



1 2 9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Marta Cruz Grilo de Oliveira Garcia

Relatórios de Estágio sob orientação do Dr. Paulo Monteiro e da Dra. Cláudia Maria Gama e Monografia intitulada “The use of anaerobic and facultative anaerobic bacteria in the treatment of solid and metastatic cancers” sob orientação da Professora Doutora Sara Domingues, referente à Unidade Curricular “Estágio” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Marta Cruz Grilo de Oliveira Garcia

Relatórios de Estágio sob orientação do Dr. Paulo Monteiro e da Dra. Cláudia Maria Gama e
Monografia intitulada “The use of anaerobic and facultative anaerobic bacteria in the
treatment of solid and metastatic cancers” sob orientação da Professora Doutora Sara
Domingues, referente à Unidade Curricular “Estágio” apresentados à Faculdade de Farmácia
da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2023

Eu, Marta Cruz Grilo de Oliveira Garcia, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2018283098, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “The use of anaerobic and facultative anaerobic bacteria in the treatment of solid and metastatic cancers” apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 1 de setembro de 2023

Marta Cruz Grilo de Oliveira Garcia

(Marta Cruz Grilo de Oliveira Garcia)

Agradecimentos

À minha mãe, por ser o meu braço direito e um apoio incondicional, Obrigada!

À minha irmã, a minha Melhor Amiga, Obrigada pelas gargalhadas!

Ao meu avô por ser a minha maior inspiração, Para sempre!

À minha avó, uma estrelinha que estará sempre no meu coração.

Ao meu Pai, avós, tios, primos, por me terem acompanhado neste percurso e pelo apoio incondicional.

Ao David, meu amor, Obrigada por cada dia, pelo carinho, e pela tua alegria contagiante.

Às minhas dez meninas do Rainha, passe o tempo que passar, serão sempre casa.

À Andreia, que para além de Madrinha, é uma Grande amiga.

Aos meus amigos da faculdade, em especial às “Hot Hot”, sem vocês os últimos cinco anos não teriam sido tão bons!

À minha família de praxe, Obrigada pela companhia e grande companheirismo! Ficam para sempre no meu coração.

À Comissão Organizadora da Queima das Fitas’22 e 23, em especial aos oito que sempre me acompanharam, Obrigada por me terem feito viver A Queima das Fitas e Coimbra!

À Rita, Ana e à Marçal, um Obrigada não chega pelo último ano, são muito importantes para mim.

Ao JP, pela amizade sincera.

À equipa da Farmácia São José, em especial ao Dr. Paulo Monteiro, pela oportunidade de aprendizagem, à Ágata, Maria Inês, e Rita, pela alegria com que me ensinaram.

À Dra. Cláudia e às Meninas da Microbiologia pela partilha de conhecimentos, em especial à Manu, à Carina, à Sara e à Jé, pela amizade e alegria.

À Professora Doutora Sara Margarida dos Santos Domingues, pela atenção, dedicação e paciência, no desenvolvimento desta monografia. Foi um prazer! Muito obrigada, Professora!

A Coimbra, que me viu crescer, que me fez viver e que me enche o coração de saudade, por um dia partir. Até um dia, minha Coimbra!

“Saudade, correndo no Mondego,

De todo este sonho tão fogaz

Ó Coimbra, Não te vás

Voa a capa em sinal de partida

Ó Cidade, canto para ti

Minha força seja o som da despedida”

Balada do 5º ano Farmacêutico, 2013

Índice

PRIMEIRA PARTE – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
I. INTRODUÇÃO	10
II. ANÁLISE SWOT	11
2.1 PONTOS FORTES (<i>STRENGTHS</i>)	11
2.1.1 <i>Equipa, localização e instalações</i>	11
2.1.2 <i>Diversidade de tarefas</i>	12
2.1.3 <i>Horário de funcionamento alargado e proximidade com os utentes</i>	13
2.2 PONTOS FRACOS (<i>WEAKNESSES</i>)	13
2.2.1 <i>Elevado número de estagiários</i>	13
2.2.2 <i>Produtos Cosméticos e Veterinários</i>	14
2.3 OPORTUNIDADES (<i>OPPORTUNITIES</i>)	14
2.3.1 <i>Formações</i>	14
2.3.2 <i>Serviços disponibilizados pela farmácia</i>	15
2.3.3 <i>Protocolo com a Liga Portuguesa Contra o Cancro</i>	16
2.3.4 <i>Preparação de Manipulados</i>	16
2.4 AMEAÇAS (<i>THREATS</i>).....	17
2.4.1 <i>Medicamentos esgotados ou rateados</i>	17
2.4.2 <i>Locais de venda de MNSRM</i>	17
III. CASOS PRÁTICOS	18
IV. CONCLUSÃO	21
V. REFERÊNCIAS.....	22
LISTA DE ABREVIATURAS.....	24

SEGUNDA PARTE – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

I. INTRODUÇÃO	25
II. BLUEPHARMA	25
2.1 CONTROLO DE QUALIDADE	26
2.2.1 <i>Laboratório de Microbiologia</i>	27
III. ANÁLISE SWOT.....	28
3.1 PONTOS FORTES (<i>STRENGTHS</i>).....	28
3.1.1 <i>Acolhimento e equipa</i>	28
3.1.2 <i>Metodologia Kaizen</i>	29
3.1.3 <i>Plano de estágio</i>	29
3.1.3.1 <i>Preparação e controlo dos meios de cultura</i>	30
3.1.3.2 <i>Análise microbiológica das amostras</i>	31
3.1.3.3 <i>Análise da água purificada</i>	31

3.1.3.4 Análise da qualidade do ar.....	32
3.1.4 Higiene do Laboratório.....	32
3.2 PONTOS FRACOS (<i>WEAKNESSES</i>)	33
3.2.1 Preenchimento da documentação	33
3.2.2 Métodos de análise	33
3.2.3 Variabilidade de Resultados.....	34
3.3 OPORTUNIDADES (<i>OPPORTUNITIES</i>)	34
3.3.1 Plano de formações.....	34
3.3.2 Transposição entre setores do Controlo de Qualidade.....	34
3.4 AMEAÇAS (<i>THREATS</i>).....	35
3.4.1 Duração do estágio	35
3.4.2 Pouca preparação	35
IV. CONCLUSÃO	36
V. ANEXOS.....	37
VI. BIBLIOGRAFIA	39
RESUMO	41
ABSTRACT	42
LIST OF ABBREVIATURES	43

TERCEIRA PARTE – MONOGRAFIA

"The use of anaerobic and facultative anaerobic bacteria in the treatment of solid and metastatic cancers"

I. INTRODUCTION	44
II. HISTORY OF BACTERIAL ANTICANCER THERAPY	45
III. BACILLUS CALMETTE-GUERIN.....	46
IV. THE DIFFERENT BACTERIA AND SOME BENEFICIAL APPLICATIONS.....	47
V. MICROORGANISMS USED IN CANCER TREATMENT	48
5.1 CLOSTRIDIUM NOVYI	48
5.1.1 Tumor targeting and destruction by <i>C. novyi-NT</i>	49
5.1.2 Different approaches to application	49
5.1.2.1 Genetic modification of <i>Clostridium</i> spp.	50
5.1.2.1.1 <i>Clostridium</i> as a therapeutic agent.....	50
5.1.2.1.2 <i>Clostridium</i> as a drug delivery system vector	51
5.1.2.1.2.1 <i>Clostridium sporogenes</i>	52
5.2 SALMONELLA ENTERICA SEROVAR TYPHIMURIUM.....	53
5.2.1 Development of <i>Salmonella</i> as a therapeutic agent.....	54
5.2.1.1 Tumor targeting capacity.....	54
5.2.1.2 Oncolytic activity.....	55
5.2.2 Genetically modified bacteria	55

VI. THE ADVANTAGES OF BACTERIA OVER ONCOLYTIC VIRUSES IN CANCER THERAPY	59
VII. DISADVANTAGES IN THE USE OF BACTERIA IN THE TREATMENT OF CANCER.	61
VIII. CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVES	61
IX. BIBLIOGRAFIA.....	63

PRIMEIRA PARTE

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA



Orientado pelo Dr. Paulo Monteiro

Lista de Abreviaturas

DT - Diretor técnico

EC - Estágio Curricular

FC - Farmácia Comunitária

FJS - Farmácia São José

LPCC - Liga Portuguesa Contra o Cancro – Núcleo Regional do Centro

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM - Medicamento não sujeito a receita médica

MSRM - Medicamento sujeito a receita médica

I. Introdução

O plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra culmina num estágio curricular (EC) em farmácia comunitária (FC), que representa a primeira interação dos alunos com o mundo do trabalho e conseqüentemente, com o utente.

Desta forma, permitem-nos aplicar o conhecimento teórico que fomos adquirindo ao longo dos cinco anos na prática, que nos é permitida.

O farmacêutico é um agente de saúde pública que tem a responsabilidade, por contactar primeiramente com o utente, de ser ativo na educação e formação científica atualizada à população. Assim, reitero a importância destes profissionais de saúde para a população, não podendo confinar o seu papel à dispensa de medicamentos, mas ter um papel ativo em todas as suas vertentes.

As funções que se praticam incluem: a medição de parâmetros bioquímicos, biológicos e físicos, venda de suplementos alimentares, produtos cosméticos, dispositivos médicos, aconselhamento e dispensa de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) assim como de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), e ainda a revisão e otimização da terapêutica.

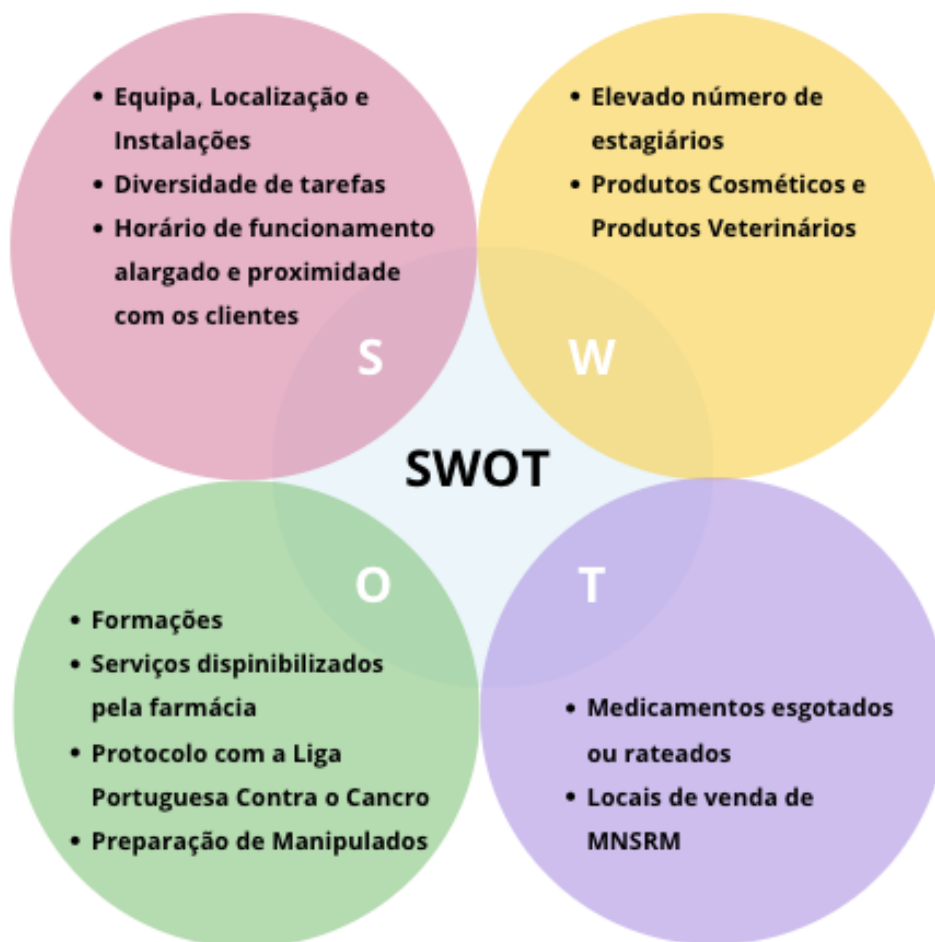
Estas atividades exigem do farmacêutico um rigor e diligência que os diferenciam dos restantes profissionais de saúde, sendo por isso os responsáveis pelo uso racional dos medicamentos.

Este relatório é referente ao EC realizado na Farmácia São José (FSJ), em Coimbra, que teve início no dia 3 de abril e terminou no dia 21 de julho de 2023, sob orientação do Dr. Paulo Monteiro e com a contribuição de toda a equipa, que me acompanhou desde o primeiro dia.

Em resultado do EC em FC, desenvolvi o relatório de estágio em farmácia comunitária, onde através de uma análise SWOT (*Strengths, Weakness, Opportunities, Threats*) pretendo demonstrar e analisar os pontos fortes, fracos, oportunidades e conseqüentes ameaças, visando sempre uma apreciação crítica integrando conhecimentos teóricos na prática farmacêutica.

II. Análise SWOT

Tabela I - Resumo análise SWOT



2.1 Pontos Fortes (*Strengths*)

2.1.1 Equipa, localização e instalações

A FSJ tem uma equipa numerosa e multidisciplinar composta pelo Doutor Paulo Monteiro, farmacêutico, Diretor Técnico (DT) e proprietário da farmácia, fazendo-se acompanhar de farmacêuticas entre as quais a: Dra. Ágata Teles, Dra. Ana Agria, Dra. Andreia Madanelo, Dra. Carla Oliveira, Dra. Carla Sousa, Dra. Carolina Monteiro, Dra. Joana Santos, Dra. Lígia Matos, Dra. Marta Abreu e a Dra. Rita Rebelo, assim como de técnicos de farmácia entre os quais: João Marques, Maria Inês Reis, Ricardo Madeira e pela Susana Jesus.

A FSJ insere-se num contexto particular devido à sua localização privilegiada, no Centro Comercial Primavera, na Avenida Calouste Gulbenkian, perto do Centro Hospitalar e

Universitário de Coimbra composto pelo Hospital da Universidade, Hospital pediátrico e a Maternidade Dr. Bissaya Barreto e ainda relativamente perto do Centro de Saúde de Celas, do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E (IPOFG, E.P.E) e da Liga Portuguesa Contra o Cancro – Núcleo Regional do Centro (LPCC). Para além deste motivo, encontra-se numa zona recheada de cafés, supermercados, diversas lojas e ainda clínicas privadas e consultórios médicos.

Por este motivo e mais algum, é frequentada por pessoas de todas as faixas etárias, e com as mais variadas necessidades, fazendo com que todos os dias se lide com pessoas diferentes, provenientes de todos os pontos do país, com as mais variadas particularidades.

As instalações da farmácia assim como a sua organização espacial cumprem os requisitos exigidos no artigo 29º do Regime Jurídico das Farmácias de Oficina¹ sendo constituída pela sala de atendimento com dez balcões, por dois gabinetes onde se prestavam os mais variados cuidados aos utentes, gabinete do DT, copa, laboratório de manipulados, local de gestão e receção de encomendas, instalações sanitárias e ainda diversos locais de arrumos².

2.1.2 Diversidade de tarefas

O plano de estágio para o EC em FC foi extensamente delineado pelo Doutor Paulo Monteiro, DT da farmácia.

Inicialmente, fomos introduzidos a todos os funcionários que prontamente se mostraram disponíveis para nos ensinar. Começamos por visitar todas as instalações e perceber que a sua dimensão permitia uma divisão de tarefas por setores. O primeiro andar da farmácia era onde se desenvolvia toda a parte de *Back-office*, que consistia no tratamento da documentação, e do receituário, na gestão e receção de encomendas e conseqüentemente, o seu armazenamento adequado, nas condições apropriadas, tendo sempre em consideração as datas de validade e ainda o Preço de Venda à Farmácia (PVF) e o Preço de Venda ao Público (PVP). Para além disso, também decorriam regularizações de devoluções com emissão de notas de crédito.

Todos os funcionários tinham as suas tarefas bem definidas e isso permitiu-me acompanhar alguns deles, para perceber mais pormenorizadamente cada uma.

A FSJ destaca-se, sem dúvida pela diversidade de tarefas que possui. No piso zero, no *Front-office*, decorria todo o atendimento e podemos presenciar consultas das mais variadas áreas, administração de injetáveis e de vacinas.

Adicionalmente, a FSJ contava ainda com a realização de manipulados, segundo as boas práticas, e com a preparação individualizada da medicação (PIM) que permite prevenir erros

na toma dos mesmos por parte dos utentes o que ajudou a solidificar conhecimentos adquiridos, destacando-se a indicação terapêutica e posologia.

2.1.3 Horário de funcionamento alargado e proximidade com os utentes

Com um amplo fluxo de pessoas a FSJ brinda-nos com um horário alargado de segunda a sexta-feira das 8h30 às 21h e das 9h as 20h aos sábados, que confere uma maior flexibilidade aos utentes.

Tendo em conta o extenso horário da farmácia pude acompanhar tanto a abertura como o fecho da mesma uma vez que durante o mês de abril, devido ao elevado número de estagiários, fomos distribuídos por turnos.

Diariamente, centenas de pessoas passam pela FSJ, muitas fidelizadas há anos e outras mais recentes, mas que não abdicam da simpatia e disponibilidade que ali encontram. O atendimento é personalizado e exclusivo, e os utentes são tratados pelo nome, por vezes difícil para nós, estagiários, que contactávamos pela primeira vez com os mesmos, mas logo reconhecidos pelos restantes funcionários. As interações com os utentes tornam-se constantes, e ao fim de quatro meses acabamos por ser recompensados com a sua confiança.

Estes fatores permitem-me afirmar que foram os pontos fortes do meu estágio uma vez que me conferiram confiança na aplicação dos conhecimentos teóricos que fui adquirindo na faculdade e agora pude colocar em prática.

2.2 Pontos Fracos (*Weaknesses*)

2.2.1 Elevado número de estagiários

A possibilidade de realizarmos o estágio com outros colegas pode ser uma mais-valia na medida em que temos um sentido de ajuda e partilha de experiências.

Contudo, é também uma desvantagem na nossa aprendizagem uma vez que não permite, por vezes o foco e a atenção que merece nem a disponibilidade por parte dos orientadores para com cada estagiário.

Na FSJ, devido à sua grande dimensão e variedade de tarefas os estagiários conseguiram ser colocados em rotação. Contudo, havia situações em que não tínhamos tarefa atribuída por haver tantos funcionários e estagiários e estes já estarem, por consequência, alocadas a cada uma das tarefas.

2.2.2 Produtos Cosméticos e Veterinários

A indústria farmacêutica é muito vasta e a área da Dermofarmácia e Cosmética é uma das mais competitivas dentro do ramo.

Apesar da FSJ apresentar uma diversidade enorme em Dermofarmácia e Cosmética, abrangendo marcas como a Lierac[®], Skin Ceutical[®], Filorga[®], Avene[®], Uriage[®], Isdin[®], entre outras. Apesar de ter expandido o meu conhecimento ao longo destes quatro meses com pessoas formadas no mundo da Cosmética e ter assistido a formações mediadas por pessoas especializadas, considero que o conhecimento científico que possuímos fruto do plano curricular de MICEF, não era suficiente para me sentir confortável a aconselhar o utente de forma adequada.

Por ser uma área tão vasta, com diversas funções, aplicabilidades, e marcas torna-se difícil em tão pouco tempo de estágio absorver todos os conceitos.

À semelhança destes produtos, os Produtos Veterinários mostraram-se ser um entrave ao aconselhamento.

A FSJ apresenta uma grande rotação de produtos veterinários, para animais de companhia, na sua maioria, o que mostra o desajuste que, na minha opinião existe para com a unidade curricular de Preparações de Uso Veterinário.

Estes produtos, como antiparasitários, antibióticos, antifúngicos, contra carrças, anti-inflamatórios, eram vendidos quase diariamente e das vezes em que fui confrontada com situações destas senti-me insegura, no seu aconselhamento, uma vez que a formação que temos no MICEF, não nos prepara de forma completa para situações práticas como o EC em FC.

Em suma, os temas abordados nestas unidades curriculares são de extrema importância para que detenhamos bases científicas, para aplicar na FC. Contudo, nestes dois casos em específico, penso que deveria haver um aproximar do ensino teórico ao prático, para que os alunos chegados ao mundo do trabalho consigam colocar em prática o que aprenderam.

2.3 Oportunidades (*Opportunities*)

2.3.1 Formações

A área da saúde está em constante mudança e evolução e por isso somos confrontados, diariamente, com novidades e atualizações ao que, até então conhecemos.

Os farmacêuticos comunitários estão num epicentro para estas alterações e por haver a necessidade de evolução, os funcionários da equipa São José eram quase, diariamente, visitados com esta finalidade.

Ao longo do meu EC tive o privilégio de assistir a inúmeras formações nas mais variadas áreas da FC, desde a dermocosmética pela Cantabria® aos dispositivos médicos, contraceção de emergência pela Gedeon Richter®, suplementação alimentar pela Nestlé Health Science® – Pure encapsulations®, que me conferiram maior conhecimento e prontidão no atendimento ao utente.

Considero que estas formações foram de extrema importância para a minha aprendizagem, uma vez que para além de promoverem o contacto com os mais variados produtos e a sua aplicabilidade aos nossos utentes permitem-nos conhecer mais do mundo farmacêutico.

2.3.2 Serviços disponibilizados pela farmácia

A FSJ preza pelo contacto com o utente e acima de tudo pela satisfação do mesmo. Desta forma, é conhecida pela ampla prestação de serviços que levam à fidelização dos utentes, dispondo de dois gabinetes compostos por secretárias e cadeiras para conforto dos utentes², que se destinam à administração de vacinas e injetáveis, à medição de parâmetros bioquímicos como triglicerídeos, glicémia, pressão arterial e colesterol total, para controlo da Doença Cardiovascular e Diabetes *Mellitus*.

É nesta atividade que conseguimos promover um contacto mais próximo com o utente e em que por vezes nos confidenciam partes da sua vida que podem ser uteis para o nosso aconselhamento. Neste sentido, e tendo contribuído para que houvesse um maior controlo e cuidado com as medições destes parâmetros, neste caso da glicémia, acautelei a progressão de uma situação de Diabetes *Mellitus* II, não medicada, por parte de um senhor que nos visitava, sistematicamente para controlo.

Para além destes serviços, a PIM permite-nos evitar erros na medicação por parte dos utentes, a entrega ao domicílio de medicamentos confere à FSJ um estatuto de proximidade e interesse por ajudar qualquer um.

No que toca a serviços farmacêuticos, a FSJ contribui para a promoção da saúde através de consultas de nutrição com uma nutricionista do programa EasySlim® que realiza avaliações semanais assumindo um papel crucial na população devido ao crescente impacto da alimentação na saúde, consultas de podologia.

Participa ainda no Programa de Troca de Seringas^{3;4}, em vigor deste janeiro de 2016, que nos permite ajudar a sociedade na prevenção da disseminação de doenças sexualmente transmissíveis. Este serviço consiste na entrega de um kit, composto por duas seringas, dois toalhetes, duas ampolas de água bidestilada, duas carteiras com ácido cítrico, dois filtros, dois recipientes e dois preservativos, na entrega de duas seringas usadas.

2.3.3 Protocolo com a Liga Portuguesa Contra o Cancro

Devido à proximidade da FSJ com a LPCC foi estabelecido um protocolo de forma a garantir que os utentes oncológicos e com poucas capacidades económicas, previamente sinalizados pela LPCC tivessem acesso à medicação necessária. Este protocolo permitia que a FSJ realizasse a dispensa dos medicamentos indicados pelo médico sendo a Liga a suportar integral ou parcialmente a sua despesa.

Geralmente, o utente chegava à farmácia com a prescrição médica e com um documento emitido pelo médico responsável da LPCC, onde viria descrito por exemplo “Solicita-se a cedência da medicação para 2 meses” ou “Solicita-se a dispensa da receita na sua totalidade”.

Posto isto, procedíamos à dispensa da receita segundo as indicações e fazíamos o aconselhamento necessário. No final do atendimento o montante era colocado a crédito e era pago pela LPCC no final de cada mês.

Na minha opinião, acho de louvar que haja associações a prestar este tipo de serviços, sendo ajudas inegáveis para a população, conferindo-lhes a possibilidade de tratamentos prolongados característicos de situações oncológicas. Sem dúvida que considero este protocolo uma mais-valia do EC devido ao contacto frequente com os doentes e com os seus quadros terapêuticos.

2.3.4 Preparação de Manipulados

Os medicamentos manipulados são formulas magistrais preparadas sob prescrição médica ou sem necessidade da mesma, com intuito de colmatar lacunas no mercado farmacêutico. Estes medicamentos eram preparados no laboratório do primeiro piso da FSJ, por uma farmacêutica responsável, cumprindo sempre as regras de laboratório como por exemplo a utilização de máscara, luvas, bata e cabelo apanhado.

Diariamente, eram realizados inúmeros pedidos de medicamentos manipulados, embora cada vez menos frequente que exigiam a prontidão e rapidez por parte da equipa para satisfazer o utente. As situações mais frequentes eram casos pediátricos para ajuste de dose.

A FSJ contava ainda com um *software*, o SoftGaleno[®] que permitia a qualquer farmacêutico ter acesso e gerir a informação necessária relativa aos medicamentos manipulados.

Infelizmente, não tive oportunidade de preparar nenhum manipulado, apenas observei a sua execução por parte da farmacêutica, segundo as boas práticas de preparação de medicamentos manipulados⁵.

2.4 Ameaças (*Threats*)

2.4.1 Medicamentos esgotados ou rateados

Atualmente, a indústria farmacêutica apresenta falta de recursos para produzir determinados medicamentos. A ausência de medicamentos passa por analgésicos, anti-inflamatórios até medicação cónica como Diabetes. Na minha ótica devíamos trabalhar urgentemente numa verdadeira e robusta estratégia para reserva de medicamentos, para assim evitar que haja falta de medicamentos necessários para tratamentos *lifesaving*.

Em Portugal, e ao contrário do que está a ocorrer em países vizinhos o utente dirigir-se à farmácia para levantar uma prescrição médica que se encontra esgotada e é confrontado com “Não posso dispensar um alternativo”. Será a solução voltar ao centro de saúde para pedir nova consulta para obter nova receita?

Entre abril e julho de 2023, período em que realizei o meu EC pude constatar a falta de medicamentos como Trulicity[®], Ovestin[®], Saxenda[®] o Inderal[®], o Avamys[®] e ainda o Lorenin[®].

Na minha opinião, e tentando combater esta falta de medicamentos, devia ser construída uma lista de equivalentes terapêuticos, o quanto antes para garantir que o utente não sai da farmácia de “mãos a abanar”. Uma das mais valias foi sem dúvida a existência da Linha 1400⁶ que permitia a emissão de um alerta para as farmácias mais próximas com o objetivo de encontrar a primeira que tinha o medicamento em stock e mantê-lo reservado até o utente ir levantar.

2.4.2 Locais de venda de MNSRM

De acordo com o Decreto-Lei n.º 134/2005 de 16 de Agosto é permitida a venda de MNSRM fora das farmácias, em determinados locais de venda regulados pela agência reguladora do medicamento, o INFARMED.

Por não terem o seu preço definido pela legislação, ao contrário dos MSRM, levam a uma discrepância de preços entre as farmácias e os Locais de Venda de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (LVMNSRM)⁷.

Estes locais são decerto uma ameaça às farmácias por se localizarem por vezes em grandes cadeias de lojas com grande afluência de pessoas que não se conseguem fazer acompanhar pelas farmácias. Alguns dos fatores que contribuem para esta discrepância são a redução em gastos e em recursos humanos, apresentação de lineares com uma grande variedade de produtos praticando preços mais vantajosos.

Como futura farmacêutica, sinto uma real ameaça às farmácias e aos próprios utentes uma vez que acabam por adquirir os MNSRM em LVMNSRM, sem aconselhamento e conseguindo, por vezes negligenciar o papel do farmacêutico levando à incorreta utilização de medicamentos.

III. Casos Práticos

Caso Prático I.

Um utente com 72 anos, cliente habitual, dirige-se à farmácia afirmando que vai realizar uma colonoscopia, daquele dia a uma semana, e que precisa de uma preparação de limpeza intestinal.

Para realizar estes exames é de extrema importância que todo o intestino esteja perfeitamente limpo. O utente trazia consigo uma folha com três opções de preparações de limpeza (Klean-Prep[®], Endofalk[®] e Moviprep[®]) e questionou-me sobre qual tomar.

Desta forma, sendo um idoso que já faz medicação crónica passei a explicar que tínhamos três opções disponíveis, sendo que variava o volume de líquido que tinha de ingerir. Assim confirma-me que prefere o que envolver beber menor quantidade de líquidos e desta forma sugiro o Moviprep[®].

Após isto, pede-me que lhe explique todo o procedimento e que refira se existem restrições alimentares. Fiz um registo em papel com o esquema da toma e referi ainda que, nos dois dias anteriores ao exame devia ter cuidados como: comer apenas sopas brancas, caldos de carne e peixe, arroz, pão branco, e que os iogurtes e gelatinas não podiam ser de morango nem framboesa uma vez que, por serem corados podem manchar o intestino e dificultar a execução do exame. Avisei também que não devia comer legumes nem fruta.

Em termo de conclusão, indiquei que se tivesse alguma dúvida até ao dia do exame para voltar a farmácia.

Caso Prático 2.

Uma utente, com aproximadamente, 29 anos, dirige-se à FSJ afirmando que tem vontade urgente de urinar, com ardor associado e pede um antibiótico.

Inicialmente, questionei por mais sintomas e pela duração dos mesmos. Disse-me que para além dos que tinha referido inicialmente também tinha sensação de esvaziamento incompleto da bexiga, necessidade frequente de urinar, afirmou não ter presença de sangue na urina e que os sintomas teriam iniciado no dia anterior. Questionei se eram episódios recorrentes ou se teria alguma comorbilidade ao que me respondeu que não.

Posto isto, expliquei à utente que poderia ser uma infeção urinária, mas que não poderia dispensar antibiótico, por ser MSRM.

Em alternativa, sugeri o Cystalia[®], uma saqueta por dia, de preferência de manhã, com a bexiga vazia durante pelo menos trinta dias. Este probiótico é constituído por Lactobacillus rhamnosus LR06, Lactobacillus plantarum LP02 e arando vermelho para garantir o equilíbrio do trato urinário.

Para além disto, sugeri a ingestão de líquidos e alimentos com vitamina C para acidificar a urina e desta forma dificultar a proliferação de microrganismos, e que houvesse um cuidado de higiene íntima reforçado.

Indiquei também que se os sintomas persistissem ou agravassem deveria ser vista por um médico.

Caso Prático 3.

Um utente na casa dos 20 anos dirige-se à farmácia queixando-se com muita tosse, impressão na garganta, e comichão nos olhos. Por estarmos a entrar na altura da primavera questionei se não teria comichão na garganta ou vontade de espirrar ao que me respondeu de forma afirmativa tendo ainda referido que, também costuma sofrer com rinite alérgica.

Uma vez que, este quadro clínico corresponde a uma situação típica de alergia, recomendei a toma de Cetirizina[®] 10 mg, um anti-histamínico usado para tratar alergias ou rinite alérgica.

Contudo, a utente mostrava-se muito aflita com a comichão nos olhos, disse-me que não tinha formação de remela e por isso, sugeri Zabak[®], com cetotifeno, um antialérgico, por ter uma ação mais rápida no alívio da comichão nos olhos.

Alertei ainda para que se não observasse melhorias nos 5 dias seguintes consultasse o seu médico.

Caso Prático 4.

Uma utente com aproximadamente 25 anos dirige-se à farmácia com uma queimadura solar, pois teria ido à praia no dia anterior. Revela ter tido dor a tomar banho, devido a temperatura da água e desconforto a dormir devido à dor que sentia.

Após observar as zonas da lesão, eram apenas superficiais, não atingiam locais sensíveis, nem mostravam sinais de infeção. Desta forma, sugeri a aplicação de Biafine[®], com Trolamina – 6,7 mg/g – emulsão cutânea, para promover a cicatrização. Indiquei que a aplicação deveria

ser por uma espessa camada até haver recusa por parte da pele fazendo penetrar por massagem. Deveria continuar a aplicar 2 a 4 vezes ao dia até que a área ficasse completamente curada.

Posto isto, aconselhei algumas práticas não farmacológicas como a importância da ingestão de muitos líquidos e aplicação de produtos pós solares para ajudar na regeneração e hidratação da pele.

Caso Prático 5.

Uma utente, com aproximadamente 50 anos, dirige-se à farmácia, queixando-se de muita comichão no couro cabeludo, solicitando por isso, um champô para a caspa, que a vem a incomodar há uns dias.

Após analisar o couro cabeludo da utente reparei que, não seria caspa devido à grande oleosidade acompanhada da presença de escamas amareladas. Expliquei à utente que iria haver a necessidade de fazer um tratamento para uma dermatite seborreica, que se caracterizava, exatamente, pela presença de uma levedura que provoca a descamação, neste caso oleosa, que por vezes dá comichão.

Desta forma, sugeri o tratamento com o shampoo da Ducray Kelual DS[®], composto por ciclopiroxolamina e piritonato de zinco que ajudam a combater os fungos e a kluamida com efeito esfoliante suave. A aplicação devia ser realizada duas vezes por semana seguidos de três minutos de repouso, por um período até seis semanas.

Para complementar o tratamento, sugeri ainda que poderia acompanhar de um shampoo de manutenção, da mesma marca composto por uma base lavante.

IV. Conclusão

Em suma, o MICF culmina se forma significativa no EC em FC, representando uma etapa crucial para nos permitir aplicar conhecimentos teóricos adquiridos ao longo dos últimos cinco anos de formação. Ao entrar em contacto direto com o mundo profissional e com os utentes, tive a oportunidade de vivenciar o papel fundamental do farmacêutico como agente de saúde pública.

Para além da grande responsabilidade na dispensa de medicamentos desempenhei um papel ativo na educação da população e na promoção de uma terapêutica eficaz e segura, sempre acompanhada de uma equipa de excelência que me proporcionou segurança nesta prática.

O EC não demonstrou apenas a diversidade de funções desempenhadas pelo farmacêutico, mas também enfatizou a importância do uso racional dos medicamentos. Neste sentido é essencial reconhecer a relevância do farmacêutico como profissionais que se destinam a muito para além da dispensa.

Findo afirmando que, o EC foi uma etapa transformadora que decerto me prepara para os desafios da prática profissional, conferindo-me capacidades para contribuir de forma ativa e responsável para o bem-estar da comunidade.

V. Referências

1. **Decreto-Lei n.º 307/2007, de 31 de agosto** - [Consult. 29 aug. 2023]. Disponível em https://www.infarmed.pt/documents/15786/1067254/022-A_DL_307_2007_6ALT.pdf
2. SANTOS, Henrique - **Boas práticas farmacêuticas para a farmácia comunitária** [Consult. 29 aug. 2023]. Disponível em https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/boas_praticas_farmaceuticas_para_a_farmacia_comunitaria_2009_20853220715ab14785a01e8.pdf
3. 5L, Contentor - **PROGRAMA DE TROCA DE SERINGAS NAS FARMÁCIAS (PTS) FLUXOGRAMA PARA REQUISIÇÃO E GESTÃO DE MATERIAL PELA FARMÁCIA** [Consult. 29 aug. 2023]. Disponível em https://spms.min-saude.pt/wp-content/uploads/2017/12/2017.07.19_PTS_Fluxograma2017.pdf
4. **Farmácias passam a ser remuneradas pela troca de seringas** - atual. 2 dec. 2016.
5. **Portaria n.º 594/2004, 2 de Junho** - [Consult. 29 aug. 2023]. Disponível em https://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria_594-2004.pdf/d8b8cac3-3250-4d05-b44b-51c5f43b601a
6. **Linha 1400** - [Consult. 22 aug. 2023]. Disponível em <https://www.1400safe.pt/>
7. INFARMED - **Legislação Farmacêutica Compilada Decreto-Lei n.º 134/2005, de 16 de Agosto** [Consult. 25 aug. 2023]. Disponível em https://www.infarmed.pt/documents/15786/1068384/035-B_DL_134_2005_3Alt.pdf

SEGUNDA PARTE

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA



Orientado pela Dra. Cláudia Gama

Lista de Abreviaturas

AC - Agar de Cetrimida

BLPH - Bluepharma

BPF - Boas Práticas de Fabrico

CQ - Controlo de Qualidade

CSA - Caseína de Soja (*Soybean-Casein Digest Agar*)

CSB - Caldo Peptona de Caseína e Soja

EC - Estágio curricular

FDA - *Food and Drug Administration*

HPLC - *High performance liquid Chromatography*

IF - Indústria Farmacêutica

LFQ - Laboratório Físico-químico

LM - Laboratório de Microbiologia

MC - Meios de cultura

MCA - Agar de MacConkey (*MacConkey Agar*)

MCB - Caldo de MacConkey (*MacConkey Broth*)

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

NAPP - Solução Salina de Peptona Tamponada

Ph. Eur - Farmacopeia Europeia

R2A - *Agar Reasoner's 2A*

DAS - Agar de Dextrose de Sabourad (*Sabourad-Dextrose Agar*)

SOP's - *Standard Operating Procedures*

SWOT - *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

TAMC - *Total Aerobic Microbial Count*

TYMC - *Total Yeast/Mould Count*

UFC - Unidade formadora de colónias

USP -Farmacopeia dos Estados Unidos

VL - Validação de Limpeza

I. Introdução

Iniciando o Mestrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) em 2018 o interesse pela área foi se fazendo notar. A Indústria Farmacêutica (IF) durante vários anos de aprendizagem mostrou-se ser um caminho por descobrir, caminho este que começamos a trilhar apenas na reta final deste percurso.

Para mim, a profissão e o ato farmacêutico superam aquele que é o atendimento e a dispensa de medicamentos ao balcão, assim sendo, e de forma a complementar à minha formação decido ingressar na vertente da IF, área com cada vez mais valor e relevância nos dias de hoje.

A IF tem vindo a demonstrar um grande desenvolvimento, com vários avanços comprovados ao nível da tecnologia e desenvolvimento científico¹.

Por ser uma empresa farmacêutica de grande prestígio e renome a nível nacional e internacional a Bluepharma – Indústria Farmacêutica, SA foi a minha escolha para realizar o estágio curricular (EC).

Após a entrevista com os diversos responsáveis dos diferentes departamentos fui selecionada para integrar a equipa da Microbiologia. O estágio teve uma duração de 3 meses, tendo começado no dia 9 de janeiro de 2023 e terminado no dia 31 de março de 2023, onde estagiei sob regime exclusivamente presencial com horário rotativo semanal entre as 7h30m e as 16h e, entre as 14h30m e as 23h sob a coordenação da Doutora Cláudia Gama, responsável do departamento do Controlo de Qualidade (CQ) e por todas as colaboradoras do Laboratório de Microbiologia (LM): Ana Paula Reis, Marta Madeira, Manuela Pereira, Carina Araújo, Jéssica Tomás, Sara Lamas e Sara Silvestre.

Em resultado do EC em indústria farmacêutica, desenvolvi o relatório de estágio em Indústria Farmacêutica na Bluepharma – Indústria Farmacêutica, onde através de uma análise SWOT (*Strenghts, Weakness, Opportunities, Threats*)² pretendo demonstrar e analisar os pontos fortes, fracos, as oportunidades e consequentes ameaças.

II. Bluepharma

A Bluepharma (BLPH), indústria farmacêutica com sede em S. Martinho, Coimbra iniciou a sua atividade em 2001, no mês de Fevereiro e, atualmente, emprega mais de 750 colaboradores, possui perto de 20 empresas e espalha o seu contributo por países como Moçambique, Angola, entre outros³.

Com uma notória reputação internacional, desenvolve atividades que passam pela investigação, fabrico, embalagem, controlo de qualidade e introdução no mercado de inúmeros medicamentos³.

É uma empresa que preza pela contínua formação dos seus colaboradores tendo um departamento dirigido para essa finalidade, onde abordam temas como boas práticas de documentação, segurança em laboratórios, melhoria contínua, entre outros.

A atividade da BLPH centra-se nas áreas da produção, investigação e desenvolvimento de medicamentos: comercialização de genéricos. O seu constante crescimento deve-se ao rigor imposto no cumprimento de qualquer tarefa, aliado aos elevados padrões de qualidade e ao investimento contínuo em inovação e desenvolvimento⁴.

O compromisso da BLPH centra-se na qualidade dos seus produtos e, na sustentabilidade ambiental. Neste sentido, já desenvolveu projetos como o *Bluelinks* com objetivos sociais, ambientais e económicos, *Blue is Green*, onde pretendem combater a poluição com plástico, implementando sempre um sistema integrado de qualidade, ambiente, higiene e segurança apoiado nas Normas ISSO 9001 (Gestão de Qualidade), ISSO 18001, OHSAS 18001, nas Boas Práticas de Fabrico (BPF) e na legislação em vigor, tendo em 2009 conseguido a certificação pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o desenvolvimento e produção de formas sólidas⁵.

Em 2020, a BLPH conseguiu introduzir no mercado uma nova embalagem de medicamentos para daltónicos através do sistema de identificação ColorADD[®] demonstrando mais uma vez estarem focados no utente, no futuro e numa política inclusiva^{6:7}.

2.1 Controlo de Qualidade

O departamento do CQ divide-se no Laboratório físico-químico (LFQ) e no Laboratório de microbiologia (LM) que cooperam para garantir a qualidade dos princípios ativos, excipientes e formas farmacêuticas finais. Ambos se regem pelas especificações dos clientes, assim como pelos métodos farmacopeicos e pelas SOP's (*Standard Operating Procedures*), documentos internos que são constantemente atualizados e que contém toda a informação necessária sobre aparelhos como balanças, câmaras de fluxo laminar, potenciómetros, autoclave, *High performance liquid Chromatography* (HPLC), entre outros, bem como os métodos analíticos, os procedimentos e os limites a aplicar em cada análise.

2.2.1 Laboratório de Microbiologia

O laboratório de microbiologia trabalha de braço dado com a maioria dos departamentos como as Estabilidades, o Desenvolvimento Galénico, a Amostragem, sendo necessário o contacto diário.

Para além da análise microbiológica de todas as formas farmacêuticas, excipientes e princípios ativos o LM também realiza validações de limpeza (VL) de aparelhos e salas de produção, realiza validações e análise de água purificada e, também, as validações e análise da qualidade do ar das salas limpas. Na análise dos resultados destes ensaios não podemos obter valores superiores aos limites máximos permitidos e estabelecidos nas respetivas especificações.

Uma vez que no LM trabalhamos com microrganismos patogénicos temos de ter em atenção eventuais contaminações, razão pela qual o espaço se encontra dividido em 3 salas com diferenciais de pressão que permitem que, na possibilidade de ocorrer uma contaminação se garanta a segurança de todos.

Para complementar, o LM obedece a regras de vestuário adicionais sendo que, todos os colaboradores do LM devem utilizar uma bata bege, diferente das restantes, localizada na antecâmara da entrada para o LM, para utilização exclusiva dentro do LM, acompanhada de luvas, óculos de proteção, sapatos específicos e máscara.

A manipulação de amostras e materiais deve ser sempre feita numa câmara de fluxo laminar (existem dois tipos de câmara: Horizontal, que protege apenas o produto e as amostras aí manuseadas, não protegendo o analista e, uma de segurança biológica de fluxo vertical que protege tanto o produto como o operador (Figura.1)). Nas análises devemos sempre usar máscara (por vezes FFP2, dependendo da amostra ou do produto que estamos a analisar) e luvas, é importante consultar a ficha de dados de segurança de cada produto a manipular. Sempre que terminamos uma análise é de extrema importância que desinfetemos todo o espaço com álcool etílico a 70%, existente em cada posto de trabalho e todos os materiais utilizados de modo a proteger o próximo analista. Após esta desinfecção, todo o material é colocado em autoclave para futura esterilização antes de poder ser descartado.

O LM é constituído por três salas sendo que a sala 1 é considerada a mais limpa, com diferencial positivo relativamente às que a antecedem e sucedem e, onde são realizadas as preparações dos meios de cultura e as esterilizações no autoclave Matachana. Na sala 2 realizam-se todas as análises e posterior incubação das amostras e, por fim, a sala 3, com o diferencial mais negativo, a de lavagem onde se higieniza todo o material e se descartam resíduos.

Devido às condições de armazenamento e conservação específicas de reagentes e materiais do LM, as salas são monitorizadas de acordo com as condições de temperatura e humidade relativa, dado que existem limites e requisitos para estes dois pontos. Esta manutenção era realizada e registada duas vezes por dia.

III. Análise SWOT

A análise SWOT é estruturada em duas dimensões: interna e externa

Tabela I – Resumo da análise SWOT



3.1 Pontos Fortes (*Strenghts*)

3.1.1 Acolhimento e equipa

No primeiro dia na BLPH começamos por assistir a uma apresentação realizada pela equipa dos recursos humanos que nos explicaram de forma concisa todo o funcionamento da empresa. Foi nos cedido o equipamento necessário, assim como, todo o material de trabalho e, posteriormente, fomos atribuídos a tutores que nos guiaram até ao fim do estágio. A equipa

do LM, revelou-se um dos pontos mais importantes da minha aprendizagem porque foram imprescindíveis na ambientação ao local de estágio e porque se mostraram disponíveis para esclarecer qualquer dúvida.

Durante estes 3 meses consegui aprender com várias analistas que, de formas diversas, me introduziram métodos de trabalho e formas de organização. Posto isto, considero que o espírito de equipa do LM foi um ponto forte do meu estágio na BLPH.

3.1.2 Metodologia Kaizen

A metodologia KAIZEN é uma filosofia japonesa centrada na mudança (“*Kai*”) para melhor (“*Zen*”) que se foca na melhoria da experiência do cliente, otimização dos processos, tornando-os mais visuais e eliminando desperdícios. Assim podemos evitar transportes, movimentações e esperas desnecessárias, produção de defeitos, e desperdício de talentos. Esta metodologia sugere que, ao melhorar comportamentos conseguimos sustentar melhorias e introduzir vários níveis de maturação na organização.

Estas alterações ocorrem ao nível da equipa, sensibilizando para o desperdício, usando *standards* visuais, e discutindo planos semanais. Um dos pontos mais positivos da aplicação da metodologia *kaizen* no LM foi a organização semanal.

Neste plano atribuíam-se tarefas a cada analista, que permitia que cada uma tivesse todas as suas funções bem definidas no início de cada semana e assim conseguisse concretizar as suas responsabilidades e organizar melhor o seu trabalho diário no laboratório.

O abraçar desta metodologia é visível nos mais pequenos detalhes como por exemplo a organização dos postos de trabalho: cada equipamento tem anexado o seu *LogBook* – suporte onde se registam todos os dados relativos aquele mesmo aparelho e todas as operações nele realizadas. Todo o material está organizado por gavetas, que por sua vez estão etiquetadas de forma que seja perceptível a qualquer colaborador.

Esta mentalidade facilita e agiliza o trabalho de todos e culmina num mesmo objetivo: a melhoria contínua.

3.1.3 Plano de estágio

O plano de estágio é crucial para a aprendizagem de um estagiário e, no meu caso este foi previamente delineado pela Dra. Cláudia Gama, responsável do CQ. Foi pensado ao pormenor para que houvesse uma sequência de conceitos acompanhados de protocolos de análise. Recorrentemente, fazíamos uma revisão no plano para perceber se haveria

necessidade de alterar, adaptar ou corrigir algo onde sempre pude esclarecer dúvidas e apontar soluções de melhoria.

O meu estágio começou com a leitura e interpretação de SOP's, de alguns capítulos da Farmacopeia Europeia (Ph. Eur.) e da Farmacopeia dos Estados Unidos (USP), com o objetivo de adquirir conceitos, de apreender procedimentos de análise inerentes ao LM, entender o funcionamento de aparelhos como balanças de calibração, potenciômetros, câmaras de fluxo laminar, autoclaves, banhos de água, estufas de incubação. Este contacto com a teórica permitiu-me sedimentar alguns conceitos e sentir-me mais preparada para acompanhar os processos de análise no laboratório.

Posteriormente, quando fui para o LM comecei por assistir e acompanhar todos os processos que se realizavam, desde a preparação das amostras, à incubação das mesmas e posterior análise de resultados. Por fim, dediquei-me à parte mais prática onde tive a possibilidade de executar os vários processos que vou passar a descrever, sempre com supervisão.

3.1.3.1 Preparação e controlo dos meios de cultura

Os meios de cultura (MC) são preparados a partir de pós desidratados aos quais é necessário adicionar água purificada e, em determinadas situações há necessidade de adicionar suplementos específicos de cada um. Cada MC tem um protocolo de fabrico associado, onde encontramos todas as etapas e campos para preencher. Observei e executei a preparação dos meios de cultura mais usados na rotina: solução peptonada-tamponada de cloreto de sódio (NAPP), agar de Sabourad Dextrose (SDA), agar de MacConkey (MCA), caldo de MacConkey (MCB), caldo de caseína e soja (CSB), agar de caseína e soja (CSA), agar R2 (R2A), agar de desoxicolato-lisina-xilose (XLDA), agar sal de manitol (MSA) e agar de Cetrimida (AC).

Após serem preparados, são controlados de acordo com as suas propriedades nutritivas, seletivas e de esterilidade, através da inoculação de microrganismos padrão a partir de culturas padrão recomendadas pela Ph. Eur e pela USP. O ensaio de esterilidade serve para verificar a eficácia do processo de esterilização na autoclave com a presença de bioindicadores que, através da mudança de cor, indicam a eficácia da esterilização^{8:9} e pode ser considerado um branco ou controlo negativo.

O controlo inicia-se pela utilização de culturas padrão recentes ("frescas") em discos liofilizados (considerada a 1ª passagem) de microrganismos padrão ou de uma subcultura dos mesmos em sementeira (desde que não se ultrapassem as 5 passagens do original).

Estas culturas devem respeitar os tempos e temperaturas de incubação determinados na tabela 2.6.12-1 da Ph. Eur e na tabela 1. do capítulo <61> da USP9. Após estarem feitas são colocadas em meio líquido de enriquecimento (Caldo Peptona de Caseína e Soja 101-CSB) e posteriormente colocadas “over night” durante um período de 18-24 horas à temperatura de 30-35°C.

No dia seguinte, são feitas diluições com solução salina de peptona tamponada (311-NAPP) até serem obtidas suspensões finais com um número de microrganismos entre 10 e 100 por cada 100 ml de suspensão. Por último, analisamos os meios líquidos com base na presença ou ausência de turvação ou alteração de cor, depósito ou precipitado e, os meios sólidos pela presença ou ausência de colônias numa quantidade inferior a 100 UFC por placa⁹.

3.1.3.2 Análise microbiológica das amostras

Quando uma amostra de um lote chega ao LM, para assegurarmos a sua segurança e qualidade temos de proceder à análise microbiológica da mesma. Estas análises baseiam-se na pesquisa de *Total Aerobic Microbial Count* (TAMC)¹⁰ e de *Total Yeast/Mould Count* (TYMC) pelo método da sementeira em placa, em placas com meio que favoreçam o crescimento, neste caso CSA e SDA (Figura.3). Consoante a amostra, pode existir a necessidade de usar meios mais específicos para detetar outros microrganismos. Após a incubação destas placas, durante 3-5 dias para TAMC e 5-7 dias para TYMC, os resultados são exibidos por UFC/placa^{9,11}.

Os ensaios qualitativos são usados para a identificação de microrganismos específicos, em concordância com o que vem escrito nas monografias da Ph. Eur e da USP. Por exemplo, na pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* a amostra é transferida para CSB, homogeneizada e incubada a 30-35°C durante 18-24 horas. É feita uma repicagem do inóculo de CSB para Agar de Cetrimida (meio seletivo) que é incubado a 30-35°C durante 72 horas. A possível presença de *Pseudomonas aeruginosa* é indicada pelo crescimento de colônias azuis ou esverdeadas⁹. Este resultado é confirmado com testes de identificação.

3.1.3.3 Análise da água purificada

Sendo este um laboratório responsável por todas as análises microbiológicas, realizamos também a análise da água purificada. A água é imprescindível como solvente, matéria-prima, agente de limpeza e durante o processo de fabrico de medicamentos. Esta é colhida em laboratórios e nas salas de amostragem e produção em determinados “pontos críticos”, e analisada no LM¹².

A análise realiza-se por um método de filtração por membrana onde avaliamos apenas um parâmetro quantitativo – a pesquisa de microrganismos totais.

O procedimento tem início na rampa de filtração (Figura. 2), com a filtração de 5mL de cada amostra por uma membrana estéril com diâmetro de poro de 0,45mm. Depois incubamos a membrana em Agar Reasoner's 2A (R2A) - meio não seletivo com elevado teor de água e baixo teor de nutrientes – durante 5-7 dias a 30-35°C¹².

Após incubação, avaliamos os resultados contando as colónias, em UFC/mL.

3.1.3.4 Análise da qualidade do ar

A análise da qualidade do ar é realizada pelo método de sedimentação e pelo método de impacto. Esta colheita é realizada pela equipa da Microbiologia em “pontos críticos” da empresa onde se exige que haja elevada qualidade do ar, como por exemplo as salas de produção e do scale-up onde são fabricados medicamentos. Todos estes pontos estão descritos em protocolos que tem de ser seguidos ao pormenor.

No método por sedimentação colocamos placas de CSA e SDA em pontos estratégicos das salas e deixamos por um determinado espaço de tempo para garantirmos que, eventuais microrganismos no ar tenham tido tempo de sedimentar. Depois de serem colocadas em incubação avaliamos os resultados por UFC/placa.

No Método por Impacto usamos o Reuter Centrifugal Sampler (RCS), onde se encaixam placas de CSA e SDA e este aparelho vai recolher um determinado volume de ar, que por impacto vai captar microrganismos que existam no ar. Quando o aparelho termina a colheita, estas placas são incubadas e posteriormente analisados os resultados por UFC/m³.

3.1.4 Higiene do Laboratório

O LM possui procedimentos específicos no que diz respeito à limpeza e desinfeção. É obrigatório o uso de bata bege exclusiva para utilização dentro do LM, juntamente com luvas e sapatos de laboratório.

Diariamente, as bancadas de trabalho são limpas e desinfetadas com álcool etílico a 70% pela analista que efetua o turno da noite e, que por isso fecha o laboratório. A área de trabalho das câmaras de fluxo laminar deve ser limpa e desinfetada com álcool etílico a 70% ou com desinfetante próprio para superfícies críticas, sempre que o equipamento seja utilizado, garantindo sempre a proteção do próximo analista.

Duas vezes por semana, o chão do laboratório deve ser limpo e desinfetado usando um detergente/desinfetante próprio para o efeito. Estes desinfetantes eram preparados pelas

analistas que utilizavam de forma rotativa dois desinfetantes diferentes para evitar resistências de eventuais microrganismos.

Mensalmente, os equipamentos, exterior de armários, janelas e portas devem ser limpos e desinfetados com álcool etílico a 70%, sendo realizada uma escala com todas as colaboradoras para distribuir as tarefas.

Trimestralmente, o interior de todos os armários, gavetas devem ser desinfetados com álcool a 70%.

3.2 Pontos Fracos (*Weaknesses*)

3.2.1 Preenchimento da documentação

A Bluepharma é uma empresa de renome, exatamente por se reger pelas boas práticas, neste caso de documentação. Sendo esta preocupada em garantir a segurança de todos os seus trabalhadores existem muitos procedimentos operacionais standarizados (SOP's) e boas práticas de fabrico (GMP's) que tem que ser seguidas.

Sempre que se realiza uma análise há a obrigatoriedade de registo do mesmo em LogBook's, documentos em que se explicita todo o procedimento, datando e assinando com a hora a que foi realizado para não haver possibilidade de adulteração.

Embora este processo confira fiabilidade e garanta a execução de todos os procedimentos exigidos, considero um processo moroso e que condiciona muito a agilidade e rapidez de trabalho do analista. Penso que seria uma mais-valia para toda a empresa conseguir transformar este processo manual em algo informatizado, mais automático que ofereça maior rentabilidade de trabalho e que acima de tudo, reduza a probabilidade de erros.

3.2.2 Métodos de análise

A maioria das análises realizadas no LM são qualitativas – TAMC e TYMC, não permitindo, na maioria das vezes fazer uma identificação fidedigna dos microrganismos que estamos a analisar, como acontece nos métodos por galeria API[®] Staph (Fig. 4). Estes métodos estão descritos na Ph. Eur e na USP, contudo, são métodos pouco automáticos e que exigem muito tempo ao analista. Começamos com a pesagem de 10g de amostra, procedemos à sua diluição em solução salina de peptona tamponada (NAPP) e posterior realização da sementeira com meio de crescimento.

Depois da sua incubação ocorre a repicagem para meio seletivo que permite a identificação de microrganismos, que podem estar presentes na amostra em análise. Pelo penoso

procedimento que nos é exigido penso ter sido um dos pontos menos positivos do meu estágio uma vez que não consegui contactar com meios mais atuais.

3.2.3 Variabilidade de Resultados

Nas reuniões *Kaizen* era-nos apresentado o plano semanal com as tarefas atribuídas a cada analista. Este plano, consistia numa rotatividade semanal entre as colaboradoras ao nível das tarefas. Por exemplo: Quem numa semana pesava as amostras não fazia as diluições, contudo, fazia as repicagens para os meios seletivos; na semana seguinte invertia-se o processo. Ou seja, uma só análise envolvia, se fosse necessário, o trabalho de 3 analistas, o que penso ser, em determinadas situações prejudicial pois dependiam da rapidez e planeamento da analista anterior.

Considero que poderá ser um fator de melhoria, centrar uma só análise num só analista, de forma a reduzir a variabilidade de respostas e eventuais erros.

3.3 Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1 Plano de formações

Ao longo do estágio na BLPH, tive a sorte de poder fazer parte de um extenso plano de formações que ocorriam semanalmente e, por vezes, diariamente. Tivemos diversas formações sobre os mais variados assuntos como: “Falhas Laboratoriais”, “Documentação analítica”, “*Holding times*”, “Segurança nos laboratórios”, “Melhoria contínua”, entre outras.

Para facilitar e agilizar o processo pudemos assistir às mesmas através do *Microsoft Teams*® uma plataforma que era usada por toda a empresa e que facilitava muito o contacto entre os vários departamentos. Contámos também com várias formações presenciais como a de “Boas práticas de pesagem” e de “Pipetas” que me conferiu maior segurança na execução das tarefas durante as análises. No final de algumas destas formações, contávamos com a realização de um questionário de avaliação para consolidar conhecimentos.

De modo geral, penso que este método de formação garante uma melhoria continua e uma constante adaptação, fomentando a evolução pessoal e, para mim, estagiária, permitiu-me reavivar conceitos e procedimentos já abordados ao longo do MICF.

3.3.2 Transposição entre setores do Controlo de Qualidade

Durante os 3 meses de estágio no LM tive a oportunidade de acompanhar alguns processos no LFQ assim como análises de rotina e Validações de Limpeza (VL).

Ter tido a possibilidade de passar pelo LFQ foi uma mais-valia para adquirir conhecimentos tanto práticos como teóricos sobre o funcionamento de outro laboratório.

Para além disso, tive a possibilidade de acompanhar diferentes processos como validações de limpeza, análise de águas, colheitas de amostras para análise, entre outros. Todos estes processos por serem realizados por diferentes profissionais conferiram-me a vantagem de poder beber de maior conhecimento por parte de todos. Tendo em conta a variabilidade de análises, tive ainda a possibilidade de contactar com algumas tecnologias analíticas como o HPLC abordadas no plano curricular de Métodos Instrumentais de Análise.

3.4 Ameaças (*Threats*)

3.4.1 Duração do estágio

O estágio curricular em indústria farmacêutica tem a duração de cerca de 3 meses. Decerto que, representa uma pequena parte de toda a minha aprendizagem, e sendo uma área que, para mim, é de extrema importância, deveria ser mais prolongado no tempo.

Devido à exigência que me foi inculcida e à grande parte do tempo em que estive apenas a observar as minhas colegas penso que possa ter limitado a minha autonomia, uma vez que quando pude realizar as análises de forma mais autónoma já estava no término do estágio.

Resumindo, penso que o estágio em IF deveria ser mais longo e, podia também, ser alvo de escolha por parte dos alunos.

3.4.2 Pouca preparação

Ao fim de cinco anos no MICF deparamo-nos com a possibilidade de integrar um estágio na área da IF.

Como já tinha acima referido, existem, efetivamente, pontos que foram abordados em unidades curriculares como a MIA, a Bacteriologia, a Microbiologia, contudo, considero que sendo uma área com tanta saída profissional e de tanto interesse por parte dos alunos que terminam este curso, devíamos ter esta vertente mais presente ao longo dos anos. Por exemplo: Nunca tivemos uma preparação para uma entrevista; nunca visitamos uma fábrica.

Sumariando, penso que a IF devia ser um tema mais notado ao longo deste percurso.

IV. Conclusão

A proximidade com o dia-a-dia do farmacêutico numa vertente diferente daquela que conhecemos promoveu o meu entendimento sobre o outro lado do ciclo do medicamento.

De um modo geral, as componentes teóricas e práticas constituíram pontos positivos na minha formação e, os conhecimentos que fui adquirindo ao longo dos últimos anos revelaram a forma exímia como a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra me preparou para toda a prática laboratorial tão importante neste meu percurso pelo LM.

Bluepharma, Indústria Farmacêutica, pautada pelo rigor, compreensão e excelência, que me acolheu e me concedeu formação e conhecimento: Hoje é recebido como mais-valia.

A equipa da Microbiologia, equipa de excelência, compreensiva, disponível e de qualidade, que me incutiu os conhecimentos e me forneceu as bases necessárias para que compreendesse e conseguisse realizar todas as atividades elaboradas.

Decerto, posso afirmar que, toda esta experiência não teria sido tão enriquecedora como gratificante se não fosse o espírito que a BLPH incute às pessoas que lá trabalham.

Concluo este estágio curricular orgulhosa e crente que cumpri o meu objetivo e que esta experiência foi impulsionadora de uma grande paixão. Estou grata a toda a equipa da Microbiologia.

V. Anexos



Figura. 1 | Câmara de Fluxo Laminar

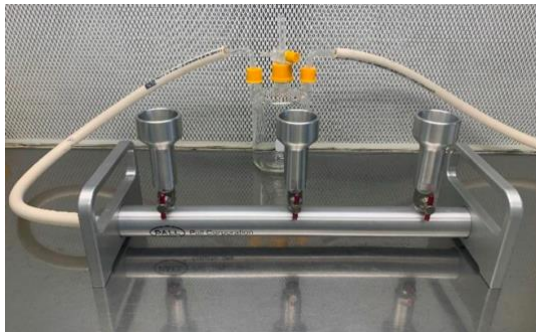


Figura. 2 | Rampa de Filtração



Figura. 3 | Distribuição de meio para realização de TAMC e TYMC

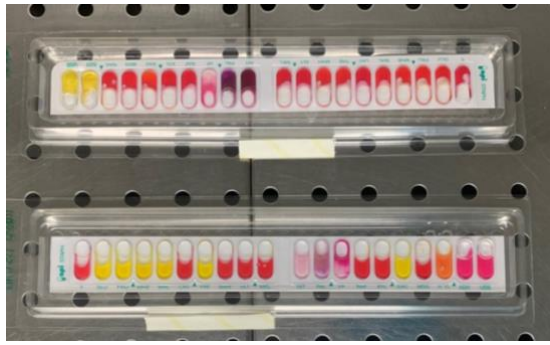


Figura. 4 | Galleria API[®] Staph

VI. Bibliografia

1. **Ordem dos Farmacêuticos - Indústria Farmacêutica** - [Consult. 15 mar. 2023]. Disponível em <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/industria-farmaceutica>
2. LEIGH, Doug - **SWOT Analysis**. Handbook of Improving Performance in the Workplace. 2010) 115–140.
3. **BLUEPHARMA - História** - [Consult. 12 mar. 2023]. Disponível em <https://www.bluepharmagroup.com/pt>
4. **BLUEPHARMA - Quem somos** - [Consult. 20 fev. 2023]. Disponível em <https://www.bluepharma.pt/about-us.php>
5. **BLUEPHARMA - CULTURA DE QUALIDADE** - [Consult. 20 abr. 2023]. Disponível em <https://www.bluepharma.pt/about-quality.php>
6. **BLUEPHARMA- Missão, Visão e Valores** - [Consult. 12 mar. 2023]. Disponível em <https://www.bluepharmagroup.com/pt/sobre-nos/empresa>
7. **BLUEPHARMA É A PRIMEIRA FARMACÊUTICA DO MUNDO A LANÇAR EMBALAGENS DE MEDICAMENTOS PARA DALTÓNICOS** - atual. 19 jan. 2021. [Consult. 12 mar. 2023]. Disponível em <https://www.bluepharmagenericos.pt/Noticia/257/bluepharma-e-a-primeira-farmaceutica-do-mundo-a-lancar-embalagens-de-medicamentos-para-daltonicos>
8. **USP - Chapter <62>** Microbiological Examination of Nonsteril Products: Tests for Specified Microorganisms. United States Pharmacopoeia 39 - National Formulary 34. - Disponível em <http://www.usppf.com/pf/pub/index.html>
9. **USP - Chapter <61>** Microbiological Examination of Nonsteril Products: Microbial Enumeration Tests. United States Pharmacopoeia 39 - National Formulary 34 - 2016. [s.d.].
10. **COUNCIL OF EUROPE - 2.6.12.** Examination of Non-Steril Products: Microbial Enumeration Tests. European Pharmacopoeia 10.3
11. **COUNCIL OF EUROPE - 2.6.13.** Examination of Non-Steril Products: Test for Specified Microorganisms. European Pharmacopoeia 20.3
12. **USP - Chapter <1231>** Water for Pharmaceutical Purposes. United States Pharmacopoeia 39 - National Formulary 34. Rockville: The United States Convention. - atual. 2016. [Consult. 15 jul. 2023]. Disponível em http://www.uspbpep.com/usp29/v29240/usp29nf24s0_c1231.html

TERCEIRA PARTE

MONOGRAFIA

“The use of anaerobic and facultative anaerobic bacteria in
the treatment of solid and metastatic cancer”

Orientada pela Professora Doutora Sara Domingues



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Resumo

Milhares de pessoas, em todo o mundo, vivem com diagnósticos de cancro, necessitando de pesquisas contínuas neste campo. O avanço na compreensão das causas tem levado à descoberta de novos métodos de detecção e tratamento.

Apesar dos progressos, o cancro continua a ser um problema de saúde global e uma das principais causas de morte. Para superar obstáculos começaram a ser utilizados organismos vivos, atenuados com capacidade de direcionar e destruir tumores que oferecem uma potencial solução uma vez que, nas terapêuticas convencionais o principal obstáculo é a entrega do princípio ativo.

Entre as abordagens recorrendo a microrganismos, *Salmonella entérica serovar Typhimurium* uma bactéria anaeróbica facultativa, e *Clostridium*, uma bactéria anaeróbica obrigatória, tem mostrado resultados promissores neste campo.

Salmonella Typhimurium, exibe habilidades inerentes de direcionamento a tumores e foi projetada para entregar cargas terapêuticas diretamente às células cancerígenas. Por outro lado, *Clostridium* prospera especificamente em regiões de hipóxia, em tumores sólidos, tornando-se uma potencial ferramenta para a terapia direcionada.

Estas bactérias, oferecem mecanismos de ação únicos e têm grande potencial para melhorar a eficácia dos tratamentos contra o cancro.

Este resumo destaca os esforços em andamento para aprimorar os tratamentos contra o cancro e enfatiza o potencial das abordagens baseadas na microbiota para enfrentar as limitações das terapias tradicionais.

Palavras-chave: Bactérias; *Salmonella Typhimurium*; *Clostridium*; Cancro; Tumores sólidos; Engenharia genética.

Abstract

Millions of people worldwide are living with a cancer diagnosis, needing continuous research in this field. Advances in understanding the causes have led to the discovery of new methods for detection and treatment.

Despite the advancements, cancer remains a significant global health problem and a leading cause of death. To overcome these obstacles, utilizing live, attenuated organisms capable of targeting and destroying tumors through mechanisms that offers a potential solution, once the key obstacle is the drug delivery.

Among the microbial-based approaches, *Salmonella Typhimurium*, a facultative anaerobic bacterium and *Clostridium*, an obligatory anaerobic bacterium have shown promising results in this field.

Salmonella Typhimurium exhibits inherent tumor-targeting abilities and has been engineered to deliver therapeutic cargo directly to cancer cells, *Clostridium*, on the other hand, thrives specifically in hypoxic regions of solid tumors, making it a potential tool for targeted therapy.

These bacteria offer unique mechanisms of action and hold great potential in improving the effectiveness of anti-cancer treatments.

This abstract highlights the ongoing efforts to enhance cancer treatments and underscores the potential of microbiota-based approaches to address the limitations of traditional therapies.

Keywords: Bacteria; *Salmonella Typhimurium*; *Clostridium*; Cancer; Solid tumor; Genetic engineering.

List of Abreviatures

- 5- FU - 5-fluorouracil
- BCG - Bacille Calmette-Guerin
- BMTT - Bacteria-mediated tumor therapy
- CDAT - Clostridium-directed Antibody Therapy
- ClyA - Cytolysin A
- DNA - Deoxyribonucleic acid
- FDA - Food and Drug Administration
- LPS - Lipopolysaccharide
- MTD - Maximum-tolerated dose
- NK cells - Natural Killer cells
- NMIBC - Non-muscle invasive bladder cancer
- NO - Nitric oxide
- PCE - Prodrug converting enzyme
- SPCC - Sociedade Portuguesa Contra o Cancro
- TME - Tumor microenvironment
- TNF-a - Tumor necrosis factor- α

I. Introduction

Currently, all over the world, millions of people are living with a cancer diagnosis. Even with the constant scientific evolution, this research is indisputably necessary, especially in an area like this.

Day after day, more is known about the causes and how it develops, and therefore new ways of detecting and treating cancer are also in constant discovery. Despite the advancement in cancer treatment and detection, it remained a significant health problem and one of the leading causes of death worldwide¹.

Cancer is the abnormal proliferation of cells: new cells are formed without the organism needing it and at the same time, can have some old and needing ones that divide uncontrollably, not ending their cell cycle. Cancer cells can move to other organs, through the lymphatic system or the bloodstream causing infection in any other organ. When metastasizes, the new tumor has the same type of abnormal cells as the primary one.

Chemotherapy is one of the main treatments for malignancies, but it often results in severe side effects for patients and has little effect in treating malignancies that have spread to other organs². Tumors have large intercapillarity and chaotic vasculature that prevent therapeutic molecules from reaching the tumor area. This physiology reduces the efficacy of the treatments once there are low concentrations of oxygen and glucose rising a quiescent cell that becomes unresponsive to chemotherapeutics³.

These inherent disadvantages of chemotherapy, which include the drug-resistant mechanism of cells caused by chemotherapy, have led scientists to focus on examining the potential use of microorganisms such as bacteria, viruses, and fungus and at the same time their compounds in the anti-cancer therapy¹.

Tumors can be of varied types, such as solid as breast cancer, and liquid/hematopoietic, like leukemia. Solid tumors are hypoxic, necrotic regions where sometimes the vasculature is nonexistent⁴, so the conventional methods are inapplicable or have a slight therapeutic response.

To circumvent this aspect, one possibility is to use live, attenuated organisms capable of reaching regions such as tumors and through the most varied mechanisms of action - Bacteria-mediated tumor therapy (BMTT)¹- destroy part or all of it.

II. History of bacterial anticancer therapy

This theme is not recent and dates to the nineteenth centuries when microbes began to be used for cancer therapy.

William Coley, the father of immune therapy found that patients with solid cancer were infected with streptococcus infection, and this showed a regression of the tumor. Because of that, he developed a concoction of cultures of *Streptococcus pyogenes* that unexpectedly treated determined types of cancer, such as neck cancer⁵ and *Clostridium histolyticum* to treat advanced cancers like metastatic ones, using proteolytic enzymes^{6;7}. In 1891, he injected streptococcal organisms into humans with solid cancer bone and sarcoma⁸ developing erysipela to stimulate the immune system^{4;9}.

He created a Coley's toxin that has been given to hundreds of people resulting in more than a quarter of a cure^{4;10}. Also, the success of Bacillus Calmette Guerin (BCG) against superficial bladder cancer¹¹, once again, brought attention to the treatment of tumors with bacteria¹².

It was realized that immunization with microorganisms was beneficial in the treatment of cancer since it led to the stimulation of the immune system to fight the disease¹⁰. This is attracting growing interest due to their great anti-cancer advantages compared with conventional therapies¹³.

Since then, several groups of scientists started to use different bacteria to test their antitumor activity in animal models and conclude that immunotherapy has revisited the use of microorganisms¹⁴. This approach seemed to be advantageous since most of the tumors are not vascularized enough for surgery, systemic treatments such as chemotherapy were not powerful enough to completely cure a patient, and radiotherapy where ionizing irradiations is going to be a problem, in the absence of oxygen, for its effectiveness^{1;15;16}.

Furthermore, the critical aspect of bacterial treatment is tumor localization. Once bacteria are only capable of colonizing the tumor microenvironment (TME) and not normal tissues, this approach reduces the toxicity associated with the cancer treatment (Figure 1)¹⁵.

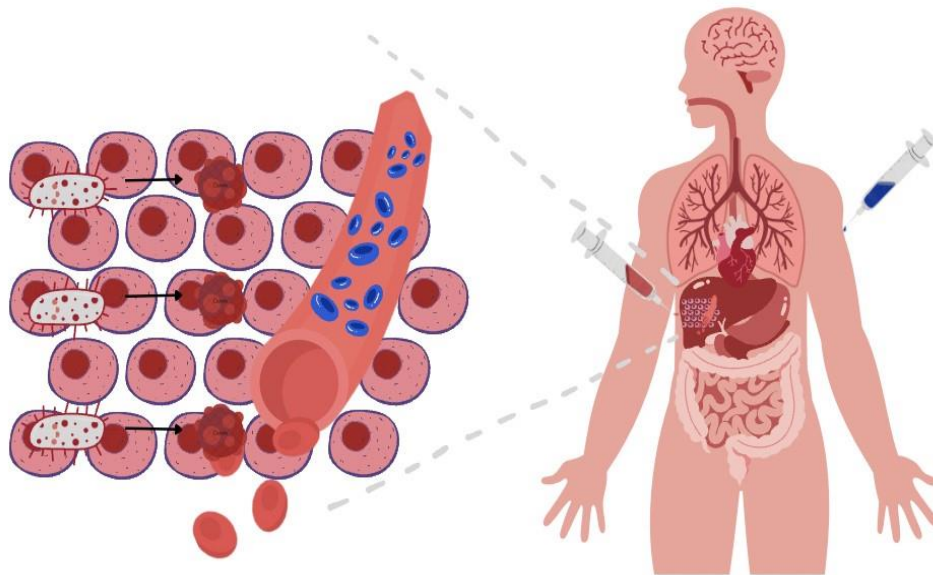


Figure 1 - Bacteriotherapy injection directly targets the tumor while chemotherapy systemic injection reaches every cell through circulation.

III. *Bacillus Calmette-Guerin*

In 1908, Albert Calmette and Camille Guérin started to use a strain of *Mycobacterium bovis* and tested it in many ways such as placing a strain saturated in glycerin and on bile on top of a potato slice¹⁷. After several attempts they made it attenuated, and in 1915 (Figure 2), administered to cows, for the first time.

After this, they began to carry out tests in pigs, and in 1921 (Figure 2) they were able to show that the strain they were using was no longer virulent and built a vaccine, the only licensed to prevent Tuberculosis (TB)^{1; 6; 10; 11; 14; 18; 19}.

Although used in TB, BCG is the only agent approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC), since 1970 (Fig.2)^{11; 18; 20}. The administration is done using a catheter through the urethral route and it is recommended that the patient endures for at least two hours without urinating¹¹.

After the injection the BCG is internalized by the urothelium and the dendritic cells and leads to the release of a giant number of cytokines and interleukins, such as IL-6.

Due to the successful application of BCG, the *M. bovis* strain has been used in the treatment of NMIBC, since 1969, which attracted widespread interest in the field of BMTT²¹:

^{22; 23; 24}.

It is known that this treatment with intravesical BCG has already had failures, like relapses after five years¹⁸ though several analyses have shown that adjuvant treatment with BCG

reduces recurrence, and BCG intolerants¹¹. The diagnosis can be done by cystoscopy, assessment of renal function, or computed tomography (CT)²⁵.

In 1990 World Health Organization declared it a world concern and in 2016 the primary treatment for NMIBC was approved by the European Association of Urologists:

Transurethral resection (Figure 2)^{25; 26}.

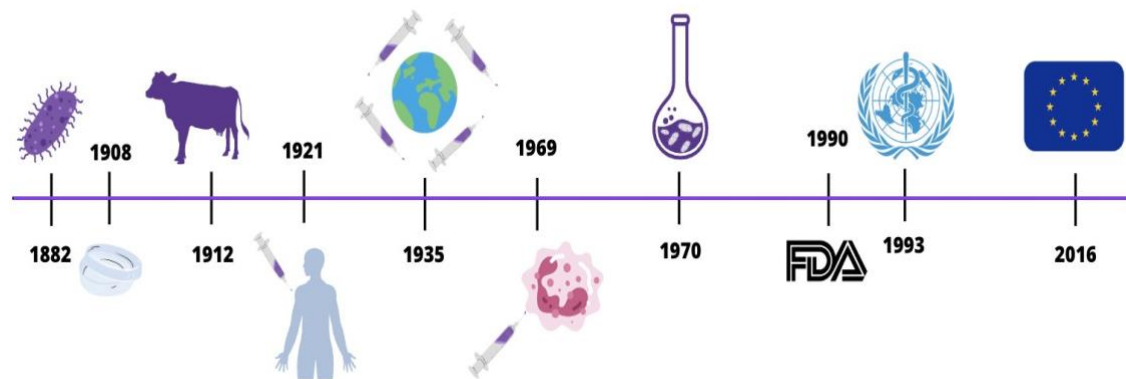


Figure 2 - The impact of BCG in science history

IV. The different bacteria and some beneficial applications

Bacteria are prokaryotes that may or may not produce their sustenance in various ways. The aerobic bacteria only survive in the presence of oxygen, the anaerobic only survive in the absence of oxygen, and the facultative anaerobic bacteria grow both in the presence and in the absence of oxygen.

Initially, introducing microorganisms into the human system immediately led to the activation of the immune system by recruiting cells such as neutrophils, macrophages, and natural killer cells (NK cells), among others. According to these bacteria can indirectly contribute to cancer regression. The main concern should be to guarantee the control of these microorganisms since the aim is to fight cancer and not to cause an infection through a (potential) pathogenic agent¹⁰. Therefore, a deprivation of pathogenicity or attenuation needs to be assured.

Nowadays, several experimental trials have been done, however, there is a question that needs to be answered, which is how the microorganisms should be treated to obtain a weaker microorganism without losing their interesting properties.

In this context, genetic engineering can be used to make genetic alterations. For example, *Clostridium novyi* can produce five different toxins, where the α -toxin can be inactivated in order to achieve less toxicity.

Oncolytic bacteria can treat cancer by acting directly on tumor destruction and/or stimulating the patient's immune system¹⁴.

Microorganisms with inherent or artificial advantages have been regarded as intelligent drug delivery systems for cancer therapy. In this way, these microorganisms can be used as vectors to transport antineoplastic agents, reducing some of the secondary effects that would occur in chemotherapy due to the non-selection of the cells to attack.

Their motility is a fact that gives them intratumoral targeting and the ability to drive away from the vasculature. Moreover, their possession of chemoreceptors that sense small molecules in the TME, such as aspartate, provides the possibility to initiate chemotaxis towards viable tumor tissue³.

Due to the numerous characteristics of bacteria, they can also be used in food industries, in genetic engineering, and in biotechnologies in the synthesis of various substances such as insulin and growth hormone, in the production of ethanol, vaccines, and antibiotics, and in the decomposition of dead organic material, for example.

V. Microorganisms used in cancer treatment

The discovery that some microorganisms cause diseases could also contribute to cure others was something revolutionary that aroused interest in the scientific community, for several years.

Some characteristics of these microorganisms made them unique and allowed their use in cancer treatment. *Clostridium* and *Salmonella enterica serovar Typhimurium* are two species of relevance in this topic since they are being increasingly studied, with promising results in this area⁹.

The main feature that these bacteria have in common is the ability to survive in the absence of oxygen, what makes them a promising agent to direct and penetrate necrotic tissues like solid cancers will be further discussed^{10; 15}.

5.1 Clostridium novyi

The genus Clostridia is a group of Gram-positive heterogeneous bacteria capable of forming spores that will grow solely and exclusively in the absence of oxygen¹⁵, being called obligate anaerobes¹⁰, and which have become one of the most promising agents in cancer treatment¹⁴.

The use of *Clostridium* directs the bacteria to the tumor with high specificity to the hypoxic/necrotic cores of the solid tumor because when it enters normal tissue is poisoned by oxygen and dies²⁷, which gives the science community safety about this microorganism.

5.1.1 Tumor targeting and destruction by *C. novyi-NT*

The non-specificity of the conventional therapies made *Clostridium* a remarkable agent to localize and only germinate in the hypoxic zone²⁸.

This gave *C. novyi-NT* the ability to modulate the TME, providing a strong rationale for the combination with other agents that target additional immune-suppressive mechanisms to optimize the therapeutic success^{15; 28; 29}.

Hypoxia is a well-established hallmark of cancer based on three main principles which are the total or partial absence of oxygen, the existence of necrosis, and insufficient blood perfusion³⁰.

These bacteria can mark tumors through hypoxia, which has been considered one of the best targets to explore in cancer treatment⁵. Once the spores are produced, they meet the hypoxic zone of the tumor, and they will germinate, inducing an extensive tumor regression by leading to profound tumor lysis. The specificity of these bacteria can be demonstrated by the non-dissemination to normal tissues, which are areas with high oxygen supply¹⁵.

Moreover, the systemic administration of spores has an interesting property, since they remain dormant until they reach hypoxic⁵ environments similar to those formed within the necrotic regions within tumors¹⁴ and manage to remain neutral around healthy cells, which is precisely the problem with chemotherapy: the inability to act only around or inside the tumor damaging the other cells.

5.1.2 Different approaches to application

When hypoxia occurs inside the tumor there is a trigger to transcript the genes responsible for cell survival.

The transcription of the hypoxia-inducible factor I- α (HIF-I α) is the key to regulate the tumor response^{30; 31; 32}, and as known the lack of oxygen is the main responsible for the resistance to chemotherapy and radiotherapy^{3; 30; 33}. This system is controlled by HIF-I α , and once it can control the expression of genes responsible for angiogenesis, it is considered the key to tumor growth³². Because of HIF-I α ability to allow tumor cells to survive, a possibility is to use *Clostridium*-directed Antibody Therapy (CDAT) to target the relevant HIF-induced genes of the TME^{3; 34}.

C. novyi has numerous traits that make it one of the chosen species for cancer treatment. The capacity to secrete exotoxins like phospholipases, and to produce spores that will be conducted to the tumor region once it is in a hypoxic zone allow it to damage tumor cells¹⁴.

With hypoxia, it is possible to induce the activation of macrophages and neutrophils, preventing the spread of bacteria into the surrounding tissues³ and at the same time increasing the expression of cytokines and chemokines towards the activation of the immune response³³;

³⁵.

5.1.2.1 Genetic modification of *Clostridium* spp.

With the advancement of Deoxyribonucleic acid (DNA) recombination technology in the last few decades the interest in using bacteria as anti-cancer agents has re-emerged.

5.1.2.1.1 *Clostridium* as a therapeutic agent

The first strain of *Clostridium* was isolated in 1947³⁶ and right after it was discovered that when injected the non-pathogenic strains of the obligate anaerobic bacterium *Clostridium* would produce spores that directly in contact with the tumor, would cause tumor lysis²⁸.

This led to the notion that perhaps spore treatment could be combined with other therapies, and throughout the past few years, some advances have been made in this area, and *Clostridium* spp. suffered some procedures such as the introduction of plasmid vectors by either transformation or conjugation³⁷.

Nowadays, there are strains of *Clostridium*, *C. novyi*, and *Clostridium sporogenes* with only one chain of specific antibodies against HIF-1 α - CDAT^{30; 31; 38}- that integrates the oncolytic capabilities of *Clostridium* with the targeting precision of antibody therapeutics, showing promise in directing its action towards the most resilient regions within human solid tumors³³.

The *C-novyi-NT* strain is able to express the variable domain of heavy-chain antibodies (VHH) against HIF-1 α , once VHH binds with HIF-1 α and inhibits its activity^{31; 33; 39}.

Nonetheless, the development of genetically modified strains that are adapted to the patient's situation can be highly rewarding and, therefore, bacteria can be considered as an essential tool¹⁵.

The *Clostridium novyi* (*C. novyi*, ATCC #19402) was identified as the most superior strain and subsequently rendered nonpathogenic by eliminating a residential phage carrying α -toxin, a major responsibility for toxicity⁴⁰.

The resulting clone, named *C. novyi-NT*, has been thoroughly investigated and it is currently undergoing clinical evaluation in a human phase I trial for patients with treatment refractory tumors¹⁵.

A wide variety of synergetic and xenograft-derived tumors (tested in experimental trials) in several animal species have been treated by intratumoral (IT) or intravenous (IV) administration of *C. novyi-NT* spores, including colon and pancreas cancer in mice, squamous cell carcinoma in rabbits, and glioblastomas in rats^{5;27}.

Once administered, the spores will germinate locally inside the tumors, causing hemorrhagic necrosis, tumor cell lysis, and tumor regression¹⁵.

One of the problems of systemic spore administration is the discrepancy between the need for a large injection spore dose and the relatively small fraction of spores that are delivered to the tumors, which can lead to a decrease in efficacy and potentially cause side effects^{15;41}.

5.1.2.1.2 *Clostridium* as a drug delivery system vector

The ideal situation would be the possibility to bring the therapeutic agents necessary for its destruction into the tumor, without thereby damaging the surrounding cells, however, this is something difficult to obtain due to the poor vascularization that surrounds the tumor area.

In any case, *Clostridium*, being an anaerobic, spore-forming bacterium, has the ability to colonize tumor tissue,^{10; 15} and for that reason, it is a possible vehicle for anti-tumor agents, enzymes, and to augment chemo and radiotherapy^{37;42}.

Clostridium can be genetically engineered to contain what is called a Prodrug converting enzyme (PCE) and this means that it can convert a pro-drug into a chemotherapeutic agent. Since the PCE is only expressed in the tumor region it gives the security that the conversion only occurs within the tumor⁴³, avoiding the common side effects of the systemic treatments, such as chemotherapy.

However, the *Clostridia* species have mannered significant challenges because they are not easily transformable to purchase conventional plasmid vectors because these procedures are very complex and can lead to different phenotypes that may interfere with the effectiveness of the treatment¹⁵.

After several studies, it was noticed that the effectiveness of the treatment with *C. novyi* alone is relatively rare, and therefore it can be combined with a large variety of chemotherapeutic agents and radiotherapy^{41; 44}. In any case, it should not be forgotten that whenever it is combined with some cytostatic agent, it will have toxicity associated with it¹⁵.

The *Clostridium*-based delivery system presents an alternative therapeutic modality to deliver anti-tumor agents specifically to the tumor site. This high selectivity offers a major advantage in comparison with the classical gene therapy systems⁴³.

This microorganism has been genetically engineered, for example, to contain cytosine deaminase⁴⁵, an enzyme from *Escherichia coli* that converts 5-fluorocytosine, a nontoxic drug, to 5-Fluorouracil (5-FU), a toxic one. And in the other hand, it was also modified to convert the innocuous CBI 1954 prodrug into its toxic derived, resorting to nitroreductase (NTR). The spore germination and the tumor colonization result in the increase of concentration of the toxic derivatives and consequently anti-tumor responses^{15; 37}.

5.1.2.1.2.1 *Clostridium sporogenes*

The anaerobic, Gram-positive *Clostridium sporogenes*, is an important and studied candidate to fight cancer for at least 50 years⁴⁶ and has been genetically engineered (NCIMB 10696) to become attenuated by the deletion of the Streptolysin L (SLS) operon. After this, scientists named the strain *C. sporogenes-NT*, a non-toxic one⁴⁶. Applying *C. sporogenes* to tumor therapy is extensively described.

It has been proven that this microorganism does not readily transfer DNA efficiently and shows a limited propensity for accepting or incorporating foreign DNA, but also highlights the properties regarding this topic³⁷.

The principle utilized method to deliver proteins has been the PCE and the insertion of a NTR has shown particular interest because of its size being so small that improves its expression. In this approach, the NTR is going to convert the 4-nitrogroup into the ten thousand times more toxic 4-hydroxylamine derivative³⁷.

This derivative can also, in turn, be metabolized to the origin DNA-DNA crosslinking and lead to the induction of apoptosis. The goal is to improve tumor colonization and for that to happen is important to make sure that there is enough conversion.

First, it is important to isolate the NTR enzymes, thus being able to analyze their toxicity and then construct the *Clostridia* expression vector. Finally, it is possible to carry out the conjugation step, shown in Figure 3.

In this context, it is possible to detect levels of NTR in the tumor, which proves the vector effect of *C. sporogenes*³⁷.

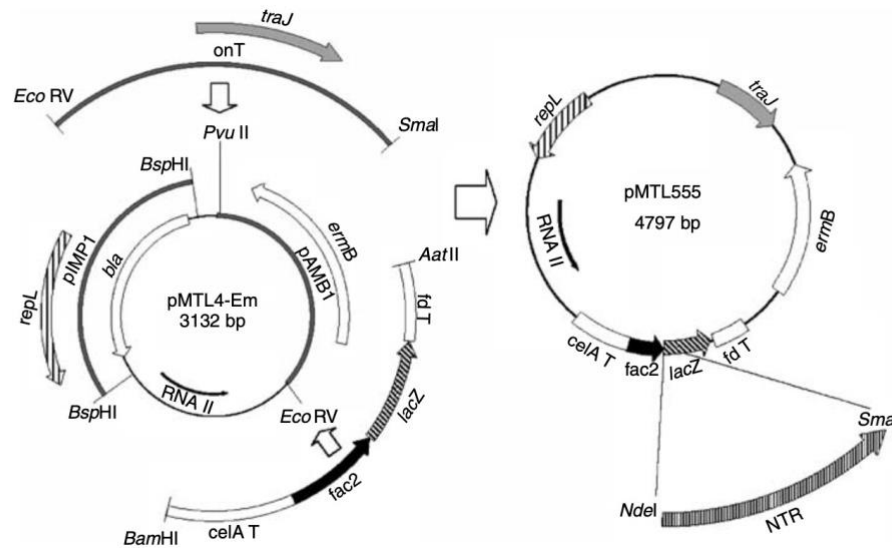


Figure 3- The genetically engineered plasmid of *Clostridium sporogenes* - insertion of an NTR in the plasmid³⁷.

C. sporogenes can be genetically engineered to deliver cytokines such as murine IL-2⁴⁶ and IL-12⁴⁷ to the hypoxic tumor. IL-2 is a toxic interleukin capable of activating the immune system but that was also approved to treat renal cell carcinoma and metastatic melanoma since it is a T cell potent activator⁴⁶.

Since all *Clostridia* are obligatory anaerobes, much research has been done about it and a virulent strain to be used as a vector was chosen, to deliver IL-12⁴⁸. The main effect of IL-12 was responsible for the regulation of the cell-immunity which occurs by cytotoxicity promoting the action of INF- γ and NK cells⁴⁸.

In terms of conclusion, it is important to know that antibiotics can control the spread of the infection if it is needed, and thus guarantee that in the event of a lack of control, it can be managed.

5.2 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Salmonella enterica serovar Typhimurium, an anaerobic facultative bacterium, can infiltrate and invade the tumor by being attracted to compounds generated by cancer cells⁴⁹ which can colonize either large or small tumors because of its capacity to survive with or without oxygen (10 to 30mmHg)^{12; 21; 49; 50}. In order to implement *Salmonella* as a vector it is essential to attenuate their pathogenicity by deleting specific genes^{21; 49}. Each clinical trial performed with *S. Typhimurium* achieved phase I⁵¹.

The attenuated auxotrophic strain AI-R of *Salmonella Typhimurium*, with a genetic mutation that renders it unable to synthesize or produce some amino acids on its own, can only replicate

in tumor sites and has shown results in mice cancer such as breast, pancreatic, and lung cancers because of its ability to suppress the tumor growth¹⁴ (Table I) and VNP20009 for metastatic melanoma^{3; 6; 52; 53}.

5.2.1 Development of *Salmonella* as a therapeutic agent

5.2.1.1 Tumor targeting capacity

Salmonella present in the circulatory system and other tissues is likely to be eliminated within hours or days. However, the ones that enter tumors will colonize and grow, and this ability to localize within the tumor is likely related to the unique immunosuppressive and biochemical environment^{12; 54}.

Regions with a lack of oxygen permit bacterial colonization of *Salmonella*, a facultative anaerobe. When in tumors *Salmonella* migrates from the vasculature to the necrotic zones⁵⁴ this is also partly due to the ability to sense TME - availability of nutrients in the necrotic zone⁴⁹.

Some research involving both anaerobe and facultative anaerobe microorganisms showed that the intravenously injected bacteria did not colonize in other non-tumor tissues with hypoxia or inflammatory lesions, indicating other potential mechanisms for their tumorhoming ability⁵⁵. In TME, chemotaxis is another potential mechanism, in response to a lack of nutrients, such as ribose and some aminoacids, explaining the preferential targeting of tumors by *Salmonella* since they are released from dying tumors^{52; 56}.

Further research suggests that responsive chemotactic receptors, such as aspartate, serine, and ribose/galactose receptors^{3; 57} can initiate chemotaxis, and penetration, and target *Salmonella* to zones of necrosis. In order to facilitate accumulation, the auxotrophic *Salmonella* strain relies on leucine and arginine obtained from deteriorating tumor tissue^{3; 12; 55; 58}.

Bacterial metabolism has also an important role in tumor colonization and *Salmonella* can induce large amounts of blood flow into tumor tissues¹⁶ and can have an important role in the immune system activation with the reduction of the macrophages, and with the deprivation of nutrients combined in tumor dead⁵². The flagellin and LPS are TLR agonists and will induce the innate and adaptative response against the tumor cells *Salmo*^{59; 60}. The capacity of *Salmonella* to reach and colonies is supported for being flagelatted⁴⁹.

Salmonella is essential for initial accumulation in tumors, where quiescent (not proliferating but metabolically active cells) and necrotic cells are crucial for their survival^{12; 21; 56}.

In conclusion, *Salmonella* is expected to further enhance the consistency, durability, and effectiveness of cancer immunotherapy¹².

5.2.1.2 Oncolytic activity

Salmonella kills tumor cells using its intrinsic oncolytic activity, just like viruses, however, the strains are attenuated by disabling genes associated with virulence, an important aspect that makes this therapy efficient.

It can use nutrients from tumor cells as well as produce or induce antitumor agents, leading to their apoptosis. Some structures of *Salmonella* can also have beneficial action as antitumors, as well as some products that it produces.

One example of structures is LPS, which can increase TNF- α and the tumor-specific response of CD8+ T cells which plays a major function in tumor regression⁴⁹. Whereas flagellin can reduce the number of regulatory T cells (Treg) in TME, and it can produce nitric oxide (NO), which will lead to tumor inhibition through the conversion of nitrate reductase to NO¹².

It has been shown that, by blocking *Salmonella*-induced autophagy, it is possible to improve its cytotoxicity and increase tumor cell apoptosis^{12; 16}.

Some studies also showed that LPS from *Salmonella* induces systemic or local production of massive TNF- α in leukocytes, which activates the recruitment of macrophages and neutrophils and will trigger inflammasome formation in myeloid macrophages, which activates the expression of some enzymes, and pro-inflammatory mediators to induce apoptosis of tumor cells¹².

Salmonella can create a pro-inflammatory environment, which has also shown beneficial results, unlike e.g., *E. coli*. Although *E. coli* accumulates at the tumor site, it cannot have the same inflammatory capacity as *Salmonella* and therefore does not show such promising results in this field¹². It can also be used as a vector to carry some genes capable of enhancing apoptotic cell death^{25; 49}.

Salmonella strain with a commercial name VXM01, defective in several genes, was used as a vector to deliver the oral DNA vaccine which was going to target the vascular endothelial growth factor receptor 2, as an antiangiogenic agent, leading to tumor regression^{14; 49}.

5.2.2 Genetically modified bacteria

In the past few years, many options have been considered to make bacteria oncolytic. *S. enterica* serovar Typhimurium is one of the most modified and studied *Salmonella* species and serovars and every clinical trial that has been done has achieved phase I⁵² in 2020 one clinical trial reached phase II²¹.

Some of the approaches went through the deletion and addition of genes and an example of that is the deletion of the *purl* gene that will create an auxotrophic mutant for adenine that bacteria can obtain from necrotic areas of the tumor, making its replication more tumor-specific, or the deletion of the *msbB* gene that is required for lipid A synthesis⁶¹, where its deletion reduces the lipopolysaccharide (LPS) toxicity⁴⁰.

The VNP20009 (Table 1) is an attenuated variant of *S. Typhimurium* resulting from deletions in both the *purl* and *msbB* genes that have already passed phase I trials because of its ability to block the angiogenesis process⁵² and caused a markedly diminished capacity to induce necrosis factor- α (TNF- α)⁵³. This strain has already progressed to phase I in clinical trials where effectively targeted a metastatic melanoma with a maximum-tolerated dose (MTD) of 3.0×10^8 cfu/m² ^{9; 21; 52}.

The 5'-diphosphate-3'-diphosphate ($\Delta ppGpp$) (Table 1) has defective guanosine²⁹, which results in an expression of a Cytolysin A (ClyA), a hemolytic protein that is produced by *S. Typhimurium*. This strain forms spores in mammalian cells and localizes the borders of the tumor in the middle of the viable and necrotic tissue, leading to apoptosis of the tumor, however not in a permanent way (1-10 days)^{3; 59}.

Attenuated *S. Typhimurium* SL3261 with *aroA* deletion is defective in the synthesis of aromatic amino acids, which leads to reduced proliferation in normal tissues along with increased tropism in tumor tissue⁶². Consequently, *Salmonella* strains with a deficiency in AroA are believed to display significant attenuation and have been considered a viable platform for vector systems^{63; 64}.

The AI-R strain is auxotrophic for leu and arg, requires an external source of them, and is less attenuated than VNP20009. The efficacy is due to the impossibility of mounting and continuous infection in normal and healthy tissues, which was first used to inhibit primary and metastatic tumors throughout monotherapy^{9; 65}.

It was named AI-R because the AI strain was able to be re-isolated by adhering to tumor cells and is also effective when administered intrasplenically, in pancreatic cancer liver metastasis ⁴⁰.

Overall, the utilization of these genetically engineered auxotrophic *Salmonella* strains, as outlined in Figure 4, resumed the process described in Fig. 4, which will enhance tumor accumulation and posterior destruction^{66; 67; 68}.

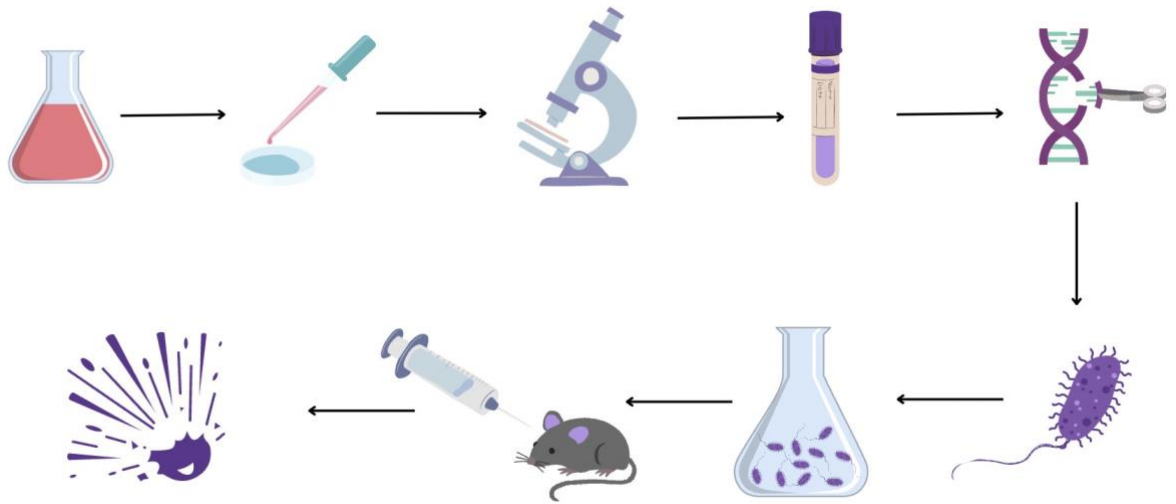


Figure 4 - Genetically engineered Salmonella procedure until tumor destruction

Table 1 - Examples of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains genetically engineered and respective effect

Strain	Gene alteration	Effect	References
VNP20009	-Deletion of <i>purI</i> -Deletion of <i>msbB</i>	-This deletion established a mutant for adenine that makes its replication more tumorspecific resulting in a decreased risk of septic shock. -Myristylation of Lipid A, which reduces LPS-related toxicity	3; 6; 14; 15; 21; 40; 62
SL7207	-Deletion of <i>aroA</i>	-Modifications in lipid A and flagella synthesis	9; 52; 62; 63; 69
AI-R	-Auxotrophic for leu and arg	-Suppression of tumor growth -Inhibited metastasis -Induces quiescent cancer cells into the cell cycle from G0/G1 to S/G2/M, increasing the sensitivity to chemotherapy -Nuclear destruction	14; 40; 52; 62; 70
SF200	-Deletion of <i>aroA</i> - $\Delta ipxR9, \Delta pagL7$ and $\Delta pagp8$	-Confer attenuation and increases the immunogenicity, because it affects the expression of <i>arnT</i> and <i>ansB</i> , involved in the escape of <i>Salmonella</i> -Immune stimulatory lipid A moiety	63; 64; 71
SL3261	1-Deletion of <i>aroA</i> 2-Accommodation of 4- <i>I</i> BBL 3-Expression of Tri-amino acid sequence of arginine-glycineaspartate (RGD peptide)	1-Decrease the proliferation in normal tissues and increases the tropism for tumor tissues, by blocking the aromatic synthesis 2-Efficiently enhance T-cell immune response and inhibit the growth of carcinogen-induced colorectal tumors in rats 3-Target and Kill xenograft tumor cells -Responsible for the cell adhesion to the extracellular matrix	21; 52; 62; 72; 73
$\Delta ppGpp$	$\Delta relA$ and $\Delta spoT$ -Expression of <i>lux</i>	-Express CytolysinA (ClyA) -Suppression of the tumor growth	29; 50
Saltikva	- Expression of IL-2	-Induces tumor suppression activates the cytolytic function of NK -Decreased angiogenesis -Increased necrosis in tumor tissues	3; 21; 44; 52; 74

The genetically modified *Salmonella* manage to serve as an optimal carrier for transporting various cytotoxic or immunogenic substances, nanoparticles, and other therapeutic drugs on their surfaces with highly tumor-specific targeting^{21; 75}. The combination of *Salmonella* with chemotherapeutic agents, such as 5-FU and cisplatin, has shown promising results. Enzymatic proteins can be expressed by *Salmonella typhimurium* and can convert prodrugs into anti-cancer drugs only in cancer tissues, which minimizes secondary effects, contrary to chemotherapy and radiotherapy⁵².

There has been a study related to the safe administration of *Salmonella* in dogs^{3; 14; 76} because the toxicity effects between them and humans are very similar, where was observed the incorporation of cytosine deaminase (CD), from *Escherichia coli* to convert the 5-fluorocytosine, an antifungal with restricted toxicity¹⁴ in 5-FU, a very common used drug in cancer treatment^{52; 77; 78}.

Through some techniques such as CT or magnetic resonance imaging (MRI) it was possible to follow the action of *Salmonella* in the conversion of 5-FU⁷⁹, and at the same time, it was observed the limitation of the tumor region⁷⁷.

Salmonella can also be used as a DNA vaccine vector, named as a bacteria-mediated delivery of cancer that is able to be genetically engineered to contain antigens and antibodies to fight cancer. This can suggest that *Salmonella* can deliver therapeutic genes and other molecules to malignant tissues.

VI. The advantages of bacteria over oncolytic viruses in cancer therapy

Bacteria and viruses have been explored as potential agents for cancer therapy, each with their own advantages and disadvantages⁸⁰.

As it is known there are several bacteria (e.g., *Helicobacter pylori*) and viruses (e.g., Human papillomavirus) capable of causing cancer. However, some of them can also be useful in the treatment of cancer^{80; 81; 82}.

Science history has already related some viruses to the genesis of cancer, such as the human papillomavirus with cervical cancer, and the hepatitis virus with liver cancer, among others. All these oncolytic viruses (OV) are capable of cancer occurrence⁸³.

Viruses are obligate intracellular microorganisms that need live cells to replicate and attack tumors¹, which can limit tumor targets once they are designed to infect only tumor cells but can also infect normal ones, leading to potential side effects.

Pre-existing immunity is also something to consider because several individuals may have pre-existing antibodies against certain OV, and this can reduce the effectiveness of the viral therapy⁸⁴.

Just like bacteria, safety concerns need to be considered because live viruses have inherent risks and there is always a possibility of viral replication and dissemination beyond the intended⁸⁰. The resistance problems with the antibiotics are similar to the ones used against OV because these mechanisms may involve alterations in receptors, intracellular pathways, or antiviral defense.

Due to their cellular tropism, OV are able to target tumors while sparing normal tissues, making them valuable in eradicating cancer^{1; 84; 85}. The preference of OV for infecting tumor cells is because of the physiological characteristics of the tumor itself, wherein cells evade the immune system but also resist apoptosis, similar to what occurs in viral infections.

Once the virus is inside the tumor some drugs can be administered to accelerate the process of tumor destruction.

The tumor-targeting capacity is something that can be more difficult to viruses when in a necrotic situation, which is improved in the case of bacteria once they can be genetically engineered, allowing the incorporation of therapeutic genes or modifications to have specific targets and persistently colonize tumors, leading to sustained therapeutic effects. They can penetrate and grow within the TME, which can enhance their therapeutic efficacy.

Many individuals may have pre-existing immunity or antibodies against specific viruses due to previous exposure or vaccination. This can reduce the efficacy of viral therapies and limit their applicability in some patients, otherwise, bacteria, being genetically modified won't have problems with previous immunity.

Another advantage bacteria have over viruses is the possibility of therapy combination such as bacteria and chemotherapy or radiotherapy that can complement and synergize improving treatment outcomes.^{80; 81}

Although some of the bacteria used in clinical trials, such as *Salmonella* spp., are facultative intracellular microorganisms, they can survive in the absence of cells and can replicate in anoxic or hypoxic conditions, on the contrary to viruses, that only survive in metabolic active cells, because sometimes retroviral vectors are used, and in hypoxia are less effective and can even take to inhibition of translation³⁷. In addition, some bacteria have motility that allows them to penetrate necrotic areas and use them as a source of nutrients¹⁴, something that doesn't occur with viruses⁸².

It is important to notice that both bacteria and viruses have their challenges and limitations in this area. The choice of using bacteria or viruses depends on various factors such as the type of cancer, desired therapeutic effect, and safety aspects.

VII. Disadvantages in the use of bacteria in the treatment of cancer

For the past few years, several clinical trials have been done and laboratory animals have been used to show that bacteria are, one of the most effective treatments to fight cancer; however, animals died because of the massive infections that it caused. The inability to control the infection and all the issues it entails makes the use of the bacteria very limited. The balance between the effect and the attenuation of the bacteria is a challenge that needs to be faced.

Targeting tumors with bacteria can be challenging because even some of the strains can definitely have the ability to target tumors, others can interact with surrounding cells and healthy tissues damaging them, with their side effects. The immune system can detect them and develop a response that can neutralize or completely eliminate the therapeutic bacteria before they can reach and act in the tumor³.

Undoubtedly, the development of resistance is a possible situation that will impact the long-term effectiveness of BMTT. The resistance of antibiotics can limit the therapeutic because they are a limited part of this research, since if for any reason occurs an infection or lack of control of the therapy, it is the antibiotics that we resort to.

Another disadvantage is the limited use of microbial preparations we have on our hands to work with since the majority of the studies are about anaerobic and facultative anaerobic bacteria, on the other hand, there are hundreds of diseases compared to very few bacteria that can be used. The genetic engineer is also a fragile subject once strictly anaerobic bacteria, the Gram-positive strains sometimes are pathogenic and hard to manipulate to only colonize the large tumors⁶.

Bacteria can have a negative impact due to chemotherapy once it can metabolize the drugs, affect their structure and their action mechanism, it can interfere with the TME, and modulate the local concentration of the drug, all these combined in less effective treatment, making scientists think that some bacteria may be responsible for drug resistance⁸³.

VIII. Conclusion and future perspectives

In the future, the utilization of bacteria in cancer treatment holds tremendous promise and potential. Ongoing research and advancements in the field of microbial-based therapies are paving the way for innovative approaches to combat cancer.

One prospective avenue lies in the further development of BMTT. Scientists are actively exploring the engineering and modification of bacteria to enhance their tumor targeting abilities while minimizing potential side effects.

Additionally, the combination of bacteria-based therapies with other treatment modalities, such as chemotherapy or immunotherapy could revolutionize cancer treatment strategies. The synergy between bacteria and conventional therapies might lead to improved outcomes, including enhanced tumor regression, reduced drug resistance, and decreased toxicity.

It is only a matter of time before several more bacteria start to be manipulated to become used as therapy for cancer.

New technologies such as nanoparticles have attracted interest, nanoliposomes, nanosize carriers, can deliver the drug inside the tumor. However, these are not perfect because the majority do not reach inside the tumor. If the area of the tumor could be limited, the adverse effects would be reduced^{10; 86}.

Bacteriophages, as a natural nanomaterial, are gradually gaining attention due to the advantages of being able to be mass-produced and their excellent modifiability and have shown great potential in the fields. Phages have demonstrated great clinical potential in the diagnosis and treatment of cancer because phages can be selected for target cells, which is safer than traditional drug treatments, and phage therapy is less expensive than many other cancer therapies^{2; 87}.

The oncolytic viruses have shown potential in cancer therapy, however, have some disadvantages such as the genetic instability that may undergo genetic mutations during the replication process leading to reduced potency and unpredictable behavior. Nevertheless, is essential to keep in mind that medical research is in constant evolving, numerous clinical trials have been conducted to attest the safety and efficacy of different oncolytic viruses and regularly, new discoveries are made about the feasibility of using viruses as a viable cancer treatment option⁸⁴.

These treatments could offer personalized approaches that harness the power of bacteria to selectively destroy tumors, overcome treatment resistance and minimize adverse effects. Continued research and clinical trials will be crucial in translating these future perspectives into tangible advancements in cancer treatment.

In terms of conclusion, the use of bacteria presents an exciting frontier in the fight against this devastating disease and the technology progresses holds great promise for revolutionizing cancer treatment, offering people new hope for patients worldwide.

IX. Bibliografia

1. SONG, Shiyu; VUAI, Miza S.; ZHONG, Mintao - The role of bacteria in cancer therapy - Enemies in the past, but allies at present. **Infectious Agents and Cancer**. ISSN 17509378. 13:1 (2018). doi: 10.1186/s13027-018-0180-y.
2. SHEN, Yuanzhao *et al.* - Modified bacteriophage for tumor detection and targeted therapy. **Nanomaterials**. ISSN 20794991. 13:4 (2023). doi: 10.3390/nano13040665.
3. FORBES, Neil S. - Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**. ISSN 1474175X. 10:11 (2010) 785–794. doi: 10.1038/nrc2934.
4. MCCARTHY, Edward - The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. **Iowa Orthopedic Journal**. 2006) 154–158.
5. WILSON, William R.; HAY, Michael P. - Targeting hypoxia in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**. ISSN 1474175X. 11:6 (2011) 393–410. doi: 10.1038/nrc3064.
6. WEI, Ming Q. *et al.* - Bacterial targeted tumour therapy-dawn of a new era. **Cancer Letters**. ISSN 03043835. 259:1 (2008) 16–27. doi: 10.1016/j.canlet.2007.10.034.
7. JIANG, Tongmeng *et al.* - Emulating interactions between microorganisms and tumor microenvironment to develop cancer theranostics. **Theranostics**. ISSN 18387640. 12:6 (2022) 2833–2859. doi: 10.7150/thno.70719.
8. COLEY, William B. - The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the bacillus prodigiosus). **Journal of The Royal Society of Medicine**. 1909) 1–48.
9. YU, Bin *et al.* - Explicit hypoxia targeting with tumor suppression by creating an «obligate» anaerobic *Salmonella Typhimurium* strain. **Scientific Reports**. ISSN 20452322. 2:2012). doi: 10.1038/srep00436.
10. ŁUKASIEWICZ, Klaudia; FOL, Marek - Microorganisms in the treatment of cancer: advantages and limitations. **Journal of Immunology Research**. ISSN 23147156. 2018:2018). doi: 10.1155/2018/2397808.
11. PACKIAM, Vignesh T.; JOHNSON, Scott C.; STEINBERG, Gary D. - Non-muscle-invasive bladder cancer: Intravesical treatments beyond bacille calmette-guérin. **Cancer**. ISSN 10970142. 123:3 (2017) 390–400. doi: 10.1002/cncr.30392.
12. WANG, Ding *et al.* - Perspectives on oncolytic *Salmonella* in cancer immunotherapy—A promising strategy. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 12:2021). doi: 10.3389/fimmu.2021.615930.

13. HUANG, Xin *et al.* - Engineered microorganism-based delivery systems for targeted cancer therapy: a narrative review. **Biomaterials Translation**. **2022**). doi: 10.12336/biomatertransl.2022.03.004.
14. RIUS-ROCABERT, Sergio *et al.* - Oncolytic bacteria: past, present and future. **FEMS Microbiology Letters**. ISSN 15746968. 366:12 (2019). doi: 10.1093/femsle/fnz136.
15. STAEDTKE, Verena *et al.* - *Clostridium novyi*-NT in cancer therapy. **Genes and Diseases**. ISSN 23523042. 3:2 (2016) 144–152. doi: 10.1016/j.gendis.2016.01.003.
16. LESCHNER, Sara *et al.* - Tumor invasion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is accompanied by strong hemorrhage promoted by TNF- α . **PLoS ONE**. ISSN 19326203. 4:8 (2009). doi: 10.1371/journal.pone.0006692.
17. SETIABUDIAWAN, Todia P. *et al.* - Protection against tuberculosis by Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination: A historical perspective. **Med**. ISSN 26666340. 3:1 (2022) 6–24. doi: 10.1016/j.medj.2021.11.006.
18. RHIJN, Bas W. G. VAN *et al.* - Recurrence and progression of disease in non-muscle-invasive bladder cancer: from epidemiology to treatment strategy. **European Urology**. ISSN 03022838. 56:3 (2009) 430–442. doi: 10.1016/j.eururo.2009.06.028.
19. HAN, Jiansong *et al.* - Mechanisms of BCG in the treatment of bladder cancer-current understanding and the prospect. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. ISSN 19506007. 129:2020). doi: 10.1016/j.biopha.2020.110393.
20. YAGHOUBI, Atieh *et al.* - Bacteriotherapy in breast cancer. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067. 20:23 (2019). doi: 10.3390/ijms20235880.
21. CHEN, Wenfei *et al.* - Advances in *Salmonella typhimurium*-based drug delivery system for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 18728294. **185:2022**). doi: 10.1016/j.addr.2022.114295.
22. DONALD, Lamm *et al.* - Randomized clinical trial of intravesical doxorubicin and immunotherapy with bacille calmette-guérin for transitional-cell carcinoma of the bladder. **The New England Journal of Medicine**. **1991**). doi: 10.1056/NEJM199110243251703.
23. JACKSON, A. M. *et al.* - Changes in urinary cytokines and soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in bladder cancer patients after Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy. **Clin Exp Immunol**. **99:1995**) 369–375. doi: 10.1111/j.1365-2249.1995.tb05560.x.
24. KAWAI, Koji *et al.* - Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: Current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. **Cancer Science**. ISSN 13479032. 104:1 (2013) 22–27. doi: 10.1111/cas.12075.

25. DEGEORGE, Katharine C.; HOLT, Harry R.; HODGES, Stephanie C. - Bladder cancer: diagnosis and treatment. **American Family Physician**. 96:8 (2017) 507–514. doi: 29094888.
26. CHOU, Roger *et al.* - Intravesical therapy for the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Urology**. ISSN 15273792. 197:5 (2017) 1189–1199. doi: 10.1016/j.juro.2016.12.090.
27. HEAP, John T. *et al.* - Spores of *Clostridium* engineered for clinical efficacy and safety cause regression and cure of tumors in vivo. **Oncotarget**. 5:7 (2014). doi: 10.18632/oncotarget.1761.
28. MINTON, Nigel P. *et al.* - Chemotherapeutic tumour targeting using clostridial spores. **FEMS Microbiology Reviews**. 17:3 (1995) 357–364. doi: 10.1111/j.1574-6976.1995.tb00219.x.
29. JIANG, Sheng Nan *et al.* - Engineering of bacteria for the visualization of targeted delivery of a cytolytic anticancer agent. **Molecular Therapy**. ISSN 15250024. 21:11 (2013) 1985–1995. doi: 10.1038/mt.2013.183.
30. GROOT, Arjan J. *et al.* - Functional antibodies produced by oncolytic clostridia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. ISSN 0006291X. 364:4 (2007) 985–989. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.10.126.
31. GROOT, Arjan J. *et al.* - Identification by phage display of single-domain antibody fragments specific for the ODD domain in hypoxia-inducible factor 1 α . **Laboratory Investigation**. ISSN 00236837. 86:4 (2006) 345–356. doi: 10.1038/labinvest.3700395.
32. GREGG L. SEMENZA - Minireview HIF-1, O₂, and the 3 PHDs: How animal cells signal hypoxia to the nucleus transduced to the nucleus in the form of increased HIF-1 transcriptional activity. How does O₂ regulate HIF-1 expression? **Cell Press**. 107:2001) 1–3. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00518-9.
33. POUYSSÉGUR, Jacques; DAYAN, Frederic; M.MAZURE, Nathalie - Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. **Nature**. 441:2006). doi: 10.1038/nature04871.
34. SEMENZA, Gregg L. - Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**. ISSN 1474175X. 3:10 (2003) 721–732. doi: 10.1038/nrc1187.
35. DANG, Long H. *et al.* - Targeting vascular and avascular compartments of tumors with C. novyi-NT and anti-microtubule agents. **Cancer Biology and Therapy**. ISSN 15558576. 3:3 (2004) 326–337. doi: 10.4161/cbt.3.3.704.
36. MAZUET, Christelle *et al.* - Diversity of group I and II *Clostridium botulinum* strains from France including recently identified subtypes. **Genome Biology and Evolution**. ISSN 17596653. 8:6 (2016) 1643–1660. doi: 10.1093/gbe/evw101.

37. THEYS, J. *et al.* - Repeated cycles of *Clostridium*-directed enzyme prodrug therapy result in sustained antitumour effects in vivo. **British Journal of Cancer**. ISSN 00070920. 95:9 (2006) 1212–1219. doi: 10.1038/sj.bjc.6603367.
38. SWOFFORD, Charles A.; DESSEL, Nele VAN; FORBES, Neil S. - Quorum-sensing *Salmonella* selectively trigger protein expression within tumors. **PNAS**. ISSN 10916490. 112:11 (2015) 3457–3462. doi: 10.1073/pnas.1414558112.
39. POTHIN, Elodie; LESUISSE, Dominique; LAFAYE, Pierre - Brain delivery of single-domain antibodies: A focus on VHH and VNAR. **Pharmaceutics**. ISSN 19994923. 12:10 (2020) 1–16. doi: 10.3390/pharmaceutics12100937.
40. HOFFMAN, Robert M. - Tumor-targeting amino acid auxotrophic *Salmonella* Typhimurium. **Amino Acids**. ISSN 09394451. 37:3 (2009) 509–521. doi: 10.1007/s00726-009-0261-8.
41. BETTEGOWDA, Chetan *et al.* - Overcoming the hypoxic barrier to radiation therapy with anaerobic bacteria. **PNAS**. Baltimore. **100:2003**). doi: 10.1073/pnas.2036598100.
42. DANG, Long H. *et al.* - Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. **PNAS**. **2001**) 15155–15160. doi: 10.1073/pnas.251543698.
43. THEYS, Jan; LAMBIN, Philippe - *Clostridium* to treat cancer: Dream or reality? **Annals of Translational Medicine**. ISSN 23055847. **3:2015**). doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.39.
44. MIYAKE, Kentaro *et al.* - Tumor-targeting *Salmonella* Typhimurium AI-R suppressed an imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor with c-kit exon 11 and 17 mutations. **Heliyon**. 4:6 (2018). doi: 10.1016/j.heliyon.2018.
45. THEYS, Jan *et al.* - Specific targeting of cytosine deaminase to solid tumors by engineered *Clostridium acetobutylicum*. **Cancer Gene Therapy**. **2001**) 294–297. doi: 10.1038/sj.cgt.7700303.
46. KUBIAK, Aleksandra M. *et al.* - Efficient Secretion of Murine IL-2 From an Attenuated strain of *Clostridium sporogenes*, a novel delivery vehicle for cancer immunotherapy. **Frontiers in Microbiology**. ISSN 1664302X. **12:2021**). doi: 10.3389/fmicb.2021.669488.
47. ZHANG, Y. L. *et al.* - *Clostridium sporogenes* delivers interleukin-12 to hypoxic tumours, producing antitumour activity without significant toxicity. **Letters in Applied Microbiology**. ISSN 1472765X. 59:6 (2014) 580–586. doi: 10.1111/lam.12322.
48. LI, Dan *et al.* - Interleukin-12 gene modification exerts anti-tumor effects on murine mammary sarcoma cell line in vivo. **Cellular & Molecular Immunology 225 Article**. 5:3 (2008) 225–230. doi: 10.1038/cmi.2008.28.

49. PANGILINAN, Christian Ronquillo; LEE, Che Hsin - *Salmonella*-based targeted cancer therapy: Updates on a promising and innovative tumor immunotherapeutic strategy. **Biomedicines**. ISSN 22279059. 7:2 (2019). doi: 10.3390/biomedicines7020036.
50. NGUYEN, Vu H. *et al.* - Genetically engineered *Salmonella* Typhimurium as an imageable therapeutic probe for cancer. **Cancer Research**. ISSN 00085472. 70:1 (2010) 18–23. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3453.
51. TOSO, John F. *et al.* - Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella* Typhimurium to patients with metastatic melanoma NIH public access. **Journal of Clinical Oncology**. 20:1 (2002) 142–152. doi: 10.1200/JCO.2002.20.1.142.
52. ZHENG, Jin Hai; MIN, Jung-Joon - Targeted cancer therapy using engineered *Salmonella* Typhimurium. **Chonnam Medical Journal**. ISSN 2233-7385. 52:3 (2016) 173. doi: 10.4068/cmj.2016.52.3.173.
53. CLAIRMONT, Caroline. *et al.* - Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of *Salmonella* Typhimurium. **The Journal of Infectious Diseases**. 181:6 (1996) 1996–2002. doi: 10.1086/315497.
54. GANAI, Sabha. *et al.* - In tumors *Salmonella* migrate away from vasculature toward the transition zone and induce apoptosis. **Cancer Gene Therapy**. ISSN 09291903. 18:7 (2011) 457–466. doi: 10.1038/cgt.2011.10.
55. ROSENBERG, Steven A.; SPIESS, Paul J.; KLEINER, David E. - Antitumor effects in mice of the intravenous injection of attenuated *Salmonella* Typhimurium. **HHS Public Access**. 2002) 218–225. doi: 10.1097/01.CJL.0000014623.45316.93.
56. STRITZKER, Jochen *et al.* - Enterobacterial tumor colonization in mice depends on bacterial metabolism and macrophages but is independent of chemotaxis and motility. **International Journal of Medical Microbiology**. ISSN 14384221. 300:7 (2010) 449–456. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.02.004.
57. CHEN, Jianxiang *et al.* - *Salmonella*-mediated tumor-targeting TRAIL gene therapy significantly suppresses melanoma growth in mouse model. **Cancer Science**. ISSN 13479032. 103:2 (2012) 325–333. doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02147.x.
58. KASINSKAS, Rachel W.; FORBES, Neil S. - *Salmonella* Typhimurium lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis. **Cancer Research**. ISSN 00085472. 67:7 (2007) 3201–3209. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2618.
59. KIM, Jung Eun *et al.* - *Salmonella* Typhimurium suppresses tumor growth via the pro-inflammatory cytokine interleukin-1 β . **Theranostics**. ISSN 18387640. 5:12 (2015) 1328–1342. doi: 10.7150/thno.11432.

60. PHAN, Thuy Xuan *et al.* - Activation of inflammasome by attenuated *Salmonella* Typhimurium in bacteria-mediated cancer therapy. **Microbiology and Immunology**. ISSN 13480421. 59:11 (2015) 664–675. doi: 10.1111/1348-0421.12333.
61. POUYSSEGUR, Jacques; DAYAN, Frederic; M.MAZURE, Nathalie - A lethal role for lipid A in *Salmonella* infections. **Molecular Microbiology**. ISSN 0950382X. 29:2 (1998) 571–579. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00952.x.
62. CHEN, Yu *et al.* - Genetically engineered oncolytic bacteria as drug delivery systems for targeted cancer theranostics. **Acta Biomaterialia**. ISSN 18787568. 124:2021) 72–87. doi: 10.1016/j.actbio.2021.02.006.
63. FELGNER, Sebastian *et al.* - Engineered *Salmonella enterica* serovar Typhimurium overcomes limitations of anti-bacterial immunity in bacteria-mediated tumor therapy. **OncolImmunology**. ISSN 2162402X. 7:2 (2018). doi: 10.1080/2162402X.2017.1382791.
64. HOISETH, Susan K.; STOCKER, B. A. D. - *aroA*-Deficient *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is more than a metabolically attenuated mutant. **Nature**. ISSN 00280836. 291:5812 (1981) 238–239. doi: 10.1038/291238a0.
65. HOFFMAN, Robert M.; ZHAO, Ming - Methods for the development of tumor-targeting bacteria. **Expert Opinion on Drug Discovery**. ISSN 1746045X. 9:7 (2014) 741–750. doi: 10.1517/17460441.2014.916270.
66. ZHAO, Ming *et al.* - Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing *Salmonella* Typhimurium. **PNAS**. 2004) 755–760. doi: 10.1073/pnas.0408422102.
67. ZHAO, Ming *et al.* - Targeted therapy with a *Salmonella* Typhimurium leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice. **Cancer Research**. ISSN 00085472. 66:15 (2006) 7647–7652. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0716.
68. WANG, YUXUAN *et al.* - Systemic administration of attenuated *Salmonella* Typhimurium in combination with interleukin-21 for cancer therapy. **Molecular and Clinical Oncology**. ISSN 2049-9450. 1:3 (2013) 461–465. doi: 10.3892/mco.2013.90.
69. BERGER, Elisa *et al.* - *Salmonella* SL7207 application is the most effective DNA vaccine delivery method for successful tumor eradication in a murine model for neuroblastoma. **Cancer Letters**. ISSN 03043835. 331:2 (2013) 167–173. doi: 10.1016/j.canlet.2012.12.026.
70. HOFFMAN, Robert M.; ZHAO, Ming - Methods for tumor targeting with *Salmonella* Typhimurium AI-R. **Methods in Molecular Biology**. ISSN 10643745. 1409:2016) 143–164. doi: 10.1007/978-1-4939-3515-4_13.

71. NEEDHAM, Brittany D. *et al.* - Modulating the innate immune response by combinatorial engineering of endotoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ISSN 00278424. 110:4 (2013) 1464–1469. doi: 10.1073/pnas.1218080110.
72. QIAN, Ben Jiang *et al.* - MTDH/AEG-I-based DNA vaccine suppresses lung metastasis and enhances chemosensitivity to doxorubicin in breast cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**. ISSN 03407004. 60:6 (2011) 883–893. doi: 10.1007/s00262-011-0997-3.
73. BELLIS, Susan L. - Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. **Biomaterials**. ISSN 01429612. 32:18 (2011) 4205–4210. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.02.029.
74. GNIADEK, Thomas J. *et al.* - A Phase I, dose escalation, single dose trial of oral attenuated *Salmonella* Typhimurium containing human IL-2 in patients with metastatic gastrointestinal cancers. **Journal of Immunotherapy**. **2020**) 217–221. doi: 10.1097/CJI.0000000000000325.
75. BROADWAY, Katherine M.; SCHARF, Birgit E. - *Salmonella* Typhimurium as an anticancer therapy: Recent advances and perspectives. **Current Clinical Microbiology Reports**. ISSN 21965471. 6:4 (2019) 225–239. doi: 10.1007/s40588-019-00132-5.
76. FRITZ, Sara E. *et al.* - A phase I clinical study to evaluate safety of orally administered, genetically engineered *Salmonella enterica* serovar Typhimurium for canine osteosarcoma. **Veterinary Medicine and Science**. ISSN 20531095. 2:3 (2016) 179–190. doi: 10.1002/vms3.32.
77. ROBERTS, Nicholas J. *et al.* - Intratumoral injection of *Clostridium novyi*-NT spores induces antitumor responses. **Science Translational Medicine**. ISSN 19466242. 6:249 (2014). doi: 10.1126/scitranslmed.3008982.
78. WISKOTT-ALDRICH, A. J.; PAOLONI, Melissa; KHANNA, Chand - Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.** **281:2006**) 613–621. doi: 10.1038/nrc2273.
79. DRESSELAERS, T. *et al.* - Non-invasive 19F MR spectroscopy of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil conversion by recombinant *Salmonella* in tumours. **British Journal of Cancer**. ISSN 00070920. 89:9 (2003) 1796–1801. doi: 10.1038/sj.bjc.6601345.
80. AURELIAN, Laure - Oncolytic virotherapy: the questions and the promise. **Oncolytic Virotherapy**. **2013**) 19. doi: 10.2147/ov.s39609.
81. ZELLA, Davide; GALLO, Robert C. - Viruses and bacteria associated with cancer: An overview. **Viruses**. ISSN 19994915. 13:6 (2021). doi: 10.3390/v13061039.
82. CRONIN, Michelle *et al.* - Bacterial-mediated knockdown of tumor resistance to an oncolytic virus enhances therapy. **Molecular Therapy**. ISSN 15250024. 22:6 (2014) 1188–1197. doi: 10.1038/mt.2014.23.

83. LU, Si Yuan *et al.* - Microorganisms in chemotherapy for pancreatic cancer: An overview of current research and future directions. **International Journal of Biological Sciences**. ISSN 14492288. 17:10 (2021) 2666–2682. doi: 10.7150/ijbs.59117.
84. TERRÍVEL, Maria; GROMICHO, Catarina; MATOS, Ana Miguel - Oncolytic viruses: what to expect from their use in cancer treatment. **Microbiology and Immunology**. ISSN 13480421. 64:7 (2020) 477–492. doi: 10.1111/1348-0421.12753.
85. RUSSELL, Stephen J.; PENG, Kah Whye; BELL, John C. - Oncolytic virotherapy. **Nature Biotechnology**. ISSN 10870156. 30:7 (2012) 658–670. doi: 10.1038/nbt.2287.
86. MORENO, Víctor M.; BAEZA, Alejandro - Bacteria as Nanoparticle Carriers for Immunotherapy in Oncology. ISSN 19994923. 14:4 (2022) 784. doi: 10.3390/pharmaceuticals14040784
87. LI, Xiangqian *et al.* - Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. **Journal of Nanomaterials**. ISSN 16874110. **2011:2011**). doi: 10.1155/2011/270974.