração do indutor e a faixa dinâmica de expressão gênica pode mudar de maneiras imprevisíveis. Por exemplo, se alguém aumentasse o número de cópias de um gene para aumentar a produção de proteínas, as taxas de produção aumentariam tanto para o estado DESLIGADO (na ausência de indutor) quanto para o estado LIGADO (na presença de indutor).

De forma geral, promotores híbridos que respondem a dois ou mais fatores de transcrição foram construídos de várias maneiras, incluindo: codificando locais do operador para múltiplos fatores de transcrição em um único promotor; usando dois promotores consecutivos, cada um com seus próprios recursos regulatórios e local de início da transcrição (MONTEIRO; ARRUDA; SILVA-ROCHA, 2018); ou projetando diferentes fatores de transcrição que se ligam ao mesmo operador (SHIS et al., 2014). No entanto, a faixa dinâmica desses promotores sintéticos pode ser pequena - ou seja, suas saídas geralmente mostram apenas uma pequena diferença entre os estados DESLIGADO e LIGADO em resposta a sinais (ligantes) que se ligam aos fatores de transcrição. Apesar desses avanços na engenharia de promotores, tem sido difícil ajustar a faixa dinâmica de promotores sintéticos. Esse problema proíbe a construção fácil de circuitos genéticos sintéticos de várias camadas, que exigem que a faixa dinâmica de saída de um regulador a montante seja compatível com a faixa dinâmica de entrada de um alvo a jusante. Entretanto, os sistemas de fatores de transcrição induzíveis por gatilhos externos (ligantes) podem ser manipulados no nível do fator de transcrição, bem como no nível do promotor, já que a concentração do indutor pode ser facilmente ajustada *in vitro* e *in vivo* de acordo com a administração do composto.

Por outro lado, os circuitos genéticos sintéticos foram construídos principalmente juntando partes reguladoras extraídas de caminhos díspares. Por exemplo, a chave de alternância genética original (GARDNER; CANTOR; COLLINS, 2000)

continha os repressores LacI (que regula o metabolismo da lactose) e TetR (que regula a resposta à tetraciclina). Como os sistemas lac e tet evoluíram separadamente, os promotores que respondem a LacI e TetR são sintonizados para transcrever genes a jusante em taxas apropriadas à sua configuração original. Essa incongruência na sintonia pode causar problemas para os biólogos sintéticos, pois a resposta transcripcional de um promotor precisa corresponder ao contexto sintético do circuito. Infelizmente, as estratégias tradicionais de testar as combinações -35 e -10 e as seqüências Shine-Dalgarno de forças variadas para alcançar empiricamente as propriedades desejadas (com relação a, digamos, vazamento e indutibilidade), como apontado acima, podem ser extremamente demoradas e trabalhosas.

Porém, os experimentos das **Figuras 17-20** nos permitiram apreciar o efeito indutivo dos compostos salicilato e ASS sobre o regulador XylS. É possível observar que a molécula de salicilato tem maior poder de indução em relação ao ácido acetilsalicílico. Essa diferença é importante devido ao fato de que mesmo sendo o princípio ativo da aspirina e outros analgésicos comercializados, o ácido acetilsalicílico é rapidamente convertido a salicilato por esterases endógenas, mecanismos de metabolização de primeira passagem no fígado e na parede intestinal e, em menor grau, no estômago, de modo que apenas 68% da dose atinja a circulação sistêmica na forma acetilada (NEEDS; BROOKS, 1985). Além disso, sua meia-vida biológica na circulação sistêmica é muito curta, aproximadamente 15 a 20 minutos em adultos normais. Ao passo que a concentração plasmática do ácido acetilsalicílico diminui, aumenta-se a de salicilato e assim, é importante levar em conta o fato de ambos os compostos induzirem a ativação do regulador do sistema com forças diferentes. Dessa forma, a variabilidade individual de pacientes nos processos de metabolização da aspirina pode causar uma expressão não linear do efetor citolítico, e com isso, pode influenciar de maneira importante o perfil de resposta do sistema no contexto clínico.

Ao investigarmos o efeito da adição de glicose na resposta do sistema, de maneira a silenciar metabolicamente a ativação do fator de transcrição CRP (proteína receptora de AMP cíclico, AMPc), que é ativado pela ligação ao segundo mensageiro AMPc em resposta à falta de glicose e a outros estresses (BELL et al, 1989; LI, 1998; PERRENOUD, 2005), e determinar se o promotor sintético $P_{FNR2.3}$ pudesse estar sendo alvo desse fator, ao invés do fator de transcrição ativado por hipóxia, FNR, percebemos não haver uma mudança no perfil de expressão (painéis esquerdo e

direito das **Figuras 17-20**). No caso excepcional dos resultados das **Figura 19A e 19B**, a inversão do perfil de expressão entre as condições controle e com glicose, pode ser entendida como um efeito compensatório: a respiração aeróbica é a via mais favorável em termos energéticos, produzindo um máximo de ATP quando o O₂ serve comoceptor final de elétrons. Após a privação do oxigênio, o ATP é gerado por vias alternativas, como fermentação ou respiração anaeróbica, que utiliza aceptores finais de elétrons alternativos (por exemplo, fumarato, nitrato, dimetilsulfóxido e trimetilamina) (KILEY; DONOHUE, 2011; BUENO et al., 2012). Dado que o meio mínimo M9-Cas impõe uma limitação de fonte de carbono e a condições anaeróbicas de crescimento restringe o metabolismo energético à fermentação, o desempenho metabólico das cepas acaba influenciando diretamente nos níveis de expressão observados. Com a suplementação com glicose, esse quadro metabólico restritivo é amenizado, com as cepas fermentativas em condições de hipóxia tendo quantidades maiores de substrato para atender as demandas energéticas necessárias ao crescimento e sintetizar os produtos envolvidos na expressão do circuito sintético.

Dessa forma, devido ao comportamento insensível à concentração de oxigênio do promotor *P_{FNR2.3}* optamos por expandir a nossa busca por outros promotores responsivos à hipóxia reconhecidos por FNR e caracterizar a sua resposta controlando diretamente da expressão dos genes repórteres *gfp* e *fbfp* utilizando o mesmo vetor de clonagem pMR1.

Mais recentemente, análises do genoma de *E. coli* definiram o escopo da rede de transcrição FNR direta que engloba > 63 genes (CONSTANTINIDOU et al., 2006; GRAINGER et al., 2007; MYERS et al., 2013). Por exemplo, o FNR ativa genes envolvidos na oxidação anaeróbica de fontes de carbono e na redução de aceptores finais de elétrons alternativos e reprime alguns genes usados especificamente na respiração aeróbica. O regulon central de FNR parece ser conservado em muitos anaeróbios facultativos (KÖRNER; SOFIA; ZUMFT, 2003; MATSUI; TOMITA; KANAI, 2013).

A capacidade do FNR de regular globalmente a expressão gênica depende da presença de seu cofator com centro [4Fe-4S]²⁺. A integridade desse centro está intrinsecamente ligada à função FNR, pois promove uma conformação proteica necessária para a dimerização do FNR, ligação ao DNA específico do local e regulação da

transcrição (GREEN et al., 1996;). No entanto, na presença de oxigênio, o cluster $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ é rapidamente convertido em um cluster $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ por oxidação à base de enxofre, resultando na inativação do FNR por perda de dimerização (CRACK; THOMSON; LE BRUN, 2017). Nas células aeróbicas, o cluster $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ é ainda mais degradado, gerando a apo-FNR sem cluster. Devido à sensibilidade do cluster $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ em relação ao oxigênio, a regulação transcricional dependente de FNR ocorre principalmente durante o crescimento anaeróbico, apesar dos níveis semelhantes de proteína FNR nas células aeróbicas e anaeróbicas (SUTTON et al., 2004). Além disso, a ligação do cluster não regula diretamente a atividade de ligação ao DNA, mas induz a dimerização da subunidade necessária para o reconhecimento do mesmo.

Para a família de fatores de transcrição CRP/FNR, contatos diretos com a RNA polimerase (RNAP) são necessários para a ativação da transcrição. Pesquisadores estabeleceram que, como o CRP, o FNR contém três regiões ativadoras individuais (*activating regions* - ARs) que mediam contatos com a RNAP. Isso inclui AR1, AR2 e AR3, previstos para reconhecer a região C-terminal (α -CTD), o domínio N-terminal e $\sigma 70$, respectivamente (LEE, D. J.; MINCHIN, S. D.; BUSBY, 2012). Além disso, a influência de cada AR na ativação da transcrição parece depender da arquitetura do promotor (posição do sítio de ligação dentro da sequência promotora). Nos promotores de classe I nos quais o local de reconhecimento de FNR está centralizado em -61,5 pb ou mais a montante do local de início de transcrição +1 (TSS), são necessárias interações AR1- α -CTD para a ativação da transcrição (LEE et al., 2000; WEBER; VINCENT; KILEY, 2005). No entanto, o modo de reconhecimento da RNAP difere para os promotores de classe II, que constituem os promotores dependentes de FNR de ocorrência mais frequente e contêm o local alvo de FNR, a -41,5 pb a montante do TSS. Nos promotores da classe II, todos os três ARs têm o potencial de fazer contatos com a RNAP, com AR1 e AR3 tendo papéis predominantes e AR2 fazendo apenas uma contribuição menor (LAMBERG; KILEY, 2000; BLAKE et al., 2002). A estrutura do FT demonstra que o AR3 forma uma alça exposta à superfície, pronta para fazer interações com o $\sigma 70$.

Selecionamos promotores que incluem tanto a classe II (pepT, HIP-opt) quanto uma terceira classe de ativação (fdhF, fdhF-mut), na qual a sequência promotora

localiza-se entre as regiões -10 e -35 (BROWNING; BUSBY, 2016) para cobrir um amplo espectro mecanismos moleculares de ativação pelo fator de transcrição FNR.

Ao caracterizarmos o segundo grupo de promotores candidatos a indução por hipóxia, repetimos o experimento de indução usando uma segunda câmara de hipóxia doméstica, seguindo os mesmos padrões da primeira, conforme esquema do ANEXO 4. Para garantir a funcionalidade do sistema, incluímos três promotores constitutivos previamente caracterizados (http://parts.igem.org/Part:BBa_J23104) e simplificamos o sistema posicionando os promotores diretamente à montante dos genes repórteres.

Surpreendentemente, nessa rodada de experimentos, o sistema repórter utilizando a proteína fluorescente independente de oxigênio, FbFP, não foi capaz de manter os níveis de fluorescência nas condições de hipóxia, apresentando queda semelhante à proteína GFP, mesmo sob controle dos promotores constitutivos (pJ100 e pJ106) (**Figuras 24 a 27**).

Como discutido anteriormente, a proteína FbFP constitui o fundamento da medição de atividade dos nossos circuitos sintéticos induzidos por hipóxia. O resultado obtido na **Figura 26** impossibilita assegurar a determinação da atividade, ou falta dela, dos novos promotores sintéticos testados, dado que sem a presença de um instrumento de medição capaz de reportar o comportamento do elemento genético sob investigação em ambas as condições controle (+O₂) e teste (-O₂), não podemos atribuir qualquer correlação à mudança no perfil de expressão observado.

Conforme os resultados anteriores (**Figuras 17 a 20**), temos forte evidência do comportamento ideal do nosso repórter (FbFP) testado nas condições dentro do laboratório de Biologia Sintética e de Sistemas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Dessa forma, no momento da elaboração desse trabalho, estamos revalidando as construções obtidas durante o estágio no exterior para assegurar o real desempenho das sequências promotoras sob investigação.

É importante mencionar que a clonagem e os ensaios de caracterização do segundo grupo de promotores induzíveis foram realizados durante o estágio em pesquisa no exterior (BEPE), no laboratório de Biologia Sintética e Controle Celular da Universidade de Toronto, no campus de Mississauga, Canadá. Salientamos esse fato para trazer à luz da discussão o impacto que a mudança de ambiente experimental

pode trazer, com relação à utilização de equipamentos, materiais e fornecedores diferentes e a influência desses fatores nos resultados obtidos.

6 CONCLUSÃO

Dos cinco promotores selecionados baseados na sua potencial capacidade de responder à baixa na concentração ambiente de oxigênio, avaliamos um dentro do circuito genético construído e transformado em *E. coli* DH10B e *Salmonella* spp. Typhimurium, e avaliamos a seu comportamento de acordo com a porta lógica projetada conforme a arquitetura das partes genéticas escolhidas, conforme esquema da **Figura 3**. Em suma, as conclusões que podem ser extraídas deste trabalho são:

- i. É possível caracterizar um sistema responsivo às concentrações de oxigênio utilizando uma abordagem simples baseada em sensores bioquímicos sensíveis a essas condições e uma aparelhagem de incubação de baixo custo que alcança níveis eficientes de hipóxia;
- ii. A construção de um circuito governado por elementos genéticos descritos em literatura requer a validação das partes que o compõe. Elementos caracterizados em um sistema, observados dentro de um contexto genético próprio, podem não apresentar o mesmo comportamento quando transplantados para um sistema heterólogo ou para um circuito que não carrega os mesmos componentes genéticos do seu contexto nativo. No caso de promotores sintéticos, a capacidade de ativação pode não corresponder aos níveis reportados no sistema de origem em que eles foram identificados, podendo até não apresentar atividade.

7 REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, N. et al. Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101(42), 15172-15177, 2004.
- ALPER, H. et al. Tuning genetic control through promoter engineering. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 102(36), 12678-12683, 2005.
- AMORES, G. R.; GUAZZARONI, M. E.; SILVA-ROCHA, R. Engineering synthetic cis-regulatory elements for simultaneous recognition of three transcriptional factors in bacteria. **ACS Synthetic Biology**, v. 4, n. 12, p. 1287-1294, 2015.
- ANDERSEN, J. B. et al. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 64(6), 2240-2246, 1998.
- ANDERSON, J. C.; VOIGT, C. A.; ARKIN, A. P. Environmental signal integration by a modular AND gate. **Molecular Systems Biology**, 3(1), 2007.
- ANDRIANANTOANDRO, E. et al. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. **Molecular Systems Biology**, 2(1), 2006-0028, 2006.
- ARENA, E. T. et al. The infectious hypoxia: occurrence and causes during Shigella infection. **Microbes and infection**, 19(3), 157-165, 2017.
- ASPIRIN. Drugs.com. **American Society of Health-System Pharmacists**. 6 jun. 2016. Disponível em <<https://www.drugs.com/monograph/aspirin.html>>. Acessado em: 21 nov. 2019.
- ATKINSON, M. R. et al. Development of genetic circuitry exhibiting toggle switch or oscillatory behavior in Escherichia coli. **Cell**, 113(5), 597-607, 2003.
- AVOGADRI, F.; et al. Cancer immunotherapy based on killing of Salmonella-infected tumor cells. **Cancer research**, 65(9), 3920-3927, 2005.
- AWAN, A. R.; SHAW, W. M.; ELLIS, T. Biosynthesis of therapeutic natural products using synthetic biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 105, p. 96-106, 2016.
- BASHOR, C. J.; COLLINS, J. J. Understanding biological regulation through synthetic biology. **Annual Review of Biophysics**, 47, 399-423, 2018.
- BASU, S. et al. A synthetic multicellular system for programmed pattern formation. **Nature**, 434(7037), 1130, 2005.
- BELL, A. I.; COLE, J. A.; BUSBY, S. J. W. Molecular genetic analysis of an FNR-dependent anaerobically inducible Escherichia coli promoter. **Molecular Microbiology**, 4(10), 1753-1763, 1990.

BELL, A. I. et al. Cloning of binding sequences for the Escherichia coli transcription activators, FNR and CRP: location of bases involved in discrimination between FNR and CRP. **Nucleic Acids Research**, 17(10), 3865-3874, 1989.

BERNDT, A.; DEISSEROTH, K. Expanding the optogenetics toolkit. **Science**, v. 349, n. 6248, p. 590-591, 2015.

BERMUDES, D.; ZHENG, L. M.; KING, I. C. Live bacteria as anticancer agents and tumor-selective protein delivery vectors. **Current Opinion in Drug Discovery Development**, 5(2), 194-199, 2002.

BERMUDES, D. G. David Gordon Bermudes. **Modified bacteria having improved pharmacokinetics and tumor colonization enhancing antitumor activity**. U.S. Patent Application n. 15/482,170, 14 maio 2019.

BETTEGOWDA, C. et al. The genome and transcriptomes of the anti-tumor agent Clostridium novyi-NT. **Nature Biotechnology**, 24(12), 1573, 2006.

BIKARD, D.; et al. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. **Nucleic Acids Research**, 41(15), 7429-7437, 2013.

BIRKMANN, A; ZINONI, F.; SAWERS, G.; BÖCK, A. Factors affecting transcriptional regulation of the formate-hydrogen-lyase pathway of Escherichia coli. **Archives of Microbiology**, 148(1), 44-51, 1987.

BLAKE, T. et al. Transcription activation by FNR: evidence for a functional activating region 2. **Journal of Bacteriology**, 184(21), 5855-5861, 2002.

BLAZECK, J.; ALPER, H. S. Promoter engineering: recent advances in controlling transcription at the most fundamental level. **Biotechnology Journal**, 8(1), 46-58, 2013.

BLOUNT, B. A. et al. Rational diversification of a promoter providing fine-tuned expression and orthogonal regulation for synthetic biology. **Plos One**, 7(3), e33279, 2012.

BORKOWSKI, O. et al. Overloaded and stressed: whole-cell considerations for bacterial synthetic biology. **Current Opinion in Microbiology**, 33, 123-130, 2016.

BRAAT, H. et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, 4(6), 754-759, 2006.

BRADLEY, R. W.; BUCK, M.; WANG, B. Recognizing and engineering digital-like logic gates and switches in gene regulatory networks. **Current Opinion in Microbiology**, 33, 74-82, 2016.

BRAYFIELD, A. **Martindale: The Complete Drug Reference**. 38 ed. United Kingdom (London). Pharmaceutical Press, 2014.

BROPHY, J. A.; VOIGT, C. A. Principles of genetic circuit design. **Nature Methods**, 11(5), 508, 2014.

BROWNING, D. F.; BUSBY, S. J. The regulation of bacterial transcription initiation. **Nature Reviews Microbiology**, 2(1), 57, 2004.

BROWNING, D. F.; BUSBY, S. J. Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, 14(10), 638, 2016.

BUENO, E. et al. Bacterial adaptation of respiration from oxic to microoxic and anoxic conditions: redox control. **Antioxidants & Redox Signaling**, 16: 819–852, 2012.

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

CAMERON, D. E.; BASHOR, C. J.; COLLINS, J. J. A brief history of synthetic biology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 381-390, 2014.

CANTON, B. B. J. **Engineering the interface between cellular chassis and synthetic biological systems**. Tese (Doutorado Biological Engineering), Massachusetts Institute of Technology, EUA, 2008.

CASALI, N. Escherichia coli host strains. In CASALI, N; PRESTON, A. **E. coli Plasmid Vectors: Methods and Applications**. Humana Press, 2003. cap 3, p. 27-48. Methods in Molecular Biology, 235.

CASINI, A. et al. Bricks and blueprints: methods and standards for DNA assembly. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 9, p. 568-576, 2015.

CHABNER, B. A.; ROBERTS Jr, T. G. Chemotherapy and the war on cancer. **Nature Reviews Cancer**, 5(1), 65, 2005.

CHAKRABARTY, A. M.; FIALHO, A. M. (Ed.). **Microbial Infections and Cancer Therapy: Recent Advances**. CRC Press, 2019.

CHAKRABARTY, A. M. Microorganisms and cancer: quest for a therapy. **Journal of Bacteriology**, 185(9), 2683-2686, 2003.

CHANG, L. M. The distributive nature of enzymatic DNA synthesis. **Journal of Molecular Biology**, v. 93, n. 2, p. 219-235, 1975.

CHEONG, I. et al. A bacterial protein enhances the release and efficacy of liposomal cancer drugs. **Science**, 314(5803), 1308-1311, 2006.

CHOWDHURY, S. et al. Programmable bacteria induce durable tumor regression and systemic antitumor immunity. **Nature Medicine**, 25(7), 1057-1063, 2019.

CLAIRMONT, C.; et al. Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of Salmonella typhimurium. **Journal of Infectious Diseases**, 181(6), 1996-2002, 2000.

COLEY, W. B. Contribution to the knowledge of sarcoma. **Annals of Surgery**, 14(3), 199, 1891.

COLEY, W. B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. 1. **The American Journal of the Medical Sciences** (1827-1924), 105(6), 487, 1893.

CONSTANTINIDOU, C. et al. A reassessment of the FNR regulon and transcriptomic analysis of the effects of nitrate, nitrite, NarXL, and NarQP as Escherichia coli K12 adapts from aerobic to anaerobic growth. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 8, p. 4802-4815, 2006.

COULIE, P. G. et al. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, 14(2), 135, 2014.

COX, R. S.; SURETTE, M. G.; ELOWITZ, M. B. Programming gene expression with combinatorial promoters. **Molecular Systems Biology**, 3(1), 2007.

CRACK, J. et al. Influence of the Environment on the [4Fe-4S]₂₁ to [2Fe-2S]₂₁ Cluster Switch in the Transcriptional Regulator FNR. **Journal of the American Chemical Society**, 130, 1749–1758, 2008.

CRACK, J. C.; THOMSON, A. J.; LE BRUN, N. E. Mass spectrometric identification of intermediates in the O₂-driven [4Fe-4S] to [2Fe-2S] cluster conversion in FNR. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 114(16), E3215-E3223, 2017.

DANCHIN, A.; SEKOWSKA, A. Constraints in the design of the synthetic bacterial chassis. In: **Microbial Synthetic Biology**. Academic Press, 2013. Vol. 40, cap. 2, p. 39-67. Methods in Microbiology.

DANHIER, F.; FERON, O.; PRÉAT, V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. **Journal of Controlled Release**, 148(2), 135-146, 2010.

DARLINGTON, A. P. et al. Dynamic allocation of orthogonal ribosomes facilitates uncoupling of co-expressed genes. **Nature Communications**, 9(1), 695, 2018.

DAVIS, J. H.; RUBIN, A. J.; SAUER, R. T. Design, construction and characterization of a set of insulated bacterial promoters. **Nucleic Acids Research**, 39(3), 1131-1141, (2011).

DAVISON, C. Salicylate metabolism in man. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 179(1), 249-268, 1971.

DELAYE, L.; MOYA, A. Evolution of reduced prokaryotic genomes and the minimal cell concept: variations on a theme. **Bioessays**, v. 32, n. 4, p. 281-287, 2010.

DEYNEKO, I. V.; et al. Composing a tumor specific bacterial promoter. **Plos One**, 11(5), e0155338, 2016.

DIAZ Jr, L. A. et al. Pharmacologic and toxicologic evaluation of C. novyi-NT spores. **Toxicological Sciences**, 88(2), 562-575, 2005.

DiCARLO, J. E. et al. Genome engineering in Saccharomyces cerevisiae using CRISPR-Cas systems. **Nucleic Acids Research**, 41(7), 4336-4343, 2013.

DIN, M. O. et al. Synchronized cycles of bacterial lysis for in vivo delivery. **Nature**, 536(7614), 81, 2016.

DREPPER, T. et al. Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen. **Nature Biotechnology**, 25(4), 443, 2007.

ELOWITZ, M. B.; LEIBLER, S. A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. **Nature**, 403(6767), 335, 2000.

ELTZSCHIG, H. K.; CARMELIET, P. Hypoxia and inflammation. **New England Journal of Medicine**, 364(7), 656-665, 2011.

ENDY, D. Foundations for engineering biology. **Nature**, 438(7067), 449, 2005.

ENGLAENDER, J. A. et al. Effect of genomic integration location on heterologous protein expression and metabolic engineering in *E. coli*. **ACS Synthetic Biology**, v. 6, n. 4, p. 710-720, 2017.

FISCHBACH, M.; VOIGT, C. A. Prokaryotic gene clusters: a rich toolbox for synthetic biology. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 12, p. 1277-1296, 2010.

FLUEGEN, G. et al. Phenotypic heterogeneity of disseminated tumour cells is preset by primary tumour hypoxic microenvironments. **Nature Cell Biology**. 19, 120–132, 2017.

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

FOX, M. et al. Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy: in vitro activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered clostridia. **Gene Therapy**, 3(2), 173-178, 1996.

FRANKEL, A. D.; KIM, P. S. Modular structure of transcription factors: implications for gene regulation. **Cell**, v. 65, n. 5, p. 717-719, 1991.

FRIEDLAND, A. E. et al. Synthetic gene networks that count. **Science**, 324(5931), 1199-1202, 2009.

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

GARDNER, T. S.; CANTOR, C. R.; COLLINS, J. J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. **Nature**, 403(6767), 339, 2000.

GILBERT, L. A. et al. CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. **Cell**, 154(2), 442-451, 2013.

GILBERT, L. A. et al. Genome-scale CRISPR-mediated control of gene repression and activation. **Cell**, Oct 23;159(3):647-61, 2014.

GLASS, L. Classification of biological networks by their qualitative dynamics. **Journal of Theoretical Biology**, 54(1), 85-107, 1975.

GRAINGER, D. C. et al. Transcription factor distribution in *Escherichia coli*: studies with FNR protein. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 1, p. 269-278, 2007.

GREEN, J. et al. Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch in vitro. **Biochemical Journal**, 316(3), 887-892, 1996.

HAM, T. S. et al. Design and construction of a double inversion recombination switch for heritable sequential genetic memory. **PLoS One**, 3(7), e2815, 2008.

HAMMER, K.; MIJAKOVIC, I.; JENSEN, P. R. Synthetic promoter libraries—tuning of gene expression. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 53-55, 2006.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144(5), 646-674, 2011.

HARRISON, D. E. F.; LOVELESS, J. E. Transient responses of facultatively anaerobic bacteria growing in chemostat culture to a change from anaerobic to aerobic conditions. **Microbiology**, 68(1), 45-52, 1971.

HASTY, J. et al. Computational studies of gene regulatory networks: in numero molecular biology. **Nature Reviews Genetics**, 2(4), 268, 2001.

HOFFMAN, R. M. Tumor-seeking Salmonella amino acid auxotrophs. **Current Opinion in Biotechnology**, 22(6), 917-923, 2011.

HONG, H. et al. Targeted deletion of the ara operon of Salmonella typhimurium enhances L-arabinose accumulation and drives P_{BAD}-promoted expression of anti-cancer toxins and imaging agents. **Cell Cycle**, 13(19), 3112-3120, 2014.

HUGHES, R. A.; ELLINGTON, A. D. Synthetic DNA synthesis and assembly: putting the synthetic in synthetic biology. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 1, p. a023812, 2017.

HUNT S., GREEN J., ARTYMIUK P.J. Hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA) and Related Toxins. In: ANDERLUH G., LAKEY J. (eds) **Proteins Membrane Binding and Pore Formation**. Springer, 2010. New York, NY. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 677.

IMAI, K.; TAKAOKA, A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. **Nature Reviews Cancer**, 6(9), 714, 2006.

ISHIZUKA, H. et al. Mechanism of the downregulation of cAMP receptor protein by glucose in Escherichia coli: role of autoregulation of the crp gene. **The EMBO Journal**, 13(13), 3077-3082, 1994.

IYER, S. et al. Multi-input regulation and logic with T7 promoters in cells and cell-free systems. **PLoS One**, 8(10), e78442, 2013.

JAIN, R. K. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. **Journal of Clinical Oncology**, 31(17), 2205, 2013.

JIANG, W. et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. **Nature Biotechnology**, 31(3), 233, 2013.

JINEK, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, 337(6096), 816-821, 2012.

JONES, A. **Chemistry: An Introduction for Medical and Health Sciences**. John Wiley & Sons, 2015. pp. 5–6. ISBN 978-0-470-09290-3.

JONES, S. et al. Personalized genomic analyses for cancer mutation discovery and interpretation. **Science Translational Medicine**, 7(283), 283ra53-283ra53, 2015.

JOYCE, J. A.; FEARON, D. T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. **Science**, 348(6230), 74-80, 2015.

JULLESSON, D. et al. Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals. **Biotechnology Advances**, 33: 1395–1402, 2015.

KANIGA, K.; BOSSIO, J. C.; GALÁN, J. E. The *Salmonella typhimurium* invasion genes *invF* and *invG* encode homologues of the AraC and PulD family of proteins. **Molecular Microbiology**, 13(4), 555-568, 1994.

KARBERG, K. A.; OLSEN, G. J.; DAVIS, J. J. Similarity of genes horizontally acquired by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* is evidence of a supraspecies pangenome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 108(50), 20154-20159, 2011.

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

KAUFFMAN, S. The large-scale structure and dynamics of gene control circuits: an ensemble approach. **Journal of Theoretical Biology**, 44(1), 167-190, 1974.

KHALIL, A. S.; COLLINS, J. J. Synthetic biology: applications come of age. **Nature Reviews Genetics**, 11(5), 367, 2010.

KILEY P. J.; DONOHUE T. Global Responses of Bacteria to O₂ Deprivation. In: STORZ G.; HENGGE R. (eds). **Bacterial Stress Responses**. ASM Press, 2011, pp. 175–189. Washington, DC.

KNOTT, G. J.; DOUDNA, J. A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. **Science**, 361(6405), 866-869, 2018.

KÖRNER, H.; SOFIA, H. J.; ZUMFT, W. G. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 5, p. 559-592, 2003.

KOSURI, S. et al. Composability of regulatory sequences controlling transcription and translation in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 110(34), 14024-14029, 2013.

KOUTINAS, M. et al. The regulatory logic of m-xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* mt-2 exposed by dynamic modelling of the principal node Ps/Pr of the TOL plasmid. **Environmental Microbiology**, 12(6), 1705-1718, 2010.

KUNKEL, T. A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 82(2), 488-492, 1985.

KWOK, R. Five hard truths for synthetic biology: can engineering approaches tame the complexity of living systems? Roberta Kwok explores five challenges for the field and how they might be resolved. **Nature**, 463(7279), 288-291, 2010.

LAGENAUER, L. A. et al. Prevention of vaginal SHIV transmission in macaques by a live recombinant *Lactobacillus*. **Mucosal Immunology**, 4(6), 648, 2011.

LAMBERG, K. E.; KILEY, P. J. FNR-dependent activation of the class II *dmsA* and *narG* promoters of *Escherichia coli* requires FNR-activating regions 1 and 3. **Molecular Microbiology**, 38(4), 817-827, 2000.

LAMBIN, P. et al. Colonisation of *Clostridium* in the body is restricted to hypoxic and necrotic areas of tumours. **Anaerobe**, 4(4), 183-188, 1998.

LANZER, M.; BUJARD, H. Promoters largely determine the efficiency of repressor action. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 85(23), 8973-8977, 1988.

LASSMANN, H. Hypoxia-like tissue injury as a component of multiple sclerosis lesions. **Journal of the Neurological Sciences**, 206(2), 187-191, 2003.

LE, D. T. et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. **Science**, 357(6349), 409-413, 2017.

LEE, C. H. et al. T cell augments the antitumor activity of tumor-targeting *Salmonella*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 90(4), 1381-1388, 2011.

LEE, C. H.; WU, C. L.; SHIAU, A. L. Toll-like receptor 4 mediates an antitumor host response induced by *Salmonella choleraesuis*. **Clinical Cancer Research**, 14(6), 1905-1912, 2008.

LEE, D. J. et al. Analysis of interactions between Activating Region 1 of *Escherichia coli* FNR protein and the C-terminal domain of the RNA polymerase α subunit: use of alanine scanning and suppression genetics. **Molecular Microbiology**, 37(5), 1032-1040, 2000.

LEE, D. J.; MINCHIN, S. D.; BUSBY, S. J. Activating transcription in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, 66, 125-152, 2012.

LESCHNER, S. et al. Tumor invasion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is accompanied by strong hemorrhage promoted by TNF- α . **Plos One**, 4(8), e6692, 2009.

LI, B. et al. Transcription activation by *Escherichia coli* FNR protein: similarities to, and differences from, the CRP paradigm. **Nucleic Acids Research**, 26(9), 2075-2081, 1998.

LIU, Q. et al. Orthogonality and burdens of heterologous AND gate gene circuits in *E. coli*. **ACS Synthetic Biology**, 7(2), 553-564, 2018.

LOESSNER, H. et al. Remote control of tumour-targeted *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by the use of L-arabinose as inducer of bacterial gene expression in vivo. **Cellular Microbiology**, 9(6), 1529-1537, 2007.

LYNCH, T. J. et al. Epidermal growth factor receptor inhibitor–associated cutaneous toxicities: an evolving paradigm in clinical management. **The Oncologist**, 12(5), 610-621, 2007.

MALI, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science**, 339(6121), 823-826, 2013.

MARCHISIO, M. A.; STELLING, J. Computational design of synthetic gene circuits with composable parts. **Bioinformatics**, 24(17), 1903-1910, 2008.

MATSUI, M.; TOMITA, M.; KANAI, A. Comprehensive computational analysis of bacterial CRP/FNR superfamily and its target motifs reveals stepwise evolution of transcriptional networks. **Genome Biology and Evolution**, 5(2), 267-282, 2013.

McADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. Circuit simulation of genetic networks. **Science**, 269(5224), 650-656, 1995.

McADAMS, H. H.; SRINIVASAN, B.; ARKIN, A. P. The evolution of genetic regulatory systems in bacteria. **Nature Reviews Genetics**, 5(3), 169, 2004.

McGREGOR, D. P. Discovering and improving novel peptide therapeutics. **Current Opinion in Pharmacology**, 8(5), 616-619, 2008.

McKEOWN, S. R. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response. **The British Journal of Radiology**, 87(1035), 20130676, 2014.

MENGESHA, A. et al. Development of a Flexible and Potent Hypoxia-Inducible Promoter for Tumor-Targeted Gene Expression in Attenuated *Salmonella*. **Cancer Biology Therapy**, 5, 1120–1128, 2006.

MIDDLEBROOK, J. L.; DORLAND, R. B. Bacterial toxins: cellular mechanisms of action. **Microbiological Reviews**, 48(3), 199, 1984.

MIN, J. J. et al. Noninvasive real-time imaging of tumors and metastases using tumor-targeting light-emitting *Escherichia coli*. **Molecular Imaging and Biology**, 10(1), 54-61, 2008.

MINTON, N. P. Clostridia in cancer therapy. **Nature Reviews Microbiology**, 1(3), 237, 2003.

MOHAN, C. et al. Assessment of cell engineering strategies for improved therapeutic protein production in CHO cells. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, v. 3, n. 5, p. 624-630, 2008.

MOJICA, F. J. et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. **Microbiology**, 155(3), 733-740, 2009.

MONOD, J.; JACOB, F. General conclusions: teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. In: **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**. Janeiro, 1961. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Vol. 26, pp. 389-401.

MONTEIRO, L. M. O.; ARRUDA, L. M.; SILVA-ROCHA, R. Emergent properties in complex synthetic bacterial promoters. **ACS Synthetic Biology**, v. 7, n. 2, p. 602-612, 2018.

MONTEIRO, L. M. O. et al. Reverse engineering of an aspirin-responsive transcriptional regulator in *Escherichia coli*. **ACS Synthetic Biology**, 8(8), 1890-1900, 2019.

MOORE, R.; CHANDRAHAS, A.; BLERIS, L. Transcription activator-like effectors: a toolkit for synthetic biology. **ACS Synthetic Biology**, v. 3, n. 10, p. 708-716, 2014.

MOTTA, J. P. et al. Food-grade bacteria expressing elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis. **Science Translational Medicine**, 4(158), 158ra144-158ra144, 2012.

MOWDAY, A. et al. Advancing clostridia to clinical trial: past lessons and recent progress. **Cancers**, 8(7), 63, 2016.

MYERS, K. S. et al. Genome-scale analysis of *Escherichia coli* FNR reveals complex features of transcription factor binding. **Plos Genetics**, v. 9, n. 6, 2013.

MUTALIK, V. K. et al. Precise and reliable gene expression via standard transcription and translation initiation elements. **Nature Methods**, 10(4), 354, 2013.

NANDAGOPAL, N.; ELOWITZ, M. B. Synthetic biology: integrated gene circuits. **Science**, 333(6047), 1244-1248, 2011.

NAUTS, H. C.; SWIFT, W. E.; COLEY, B. L. The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, MD, reviewed in the light of modern research. **Cancer Research**, 6(4), 205-216, 1946.

NEEDS, C. J.; BROOKS, P. M. Clinical pharmacokinetics of the salicylates. **Clinical Pharmacokinetics**, 10(2), 164-177, 1985.

NGUYEN, V. H. et al. Genetically engineered *Salmonella typhimurium* as an imageable therapeutic probe for cancer. **Cancer Research**, 70(1), 18-23, 2010.

NIELSEN, A. A. et al. Genetic circuit design automation. **Science**, 352(6281), aac7341, 2016.

NIELSEN, A. A.; VOIGT, C. A. Multi-input CRISPR/Cas genetic circuits that interface host regulatory networks. **Molecular Systems Biology**, 10(11), 2014.

NIKEL, P. I.; MARTÍNEZ-GARCÍA, E.; DE LORENZO, V. Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 368-379, 2014.

PAWELEK, J. M.; LOW, K. B.; BERMUDEZ, D. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. **Cancer Research**, 57(20), 4537-4544, 1997.

PEI, L.; SCHMIDT, M. Synthetic Biology: From Genetic Engineering 2.0 to Responsible Research and Innovation. In: SMOLKE, C. **Synthetic Biology: Parts, Devices and Applications**. John Wiley & Sons, 2018. cap 18.

PEREZ-PINERA, P. et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9–based transcription factors. **Nature Methods**, 10(10), 973, 2013.

PERRENOUD, A.; SAUER, U. Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, 187(9), 3171-3179, 2005.

POSTOW, M. A.; CALLAHAN, M. K.; WOLCHOK, J. D. Immune checkpoint blockade in cancer therapy. **Journal of Clinical Oncology**, 33(17), 1974, 2015.

PURNICK, P. E.; WEISS, R. The second wave of synthetic biology: from modules to systems. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 10(6), 410, 2009.

Qi, L. S. et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. **Cell**, 152(5), 1173-1183, 2013.

RIBAS, A. et al. Oncolytic virotherapy promotes intratumoral T cell infiltration and improves anti-PD-1 immunotherapy. **Cell**, 170(6), 1109-1119, 2017.

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

RIZVI, N. A. et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non–small cell lung cancer. **Science**, 348(6230), 124-128, 2015.

ROBERTS, N. J. et al. Intratumoral injection of Clostridium novyi-NT spores induces antitumor responses. **Science Translational Medicine**, 6(249), 249ra111-249ra111, 2014.

RODRIGO, G.; CARRERA, J.; JARAMILLO, A. Computational design of synthetic regulatory networks from a genetic library to characterize the designability of dynamical behaviors. **Nucleic Acids Research**, 39(20), e138-e138, 2011.

ROYO, J. L. et al. In vivo gene regulation in Salmonella spp. by a salicylate-dependent control circuit. **Nature Methods**, 4(11), 937, 2007.

RUSSMANN, H. et al. Delivery of epitopes by the Salmonella type III secretion system for vaccine development. **Science**, 281, 565-568, 1998.

RYAN, R. M. et al. Bacterial delivery of a novel cytotoxin to hypoxic areas of solid tumors. **Gene Therapy**, 16(3), 329, 2009.

SABI, R.; TULLER, T. Modelling and measuring intracellular competition for finite resources during gene expression. **Journal of the Royal Society Interface**, 16(154), 20180887, 2019.

SALTZMAN, D. A. et al. Attenuated Salmonella typhimurium containing interleukin-2 decreases MC-38 hepatic metastases: a novel anti-tumor agent. **Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals**, 11(2), 145-153, 1996.

SALIS, H. M.; MIRSKY, E. A.; VOIGT, C. A. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. *Nature biotechnology*, 27(10), 946, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual** (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SEDIGHI, M. et al. Therapeutic bacteria to combat cancer; current advances, challenges, and opportunities. **Cancer Medicine**, 2019.

SHAH, S. A. et al. Protospacer recognition motifs: mixed identities and functional diversity. **RNA Biology**, 10(5), 891-899, 2013.

SHIS, D. L. et al. Modular, multi-input transcriptional logic gating with orthogonal LacI/GalR family chimeras. **ACS Synthetic Biology**, 3(9), 645-651, 2014.

SILVA-ROCHA, R. et al. The logic layout of the TOL network of *Pseudomonas putida* pWW0 plasmid stems from a metabolic amplifier motif (MAM) that optimizes biodegradation of m-xylene. **BMC Systems Biology**, 5(1), 191, 2011.

SILVA-ROCHA, R.; PÉREZ-PANTOJA, D.; DE LORENZO, V. Decoding the genetic networks of environmental bacteria: regulatory moonlighting of the TOL system of *Pseudomonas putida* mt-2. **The ISME Journal**, 7(2), 229, 2013.

SOHKA, T. An externally tunable bacterial band-pass filter. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 106(25), 10135-10140, 2009.

SPIRO, S.; GUEST, J. R. FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Reviews**, 6(4), 399-428, 1990.

SPIRO, S. et al. Interconversion of the DNA-binding specificities of two related transcription regulators, CRP and FNR. **Molecular Microbiology**, 4(11), 1831-1838, 1990.

STAEDTKE, V. et al. *Clostridium novyi*-NT can cause regression of orthotopically implanted glioblastomas in rats. **Oncotarget**, 6(8), 5536, 2015.

STEIDLER, L. et al. Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. **Infection and Immunity**, 66(7), 3183-3189, 1998.

STEIDLER, L. et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. **Science**, 289(5483), 1352-1355, 2000.

SUTTON, V. R. et al. Kinetic analysis of the oxidative conversion of the [4Fe-4S] 2+ cluster of FNR to a [2Fe-2S] 2+ cluster. **Journal of Bacteriology**, 186(23), 8018-8025, 2004.

SWOFFORD, C. A.; VAN DESSEL, N.; FORBES, N. S. Quorum-sensing *Salmonella* selectively trigger protein expression within tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 112(11), 3457-3462, 2015.

TABOR, J. J. et al. A synthetic genetic edge detection program. **Cell**, 137(7), 1272-1281, 2009.

TAKIISHI, T. et al. Reversal of diabetes in NOD mice by clinical-grade proinsulin and IL-10-secreting *Lactococcus lactis* in combination with low-dose anti-CD3 depends on the induction of foxp3-positive T cells. **Diabetes**, 66(2), 448-459, 2017.

THE TOP 300 OF 2019. clincalc.com. **ClinCalc DrugStats Database**. Disponível em < <https://clincalc.com/DrugStats/Top300Drugs.aspx>>. Acessado em: 21 nov. 2019.

TOPALIAN, S. L.; DRAKE, C. G.; PARDOLL, D. M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. **Cancer Cell**, 27(4), 450-461, 2015.

TUMEH, P. C. et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. **Nature**, 515(7528), 568, 2014.

UNDEN, G. et al. O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. **Archives of Microbiology**, 164(2), 81-90, 1995.

WALKER, B. J.; STAN, G. B. V.; POLIZZI, K. M. Intracellular delivery of biologic therapeutics by bacterial secretion systems. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, 19, 2017.

WANG, B.; BUCK, M. Customizing cell signaling using engineered genetic logic circuits. **Trends in Microbiology**, 20(8), 376-384, 2012.

WANG, B. et al. Engineering modular and orthogonal genetic logic gates for robust digital-like synthetic biology. **Nature Communications**, 2, 508, 2011.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. Cyclooxygenase-3 (COX-3): filling in the gaps toward a COX continuum?. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 99(21), 13371-13373, 2002.

WEBER, K. D.; VINCENT, O. D.; KILEY, P. J. Additional determinants within *Escherichia coli* FNR activating region 1 and RNA polymerase α subunit required for transcription activation. *Journal of bacteriology*, 187(5), 1724-1731, 2005.

WEI, M. Q. et al. Facultative or obligate anaerobic bacteria have the potential for multimodality therapy of solid tumours. **European Journal of Cancer**, 43(3), 490-496, 2007.

WEISS, R. et al. Genetic circuit building blocks for cellular computation, communications, and signal processing. **Natural Computing**, 2(1), 47-84, 2003.

WESTPHAL, K. et al. Containment of tumor-colonizing bacteria by host neutrophils. **Cancer Research**, 68(8), 2952-2960, 2008.

WIDAKOWICH, C. et al. Side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers. **The Oncologist**, 12(12), 1443-1455, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **World Health Organization model list of essential medicines: 21st list 2019**. World Health Organization, 2019.

XIE, Z. et al. Multi-input RNAi-based logic circuit for identification of specific cancer cells. **Science**, 333(6047), 1307-1311, 2011.

YARCHOAN, M.; HOPKINS, A.; JAFFEE, E. M. Tumor mutational burden and response rate to PD-1 inhibition. **The New England Journal of Medicine**, 377(25), 2500, 2017.

YONG, A. Y. et al. Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. **Nature Biotechnology**, 22(3), 313, 2004.

YOU, L. et al. Programmed population control by cell–cell communication and regulated killing. **Nature**, 428(6985), 868, 2004.

YU, Y. A.; ZHANG, Q.; SZALAY, A. A. Establishment and characterization of conditions required for tumor colonization by intravenously delivered bacteria. **Biotechnology and Bioengineering**, 100(3), 567-578, 2008.

ZALATAN, J. G. et al. Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. **Cell**, 160(1-2), 339-350, 2015.

ZHANG, X. et al. The genes slyA, STM3120 and htrA are required for the anticancer ability of VNP20009. **Oncotarget**, 7(49), 81187, 2016.

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

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