



Licenciatura en  
Biología Humana



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY

# **Dacarbazina combinada con *Salmonella* para el tratamiento de melanoma**

Informe de Pasantía  
Licenciatura en Biología Humana

2018

Sofía Chilibroste Vera

Orientador: Dra. María Moreno

Co-orientador: M.Sc. Amy Mónaco

Departamento de Desarrollo Biotecnológico,  
Instituto de Higiene, Facultad de Medicina.

## **1. CONTENIDO**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Contenido .....</b>                   | <b>2</b>  |
| <b>2. Resumen .....</b>                     | <b>3</b>  |
| <b>3. Introducción .....</b>                | <b>4</b>  |
| <b>4. Objetivos .....</b>                   | <b>10</b> |
| <b>5. Materiales y Métodos.....</b>         | <b>11</b> |
| <b>6. Resultados .....</b>                  | <b>16</b> |
| <b>7. Discusión .....</b>                   | <b>28</b> |
| <b>8. Conclusiones y Perspectivas .....</b> | <b>31</b> |
| <b>9. Agradecimientos .....</b>             | <b>32</b> |
| <b>10. Referencias Bibliográficas .....</b> | <b>33</b> |

## 2. RESUMEN

El melanoma cutáneo es un tumor maligno con incidencia en aumento. La remoción quirúrgica constituye el tratamiento de primera línea potencialmente curativo para aquellos pacientes en estadios tempranos de la enfermedad, mientras que en etapas avanzadas se recurre a terapias sistémicas como la quimioterapia.

El melanoma es considerado dentro de los tumores sólidos como el más inmunogénico y debido a esto las inmunoterapias resultan atractivas para el tratamiento del mismo. A pesar de los avances alcanzados en los últimos tiempos en esta área, las estrategias terapéuticas disponibles hoy en día no resultan eficaces en muchos casos. Actualmente, se apuesta al uso combinado de terapias buscando respuestas más eficaces que se mantengan en el tiempo y con menos efectos secundarios.

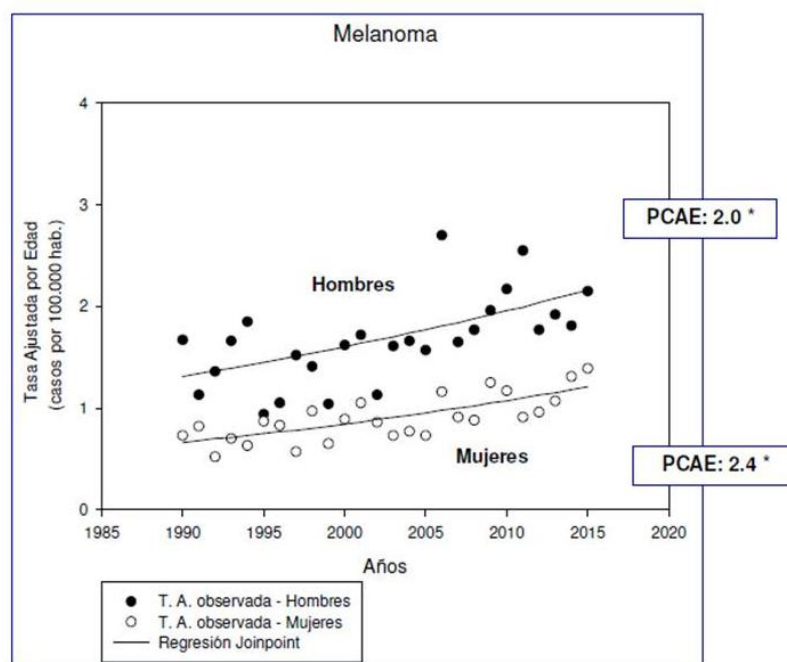
En este trabajo nos propusimos evaluar la eficacia de una nueva modalidad terapéutica basada en el uso de *Salmonella* viva atenuada combinada con dacarbazina. Para ello se determinó la eficacia *in vivo* de *Salmonella* Typhimurium viva atenuada en combinación con dacarbazina en un modelo murino de melanoma subcutáneo. Se realizó un seguimiento del tamaño tumoral, peso y supervivencia de los ratones obteniendo como resultados una disminución del tamaño tumoral acompañado de una extensión de la supervivencia global y sin verse afectado el estado sanitario de los animales. Además se realizó una evaluación de la respuesta inmune inducida por la terapia mediante el análisis de la respuesta anti-tumoral, tanto celular como humoral. Este análisis indica que la respuesta que se desarrolla tiene un importante componente celular, principalmente se observa una fuerte respuesta mediada por las células citotóxicas.

Con los datos obtenidos en este estudio podemos decir que el uso combinado de *Salmonella* con dacarbazina resulta una interesante opción terapéutica para el tratamiento de melanoma que amerita continuar evaluando.

### 3. INTRODUCCIÓN

El melanoma cutáneo es un tumor maligno originado a partir de melanocitos, células de la epidermis responsables de la pigmentación de la piel [1]. A pesar de que el melanoma corresponde a menos del 5% de los casos de cánceres cutáneos, éste representa aproximadamente el 75% de las muertes relacionadas con cáncer de piel [2].

La incidencia de melanoma cutáneo aún sigue en aumento, con 87.110 casos nuevos estimados para 2017 en Estados Unidos y cerca de 9.730 muertes a causa de esta enfermedad [3]. La incidencia global es cercana a los 160.000 nuevos casos por año, con un registro de 48.000 muertes al año [4]. Uruguay no es ajeno a esta problemática. El melanoma registra una incidencia de 5,84 y 4,13 casos por 100.000 hombres y mujeres, respectivamente, y una tasa de mortalidad de 2,08 y 1,07 casos por 100.000 hombres y mujeres, respectivamente [5].



**Figura 1.** Tendencias recientes de la mortalidad en Uruguay por melanoma. T.A.: Tasa ajustada por edad a la población mundial estándar expresada en casos x 100000. PCAE: Porcentaje de Cambio Anual Estimado para el período (1990 – 2015). (\*) PCAE estadísticamente significativo [5].

El pronóstico de supervivencia a 5 años para aquellos pacientes con melanoma en estadio temprano (sin tumor diseminado a ganglios linfáticos regionales u otros órganos) es de 98% aproximadamente en Estados Unidos, el cual disminuye a 62% cuando la enfermedad alcanza los ganglios linfáticos y a 15% cuando la enfermedad se hace metastásica [6]. Los avances terapéuticos alcanzados en la última década han logrado aumentar moderadamente la supervivencia global en pacientes con melanoma avanzado [7].

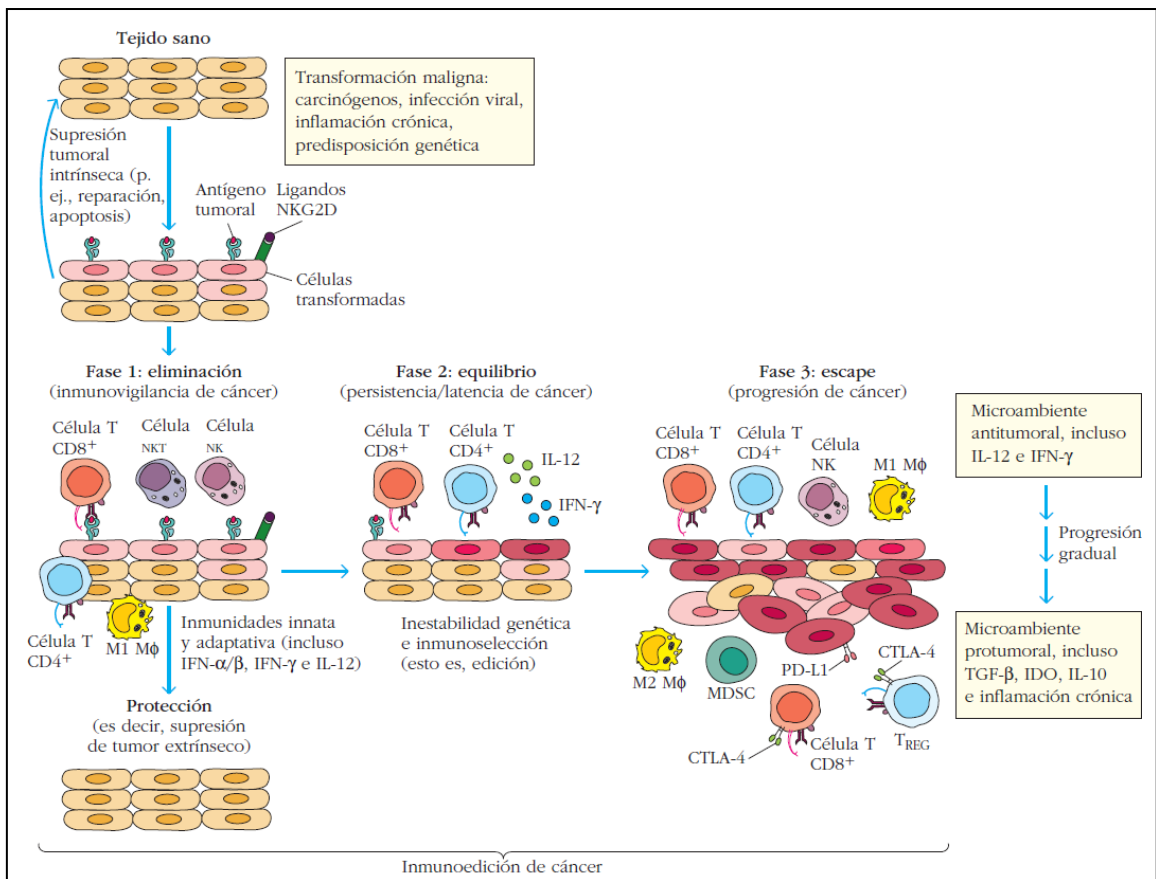
El melanoma es considerado dentro de los tumores sólidos como el más inmunogénico. Existe numerosa evidencia que sugiere esto:

- Los casos de remisión espontánea completa en pacientes con melanoma maligno, atribuible a la respuesta inmune frente al tumor [8, 9].
- La presencia de anticuerpos contra antígenos asociados al tumor (TAA) en pacientes con melanoma [10].
- La presencia de un infiltrado linfocitario tumoral (TIL) en lesiones de melanoma en humanos asociado a un buen pronóstico [11].
- El fenómeno de autoinmunidad contra las células melanocíticas que clínicamente se traduce en despigmentación de la piel e histológicamente por destrucción de melanocitos adyacentes al melanoma (Halo nevo de Sutton) o distantes (cambios vitiligoideos o vitiligo) también representa evidencia de la inmunogenicidad tumoral [12, 13]. Por otro lado, en distintos ensayos terapéuticos se señala el desarrollo de vitiligo como “marcador” del estímulo del sistema inmune [14, 15].
- La inmunodepresión sistémica favorece el desarrollo de melanoma [16].

Existe una dinámica y compleja interacción entre el sistema inmune y las células tumorales. El sistema inmune es capaz de inhibir el crecimiento tumoral por un lado y por otro favorecer la progresión neoplásica al seleccionar de alguna manera células tumorales con mejor fitness. Esta dualidad en la respuesta inmune se explica por el proceso de inmunoedición en el cáncer, el cual consta de tres fases: eliminación, equilibrio y escape (Figura 2).

- I. En la fase de eliminación el sistema inmune innato y adaptativo trabajan en conjunto para detectar la presencia de tumores en desarrollo y destruirlos antes de que sean clínicamente detectables (inmunovigilancia).
- II. En la fase de equilibrio algunas variantes raras de las células tumorales sobreviven y entran en un equilibrio dinámico con el sistema inmune, donde la respuesta inmune previene el crecimiento tumoral.
- III. Finalmente, en la fase de escape las células tumorales que sobrevivieron en la fase de equilibrio crecen progresivamente hasta conformar tumores visibles. Esta progresión puede ocurrir debido a cambios genéticos y epigenéticos en la célula tumoral que le confieren resistencia a la detección y/o eliminación por el sistema inmune, o debido a una inmunosupresión inducida por las células tumorales o por deterioro del sistema inmune [17, 18].

Actualmente se reconoce que el melanoma es un tumor heterogéneo (según datos clínicos, epidemiológicos y genéticos) con diversas alteraciones genéticas y que se desarrolla en diferentes sitios del cuerpo, tanto en piel expuesta al sol como en regiones no expuestas [19]. Esto indudablemente complejiza su abordaje terapéutico el cual tiene una fuerte tendencia a ser individualizado.



**Figura 2.** Representación esquemática de las tres fases del proceso de inmunoedición en el cáncer. Extraído de [20].

La remoción quirúrgica constituye el tratamiento de primera línea potencialmente curativo para aquellos pacientes con melanoma maligno no diseminado. En etapas avanzadas de la enfermedad se recurre a terapias sistémicas, como la quimioterapia [8]. Ésta se basa en el uso de agentes alquilantes tales como la dacarbazina (Deticene®), temozolomida (Temodal®) y fotemustina (Muphoran®), que desencadenan efectos citotóxicos mediante el bloqueo de la replicación celular. Sin embargo, estos fármacos tienen sólo un 10% de respuesta objetiva, sin mejoría de la supervivencia global [19].

Se demostró que la dacarbazina, además de su efecto citotóxico directo, tiene un efecto inmunomodulador: es capaz de estimular la expresión del ligando de NKG2D en las células tumorales, lo que conlleva a una activación de las células NK y secreción de IFN-γ tanto en ratones como en humanos. Como consecuencia de la secreción de IFN-γ por parte de las células NK se observó un aumento de la expresión de MHC de clase I en las células tumorales haciéndolas más susceptibles al ataque por linfocitos T citotóxicos [21].

Como monoterapia la dacarbazina ha reportado originalmente producir tasas de respuesta de hasta 25% pero luego en ensayos a gran escala esas tasas cayeron al 5-12%. La mediana de supervivencia libre de enfermedad es de 5-6 meses, con menos del 5% de respuesta completa. Seguimientos a largo plazo muestran que menos del 2% de los pacientes sobreviven a los 6 años [22]. Ha sido el agente quimioterapéutico estándar para el tratamiento de melanoma, por lo que es el punto de comparación de nuevas terapias en desarrollo [7].

Debido al carácter inmunogénico del melanoma, las inmunoterapias resultan un campo fértil de investigación para el tratamiento del mismo. Sin embargo, actualmente solo unas pocas se encuentran aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA).

La IL-2 fue la primera inmunoterapia aprobada en 1998 por la FDA para el tratamiento del melanoma (Aldesleukin®, Proleukin®, NovartisVaccines y Diagnostics, Inc., CA, EEUU) [19]. Otra inmunoterapia utilizada es el IFN $\alpha$ , que luego de varios años de ensayos se logró probar con una eficacia modesta en adyuvancia. Ensayos de fase III demuestran que el IFN $\alpha$  tiene un efecto en la supervivencia libre de enfermedad pero casi no hay efecto en la supervivencia global. En 2011 la FDA aprobó el IFN $\alpha$ -2b pegilado (Sylatron, Schering, EE.UU.) para los pacientes con estadio III [4]. Aún así, éstas presentan severos efectos adversos.

Recientemente surgieron dos nuevas y prometedoras inmunoterapias, los anticuerpos contra puntos de control del sistema inmune. Estas drogas bloquean receptores inhibidores expresados en la superficie de linfocitos, como CTLA-4 y PD-1, permitiendo su activación. En el año 2011, la FDA aprueba el uso de Ipilimumab (Yervoy®), un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 [23]. En la misma línea, unos años después se aprueban los anticuerpos contra la vía PD-1/PD-L1, denominados Nivolumab (Opdivo®) y Pembrolizumab (Keytruda®) [7]. Aunque estas inmunoterapias aparecen como una alternativa muy prometedora para el tratamiento del melanoma metastásico, su respuesta se limita a un porcentaje bajo de pacientes, con efectos secundarios asociados a procesos autoinmunes. Sumado a ello, el alto costo del tratamiento limita su aplicación.

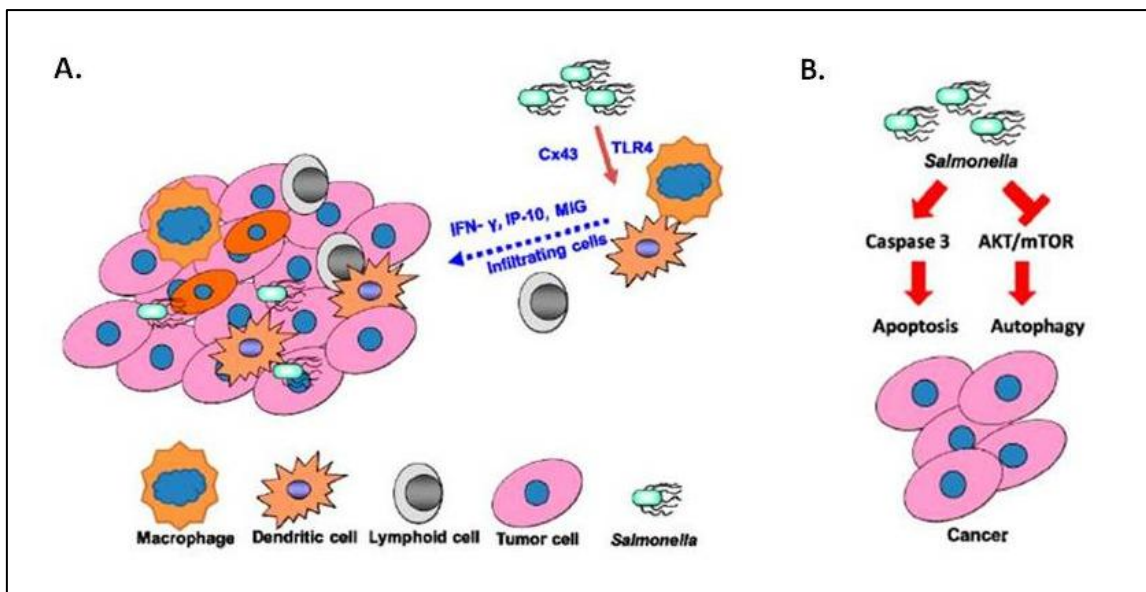
Por otro lado, la caracterización de las alteraciones moleculares y genéticas del melanoma condujo al desarrollo de inhibidores de la transducción de señales a nivel intracelular. Para agosto del 2011, la FDA aprobó vemurafenib (Zelboraf®) para pacientes con melanoma metastásico o inoperable en quienes se determine la mutación específica BRAFV600E. Chapman y colaboradores realizaron un ensayo clínico con vemurafenib solo o asociado a dacarbazina, para pacientes seleccionados con buenos resultados. Encontraron un aumento en la supervivencia global de 13,6 meses en el grupo vemurafenib versus 9,7 meses en el grupo dacarbazina y la tasa de respuesta objetiva también fue significativamente mayor (57% versus 8,6%) [24].

A pesar de los avances alcanzados en los últimos tiempos, las estrategias terapéuticas para el tratamiento del melanoma disponibles hoy en día no resultan eficaces en muchos casos. Esta realidad nos conduce a la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para melanoma.

El uso de bacterias para el tratamiento del cáncer es una de las primeras formas de inmunoterapia conocidas y una de las menos estudiadas en la modernidad [25]. En 1997 se describe el efecto antitumoral de *Salmonella* y su potencialidad como vector de vacunación. En los estudios realizados se observó que *Salmonella* se replica preferencialmente en tejido tumoral de ratones portadores de melanoma, en especial en las áreas necróticas del mismo, acompañado de un crecimiento tumoral más lento y un aumento en la supervivencia de los animales [26]. Al tratarse de una bacteria anaerobia facultativa tiene la capacidad de colonizar tumores grandes y pequeños. También se ha demostrado que *Salmonella* actúa como inhibidor de la metástasis en melanoma llevando a una reducción sustancial en tamaño y número de micrometástasis [27, 28].

Uno de los mecanismos planteados para explicar el efecto antitumoral de *Salmonella* es la estimulación de la respuesta inmune en el hospedero. Esta respuesta tiene un componente innato que se desencadena por el reconocimiento de ciertos PAMPs (patrones moleculares asociados al patógeno) que expresa *Salmonella*, como LPS y flagelina, que activan a receptores de tipo Toll y NOD y se transducen diversas señales que llevan a la secreción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas [29]. Además, se ha descrito que *Salmonella* tiene un efecto antitumoral directo desencadenando la apoptosis en células tumorales [30] (Figura 3).

Además, *Salmonella* puede ser fácilmente modificada a través de mutaciones genéticas seleccionadas, dando la posibilidad de crear cepas recombinantes atenuadas con ciclos de replicación limitados y pérdida de virulencia [31]. Se sabe que es segura como vacuna; se ha llevado a cabo ensayos clínicos fase I y II, demostrando la bioseguridad del uso de *Salmonella* viva atenuada en humanos, tanto en individuos sanos como en pacientes con cáncer, con baja toxicidad [32-35]. Existen más de 25 años de experiencia con una vacuna patentada a *Salmonella* viva atenuada *S. Typhi* Ty21a (Vivotifs, Crucell/Berna biotech) [36].



**Figura 3.** Representación esquemática de la respuesta inmune provocada por *Salmonella* en el hospedero (A) y su efecto antitumoral directo (B). Extraído de [30].

Por las características mencionadas anteriormente, entre otras, se propone como estrategia terapéutica frente al cáncer el uso de *Salmonella* viva atenuada. Hace algunos años, el Departamento de Desarrollo Biotecnológico comenzó a explorar el uso de *Salmonella* viva atenuada para el tratamiento de cáncer. Diversos trabajos fueron llevados a cabo por estudiantes de grado y posgrado, donde se pusieron a punto modelos de melanoma, leucemia mieloide aguda, linfoma no-Hodgkin a células B y cáncer de mama; éstos demostraron que las inmunoterapias basadas en *Salmonella*, ya sea sola o como vector para la administración de citoquinas, pueden constituir una alternativa para el tratamiento de estos tipos de tumores [37-40].

Actualmente, debido a que se ha visto que las diversas monoterapias utilizadas frente al cáncer no suelen producir beneficios a largo plazo ya que por diferentes mecanismos se



genera resistencia frente a las mismas, se apuesta al uso combinado de éstas, buscando respuestas más eficaces que se mantengan en el tiempo y con menos efectos secundarios [41].

La propuesta en este trabajo es evaluar el uso combinado de *Salmonella* viva atenuada con dacarbazina como una nueva estrategia terapéutica frente al melanoma.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo General**

Avanzar en el conocimiento del desarrollo de nuevas aproximaciones inmunoterapéuticas contra el melanoma, abordando una temática actual como es el uso conjunto de quimioterapia e inmunoterapia. Nos proponemos evaluar la eficacia de una nueva modalidad basada en *Salmonella* viva atenuada combinada con dacarbazina en un modelo murino de melanoma.

### **4.2. Objetivos Específicos**

- a. Poner a punto el tratamiento con dacarbazina en ratones portadores de melanoma.
- b. Determinar la eficacia *in vivo* de *Salmonella* Typhimurium viva atenuada en combinación con dacarbazina en un modelo murino de melanoma subcutáneo.
- c. Estudiar las poblaciones celulares infiltrantes del tumor y las presentes en el ganglio drenante del tumor luego de la aplicación de la terapia combinada.
- d. Analizar el perfil de expresión de citoquinas y quimioquinas en el tumor por qPCR en tiempo real.
- e. Investigar la funcionalidad de las células NK y T CD8 citotóxicas inducidas por la terapia combinada.
- f. Estudiar la respuesta humoral específica contra melanoma inducida por la terapia combinada.

### **4.3. Objetivos Académicos**

- a. Iniciación en el trabajo de la investigación científica.
- b. Conocer y ejecutar técnicas inmunológicas (cultivo celular, ELISA, citometría de flujo y qRT-PCR, entre otras).
- c. Familiarización con el trabajo de experimentación animal.
- d. Desarrollar capacidad de análisis de datos.
- e. Potenciar capacidad de análisis crítico de resultados.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Células de melanoma y cepa bacteriana

#### Línea celular y condiciones de cultivo

Se utilizó la línea celular de melanoma de ratón B16F1, obtenida de American Type Culture Collection (Nº de línea CRL-6323). La línea fue cultivada en medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) enriquecido con suero fetal bovino al 10%, a 37º C y atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

#### Cepa bacteriana

Se utilizó una cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) atenuada, con una mutación en el gen *aroC* (*aroC*-) de la vía de los compuestos aromáticos, sin resistencia antibiótica, llamada LVR01 [42]. Para la preparación de los inóculos se cultivó la cepa bacteriana en caldo Luria-Bertani (LB) a 37º C y con agitación (200 rpm) durante 16 horas (ON). Se prepararon alícuotas del mismo, y se almacenaron congeladas en el mismo medio de cultivo con 15% de glicerol a -80º C en una concentración conocida.

Al momento de su utilización, se descongeló una alícuota a temperatura ambiente y se resuspendieron las bacterias en PBS a una concentración de  $1 \times 10^7$  ufc/mL. Se chequeó el inóculo utilizado por conteo de diluciones apropiadas en placa de LB agar.

### 5.2. Citostático

Se utilizó dacarbazina polvo liofilizado (Laboratorio Fármaco Uruguayo). La preparación de la misma se llevó a cabo en una campana de extracción de gases, se reconstituyó el frasco ampolla con 200mg del producto liofilizado con agua para inyectables, un volumen de 16,7 ml, obteniendo una solución límpida conteniendo 12 mg/ml. Fueron adoptadas las medidas de seguridad apropiadas y todo material en contacto con la dacarbazina fue descartado en sitios exclusivos de residuos citostáticos.

### 5.3. Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6, hembras, de 6-8 semanas de edad (Dilave, Uruguay). Estos fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Higiene, con ciclos de 12 horas luz - 12 horas oscuridad, a 21º C, 60% de humedad, y con agua y ración *ad libitum*.

Todos los ensayos con animales de experimentación se realizaron bajo normas y cumpliendo todos los requerimientos de la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA) para asegurar su salud y bienestar. El protocolo de experimentación animal fue presentado y aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de Facultad de Medicina (Exp. Nº 071140-002259-12).

#### 5.4. Puesta a punto el tratamiento con dacarbazina en ratones portadores de melanoma

Se utilizó un modelo murino de melanoma subcutáneo de células B16F1 previamente estandarizado y muy utilizado en nuestro laboratorio [37]. Los ratones fueron inoculados a nivel flanco derecho por punción subcutánea (s.c.) con una suspensión de  $2,5 \times 10^5$  células B16F1 en 100  $\mu$ l de suero fisiológico. El día 11 se administró diferentes dosis de dacarbazina (250, 150 y 62,5 mg/kg/dosis) vía intraperitoneal y a los ratones control, suero fisiológico inyectable. Esto se repitió cada 24 horas durante 3 días consecutivos.

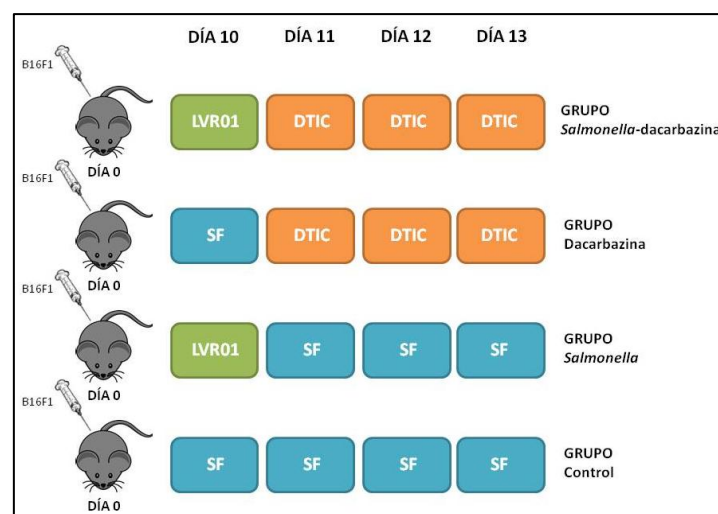
Cada 3-4 días se pesaron los animales y se midieron los tumores mediante determinación del ancho, largo y profundidad del tumor con un calibre para el cálculo de volumen tumoral según la siguiente fórmula:  $\text{largo} \times \text{ancho} \times \text{altura} \times \pi/6 = \text{volumen}$  (en  $\text{mm}^3$ ). Además, se registró la sobrevida global. Se realizó eutanasia humanitaria por dislocación cervical cuando el volumen tumoral superó los  $4.000\text{mm}^3$ , o si el animal presentaba aspecto clínico enfermo (criterios de punto final).

#### 5.5. Ensayo *in vivo* en modelo murino de melanoma: sobrevida y tamaño tumoral

Ratones portadores de melanoma se dividieron al azar en 4 grupos: grupo control, grupo *Salmonella*, grupo dacarbazina y grupo *Salmonella*-dacarbazina.

Una vez que los tumores fueron visibles (día 10 post-inoculación de tumor) se inyectó de forma intratumoral 100  $\mu$ l de suero fisiológico inyectable (grupo control y dacarbazina) o una solución conteniendo  $1 \times 10^6$  ufc de *Salmonella* (grupos *Salmonella*, y *Salmonella*-dacarbazina).

El día 11 se administró 250  $\mu$ l de dacarbazina, 150 mg/kg/dosis, a los animales de los grupos correspondientes y a los dos restantes suero fisiológico inyectable, vía intraperitoneal. Esto fue repetido cada 24 horas por un total de 3 veces. Cada 3-4 días se pesaron los animales, se midieron los tumores, y se realizó un seguimiento de la sobrevida según se describió más arriba.



**Figura 4.** Representación esquemática del modelo y tratamiento utilizado. Se implantó el tumor inoculando  $2,5 \times 10^5$  células B16F1 de forma s.c. (día 0), se inoculó  $1 \times 10^6$  ufc LVR01 i.t. al día 10 p.i.t. y los días 11, 12 y 13 p.i.t. se administró dacarbazina (150 mg/kg/dosis) de modo i.p.

## 5.6. Evaluación de la respuesta inmune protectora mediante el análisis de la respuesta inmune anti-tumoral

Se evaluó la respuesta inmune anti-tumoral tanto a nivel local (en el tumor) y locoregional (ganglio drenante del tumor), como sistémico (bazo).

### Obtención de las muestras

Se extrajo sangre para obtención de suero. Las muestras de sangre se incubaron 30 minutos en estufa a 37° C y luego se centrifugaron a 6000 rpm por 10 minutos, se recogieron las muestras de suero y se almacenaron a -80° C.

Posteriormente se sacrificaron los animales tratados y se obtuvieron muestras de tumor, ganglio drenante del tumor (TDLN) y bazo para su análisis. Una parte representativa de cada tumor fue sumergida inmediatamente en TRIzol en condiciones ice-cold y posteriormente congelada a -80°C para el análisis del perfil transcripcional de citoquinas y quimioquinas, mientras que el resto de los tejidos fueron colocados en PBS para su posterior análisis.

### Evaluación de la expresión de quimioquinas y citoquinas

Se determinó la expresión de ARN mensajero de *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Ccl20*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ifng*, *Il10*, *Il12* e *Il15* por PCR cuantitativa en tiempo real [43-45].

Para esto, se descongelaron las muestras conservadas en TRIzol, se rompieron las células utilizando un disruptor celular con el fin de liberar el ARN de las mismas, se homogeneizó el tejido y se procedió a la extracción de ARN siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El ARN fue rehidratado y cuantificado por espectrofotometría utilizando Nanodrop 1000. Se trató 1 µg de ARN con DNasa I durante 15 minutos, luego se realizó la retro-transcripción utilizando una mezcla de *random primer hexamers* y el siguiente ciclado: 10 minutos a 25° C, 50 minutos a 37° C y 15 minutos a 70° C. El ADN copia se almacenó a -20° C. Se diluyó ¼ el ADN copia y se realizaron las RT-PCR cuantitativas utilizando SYBR Green y cebadores específicos. En este caso el ciclado utilizado fue: 15 minutos a 95° C, 40 ciclos de 15 segundos a 95° C y 1 minuto a 60° C, luego una curva de desnaturalización.

Se utilizó el gen de la GAPDH como gen *house keeping*. Los valores se expresan como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , donde  $\Delta Ct = Ct$  del gen de interés -  $Ct$  del gen de la GAPDH, siendo por tanto valores relativos [46].

### Estudio del reclutamiento de células del sistema inmune

A partir de los tejidos obtenidos en PBS se obtuvo una suspensión celular mediante disgregación mecánica. Se analizó el reclutamiento de células del sistema inmune, como macrófagos (F4/80<sup>+</sup>), neutrófilos (Gr1<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>), células dendríticas (CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup>), linfocitos T citotóxicos (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>) y colaboradores (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>), linfocitos B (CD19<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>), y células NK (CD49b<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup>) y NKT (CD49b<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>), mediante citometría de flujo.

Las células fueron marcadas con distintos paneles de anticuerpos, de acuerdo a como se muestra en la siguiente tabla:

|        | Panel Linfocitos | Panel Granulocitos/Células dendríticas |
|--------|------------------|--|
| FITC   | CD4              | Gr1                                    |
| PE     | CD19             | MHCII                                  |
| PerCP  | CD3              |  |
| PECy7  | CD8              | CD11c                                  |
| APC    | CD49b            | F4/80                                  |
| APCCy7 |                  | CD11b                                  |

También se evaluó el estado de activación/memoria de las células NK y los linfocitos T citotóxicos (CD44/CD62L/CD127, y CD69) y la expresión del receptor NKG2D [21] por citometría de flujo. Los paneles de anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

|       | Panel Estado de Activación | Panel Expresión NKG2D | Panel Memoria |
|-------|----------------------------|-----------------------|---------------|
| FITC  |                            |                       | CD44          |
| PE    | CD69                       | NKGD2                 | CD127         |
| PerCP | CD3                        | CD3                   | CD3           |
| PECy7 | CD8                        | CD8                   | CD8           |
| APC   | CD49b                      | CD49b                 | CD62L         |

Los datos se adquirieron en el citómetro de flujo FACS Canto II y para el procesamiento de los datos se utilizó el software FACSDiva.

#### Evaluación de la funcionalidad citotóxica de las células NK

Para evaluar la funcionalidad citotóxica de las células NK se realizó un ensayo *ex vivo* utilizando las muestras de bazo. Se estudió la capacidad citotóxica de los linfocitos NK frente a células sensibles a su actividad (YAC1, de ATCC). Para esto las muestras de bazo fueron homogeneizadas hasta obtener una suspensión celular y los esplenocitos (E;

Efectoras) de los ratones tratados fueron incubados con las células YAC1 (B; Blanco), marcadas previamente con CFSE, en diversas relaciones E:B (200:0, 200:1, 100:1, 50:1) durante 24 horas en estufa a 37° C. Luego las células fueron marcadas con un anticuerpo anti-CD49b conjugado a APC y con yoduro de propidio (PI), el análisis se realizó a través de citometría de flujo según fue previamente descrito [47].

#### Evaluación de la respuesta humoral contra células de melanoma

Para determinar los niveles de IgG contra melanoma por ELISA se sensibilizaron placas de 96 pocillos con lisado de células B16F1 en PBS, ON a 4° C. Las placas se bloquearon con PBS-1% BSA por 2 horas a 37° C. Luego se incubaron los sueros de los ratones (diluciones 1/100 y 1/200) por duplicado ON a 4° C. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo policlonal biotinilado anti-ratón hecho en cabra, se incubó 1 hora a 37° C. Asimismo, se agregó ExtrAvidin-peroxidasa. La reacción fue revelada utilizando OPD Sigma Fast y se midió la absorbancia a 490 nm.

#### **5.7. Análisis estadístico**

La comparación de la variable tamaño tumoral y las distintas variables del análisis inmunológico entre los diferentes grupos se realizó por test de T (T de student), tomándose como significativo cuando  $p < 0,05$ . Para el estudio de sobrevida de los ratones se construyeron curvas de sobrevida para cada uno de los grupos de ratones según el método descrito por Kaplan y Meier y la comparación de las curvas se evaluó utilizando el Test Logrank.

## 6. RESULTADOS

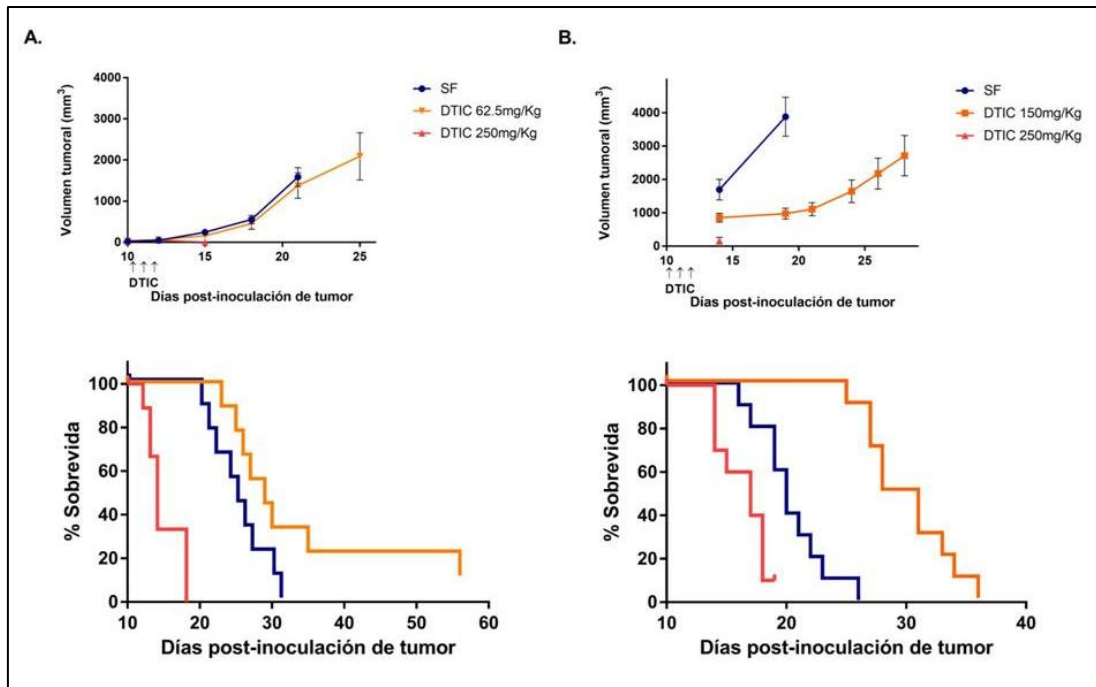
### 6.1. Puesta a punto del tratamiento con dacarbazina en ratones portadores de melanoma.

Para determinar la dosis de dacarbazina a usar en el tratamiento de los ratones portadores de melanoma se realizaron ensayos *in vivo* donde se testearon diferentes concentraciones de la droga y se evaluó el tamaño tumoral y la sobrevida. El seguimiento del crecimiento tumoral se llevo a cabo mediante mediciones del tamaño tumoral (ancho, largo y profundidad del tumor) cada 3-4 días, a partir de las cuales se calculó el volumen tumoral como se explicó anteriormente en Materiales y Métodos. Se consideró como criterio de punto final volúmenes tumorales mayores a 4.000 mm<sup>3</sup>.

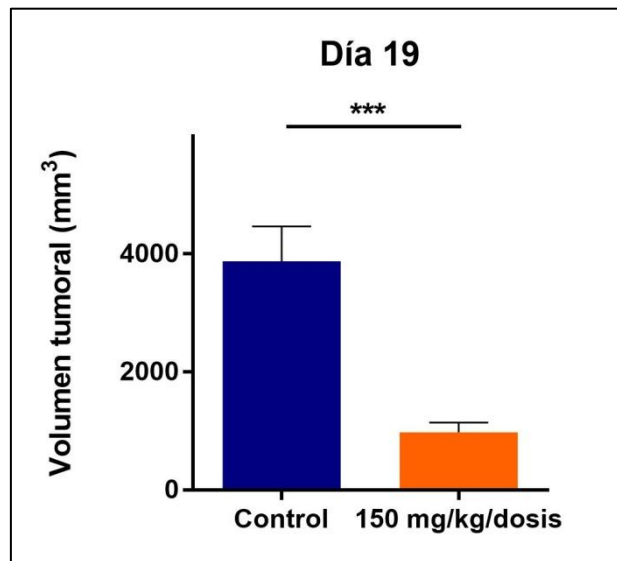
En base a la literatura, una primera instancia se evaluaron dos dosis de dacarbazina, 62,5 y 250 mg/Kg/dosis en régimen de tres dosis consecutivas cada 24 horas. En la Figura 5 A se observa la curva de crecimiento tumoral y la sobrevida de tres grupos de ratones: un grupo control que recibió suero fisiológico inyectable en lugar de tratamiento con dacarbazina y los dos grupos que recibieron dacarbazina en dosis diferentes. Todos los ratones fueron tratados bajo el mismo régimen, el día 11 se administró suero fisiológico inyectable y las diferentes dosis de dacarbazina vía intraperitoneal y esto se repitió cada 24 horas durante 3 días consecutivos. El grupo que recibió dacarbazina 250 mg/Kg/dosis presentó volúmenes tumorales pequeños pero la sobrevida de este grupo fue muy corta [media de sobrevida: 15 días post inoculación de tumor (p.i.t)] debido a la alta toxicidad de la terapia. Se encontraron diferencias significativas en la sobrevida del grupo control y el grupo dacarbazina 62,5 mg/Kg/dosis con respecto al grupo dacarbazina 250 mg/Kg/dosis ( $p < 0,0001$  en ambos casos, log-rank test). Sin embargo entre el grupo control y el grupo dacarbazina 62,5 mg/Kg/dosis no se hallaron diferencias en los tamaños tumorales o la sobrevida.

En base a estos resultados, una segunda instancia se evaluó una dosis intermedia, 150 mg/kg/dosis. En la Figura 5 B se muestran los resultados de este nuevo ensayo donde se mantuvieron los grupos control y dacarbazina 250 mg/Kg/dosis del experimento anterior. Observamos que el grupo dacarbazina 250 mg/Kg/dosis se comporta de igual modo al descrito en el ensayo anterior: el porcentaje de sobrevida cae rápidamente con el paso de los días, confirmando su alta toxicidad. En el grupo que recibió dacarbazina 150 mg/Kg/dosis podemos observar que el volumen tumoral tiende a mantenerse constante hasta el día 21 p.i.t donde comienza a aumentar gradualmente. En el día 19 p.i.t se encontraron diferencias significativas entre los volúmenes tumorales del grupo control ( $3879,1 \pm 1855$  mm<sup>3</sup>) y el grupo dacarbazina 150 mg/Kg/dosis ( $975,9 \pm 521,2$  mm<sup>3</sup>) ( $p = 0,0002$ , t test) (Figura 6). En cuanto a la sobrevida, hay un aumento significativo en la sobrevida del grupo dacarbazina 150 mg/Kg/dosis con respecto al grupo control, con una media de sobrevida de 30 días p.i.t y 20 días p.i.t, respectivamente ( $p < 0,0001$ , log-rank test). De este ensayo se concluye que la dosis óptima de dacarbazina para el tratamiento en este modelo experimental es 150 mg/Kg/dosis ya que se obtiene una mayor sobrevida, producto de una reducción significativa en los volúmenes tumorales en comparación con el grupo control.





**Figura 5.** Puesta a punto del tratamiento con dacarbazina en ratones con melanoma. Curvas de crecimiento tumoral y porcentaje de supervida. En el primer ensayo se utilizó DTIC 62,5 mg/Kg/dosis y DTIC 250 mg/Kg/dosis (A); en el segundo ensayo se utilizó DTIC 150 mg/Kg/dosis y DTIC 250 mg/Kg/dosis (B). Con las flechas se indica la inoculación intraperitoneal de dacarbazina. Los resultados son representativos de 2 ensayos independientes. N=10 por grupo. SF: suero fisiológico, DTIC: dacarbazina.



**Figura 6.** Volumen tumoral al día 19 post inoculación del tumor. Resultados provienen de un único ensayo. SF: suero fisiológico, DTIC: dacarbazina. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*):\*\*\* p<0,001.

## 6.2. Ensayo *in vivo* en modelo murino de melanoma: supervida, tamaño tumoral y peso.

Una vez determinada la dosis de dacarbazina a utilizar, se procedió a realizar ensayos *in vivo* con el fin de evaluar la respuesta de los ratones portadores de melanoma frente a la terapia combinada de *Salmonella* con dacarbazina. Para ello se inocularon ratones con melanoma, y cuando los tumores eran palpables (día 10 p.t.i.) se procedió a la

administración de terapia neoadyuvante con *Salmonella* de forma intratumoral. Al día siguiente, se comenzó con la quimioterapia. La efectividad de esta se comparó contra ambas monoterapias (*Salmonella* y dacarbazina), y contra el grupo control (suero fisiológico).

#### Curva de crecimiento tumoral

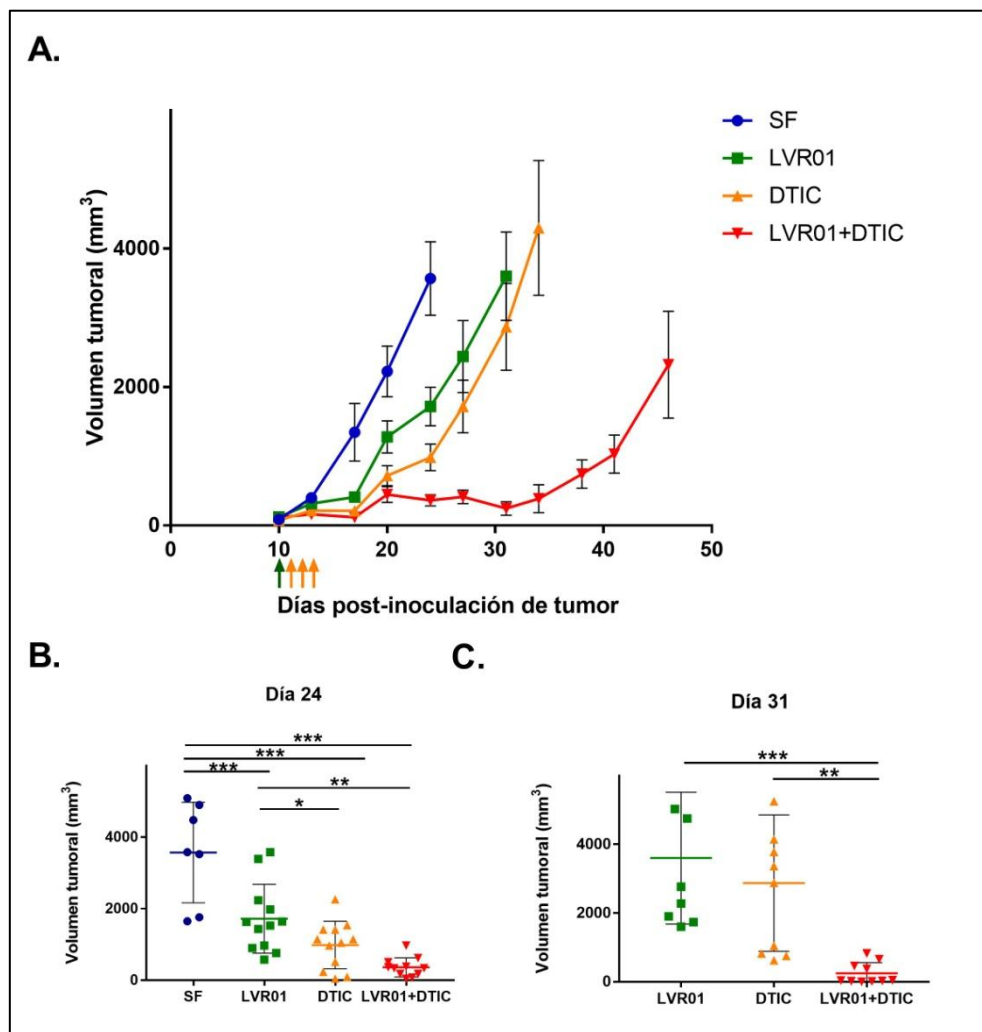
Los ratones del grupo control presentaron un crecimiento tumoral sostenido en el tiempo, alcanzando rápidamente grandes volúmenes tumorales. Esto se correlaciona con la menor supervivencia que presentó este grupo, ya que como se mencionó anteriormente volúmenes tumorales mayores a 4.000 mm<sup>3</sup> corresponden a un criterio de punto final en este ensayo. En los ratones tratados con *Salmonella* y con dacarbazina como monoterapias se observó un crecimiento tumoral más lento al inicio, pero luego del día 17 p.i.t el crecimiento se volvió sostenido en el tiempo. Sin embargo, en el grupo que fue tratado con la terapia combinada se vio un marcado enlentecimiento del crecimiento tumoral, a partir del día 34 p.i.t se observó que los tumores comienzan a crecer (Figura 7 A). En la Figura 7 B se muestran los volúmenes tumorales al día 24 p.i.t, siendo las medias de volumen tumoral 3568,9 ± 1078 mm<sup>3</sup> para el grupo control, 1719,5 ± 719 mm<sup>3</sup> para *Salmonella*, 985,4 ± 511,7 mm<sup>3</sup> para dacarbazina, y 362,6 ± 187,6 mm<sup>3</sup> para *Salmonella*-dacarbazina. Encontramos diferencias significativas entre todos los tratamientos respecto al grupo control (p=0,003 LVR01 vs SF, p<0,0001 DTIC y LVR01+DTIC vs SF, t test). También se muestran los volúmenes tumorales al día 31 p.i.t, donde se comparan los tamaños entre los grupos *Salmonella*, dacarbazina y *Salmonella*-dacarbazina. Cabe destacar que no se incluyó el grupo control ya que para este día ningún individuo sobrevivió. Existen diferencias significativas entre los grupos que recibieron las distintas monoterapias y el grupo que recibió la terapia combinada (p<0,0001 LVR01 vs LVR01+DTIC, p=0,0006 DTIC vs LVR01+DTIC, t test), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre ambas monoterapias (Figura 7 C). Las medias de volumen tumoral al día 31 p.i.t fueron de 3600 ± 1715,4 mm<sup>3</sup> para el grupo *Salmonella*, 2871,5 ± 1647,6 mm<sup>3</sup> para dacarbazina, y 247 ± 267,7 mm<sup>3</sup> para *Salmonella*-dacarbazina.

#### Seguimiento del peso corporal

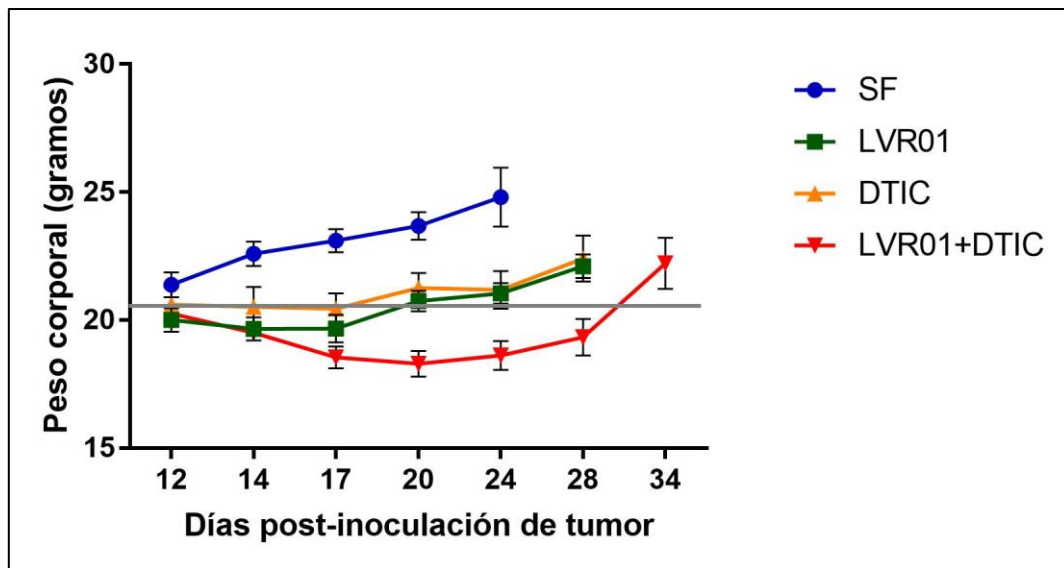
Los ratones de los diversos grupos fueron pesados cada 3-4 días, en la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos. En el grupo control se observa un aumento progresivo del peso corporal que se correlaciona con el aumento del tamaño tumoral en estos ratones. En los grupos *Salmonella* y dacarbazina el peso se mantiene estable al comienzo y a partir del día 17 p.i.t se ve un aumento del mismo, lo que coincide con el aumento del volumen tumoral. En los ratones que recibieron *Salmonella* en conjunto con dacarbazina se observó una disminución del peso corporal inicial, que podemos atribuir a una moderada, pero tolerable, toxicidad por la terapia, y aproximadamente al día 20 p.i.t el peso comienza a ascender gradualmente. Además, si correlacionamos el peso corporal con el volumen tumoral (Figura 7A) podemos atribuir la ganancia de peso que observamos con una mejora del status sanitario del animal, ya que en el período de tiempo limitado entre el día 20 y 34 p.i.t el volumen tumoral se mantuvo constante.

## Curva de supervivencia

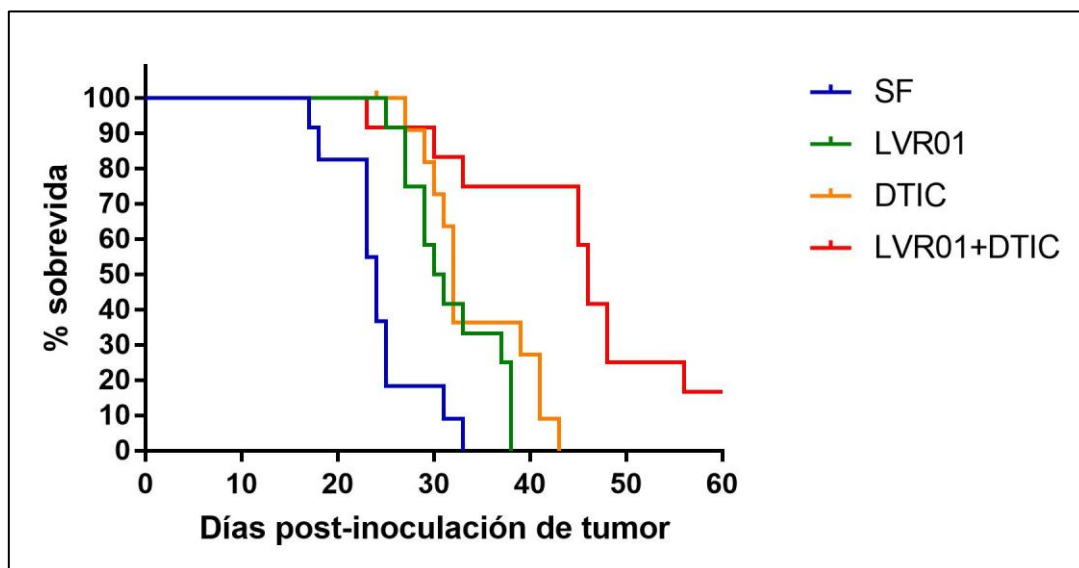
Los ratones pertenecientes al grupo control, que recibieron suero fisiológico inyectable en lugar de tratamiento, presentaron una media de supervivencia de 24 días p.i.t. En los ratones que recibieron alguna de las monoterapias, se observó una prolongación en la supervivencia con respecto al grupo control, presentando medias de supervivencia de 32 días p.i.t. para *Salmonella* ( $p=0,002$ , log-rank test) y 34 días p.i.t. para dacarbazina ( $p=0,0005$ , log-rank test). La mayor prolongación en la supervivencia se observa en los ratones que recibieron el tratamiento combinado *Salmonella*-dacarbazina, obteniéndose diferencias significativas con respecto al grupo control ( $p<0,0001$ , log-rank test), *Salmonella* ( $p=0,0005$ , log-rank test) y dacarbazina ( $p=0,0008$ , log-rank test). De los 12 ratones que recibieron la terapia combinada la media de supervivencia de 10 de ellos fue de 42 días p.i.t, mientras que los dos ratones restantes presentaron una remisión completa del tumor y continúan con vida.



**Figura 7.** Curva de crecimiento tumoral. Se muestran los valores hasta el día 46 p.i.t. Se indica con la flecha verde la inoculación intratumoral de *Salmonella* y con las flechas naranjas las tres inoculaciones intratumorales de dacarbazina (A). Comparación de los volúmenes tumorales el día 24 p.i.t (B) y el día 31 p.i.t (C). Los resultados son representativos de 2 ensayos independientes. N=12 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, DTIC: dacarbazina, LVR01+DTIC: *Salmonella*-dacarbazina. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$  y \*\*\*  $p<0,001$ .



**Figura 8.** Curva de peso corporal. Resultados provienen de un único ensayo. Línea horizontal indica la media del peso inicial de los ratones. N=12 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, DTIC: dacarbazina, LVR01+DTIC: *Salmonella*-dacarbazina.

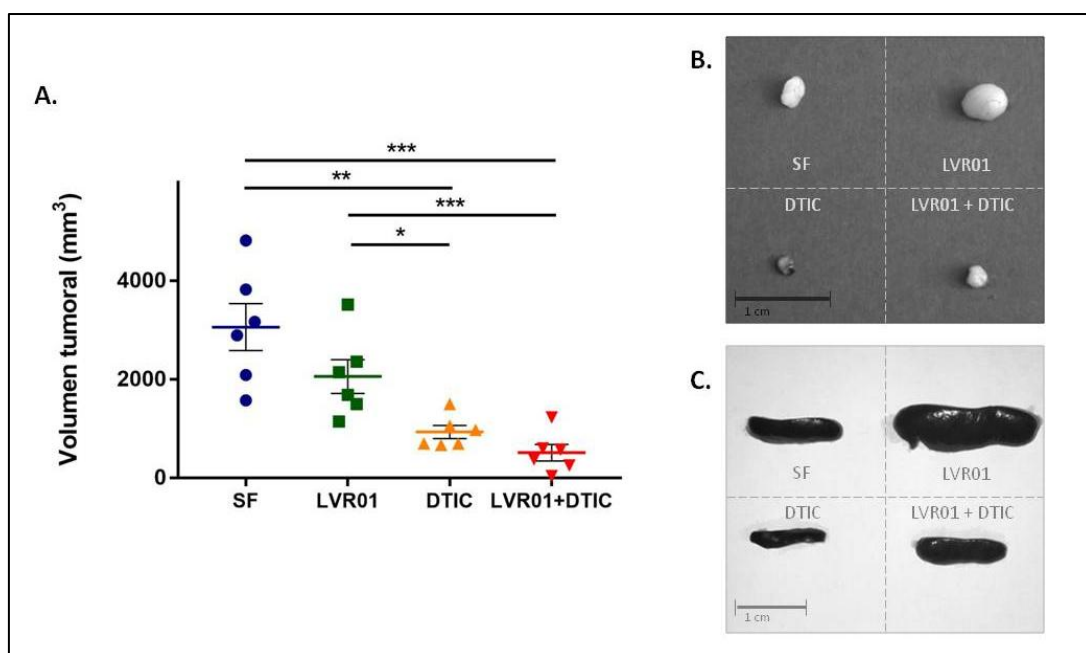


**Figura 9.** Curva de sobrevida de ratones portadores de melanoma tratados con las diferentes terapias. Los resultados son representativos de 2 ensayos independientes. N=12 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, DTIC: dacarbazina, LVR01+DTIC: *Salmonella*-dacarbazina.

### 6.3. Evaluación de la respuesta inmune protectora: análisis de la respuesta antitumoral.

Al día 27 post inoculación de tumor, se sacrificaron los ratones pertenecientes a los cuatro grupos en estudio: control, *Salmonella*, dacarbazina y *Salmonella*-dacarbazina (n=6 por grupo). Se midió el tamaño tumoral de los mismos (Figura 10 A), encontrando diferencias significativas entre los volúmenes tumorales del grupo control en comparación con los grupos dacarbazina (p=0,0016, t test) y *Salmonella*-dacarbazina (p=0,0005, t test). También

se hallaron diferencias en los volúmenes tumorales del grupo *Salmonella* en comparación con dacarbazina ( $p=0,0119$ , t test) y *Salmonella*-dacarbazina ( $p=0,0023$ , t test). Para el análisis de la respuesta inmune protectora de estos ratones se procedió a extraer muestras de sangre, tumor, el ganglio linfático drenante del tumor y el bazo. En la Figura 10 B se muestra un ganglio representativo de cada grupo, a simple vista se pueden observar diferencias en los tamaños de los mismos, siendo los ganglios pertenecientes al grupo *Salmonella* los de mayor tamaño y los ganglios del grupo dacarbazina los de menor tamaño. Además se exponen muestras representativas de bazos de cada grupo (Figura 10 C) y vemos que se repite el mismo patrón descrito anteriormente: el bazo de mayor tamaño pertenece al grupo *Salmonella* y el de menor tamaño al grupo dacarbazina. En ambos casos (tanto ganglio como bazo) los animales tratados con la terapia combinada presentan tamaños de órganos similares a los animales sin tratamiento.

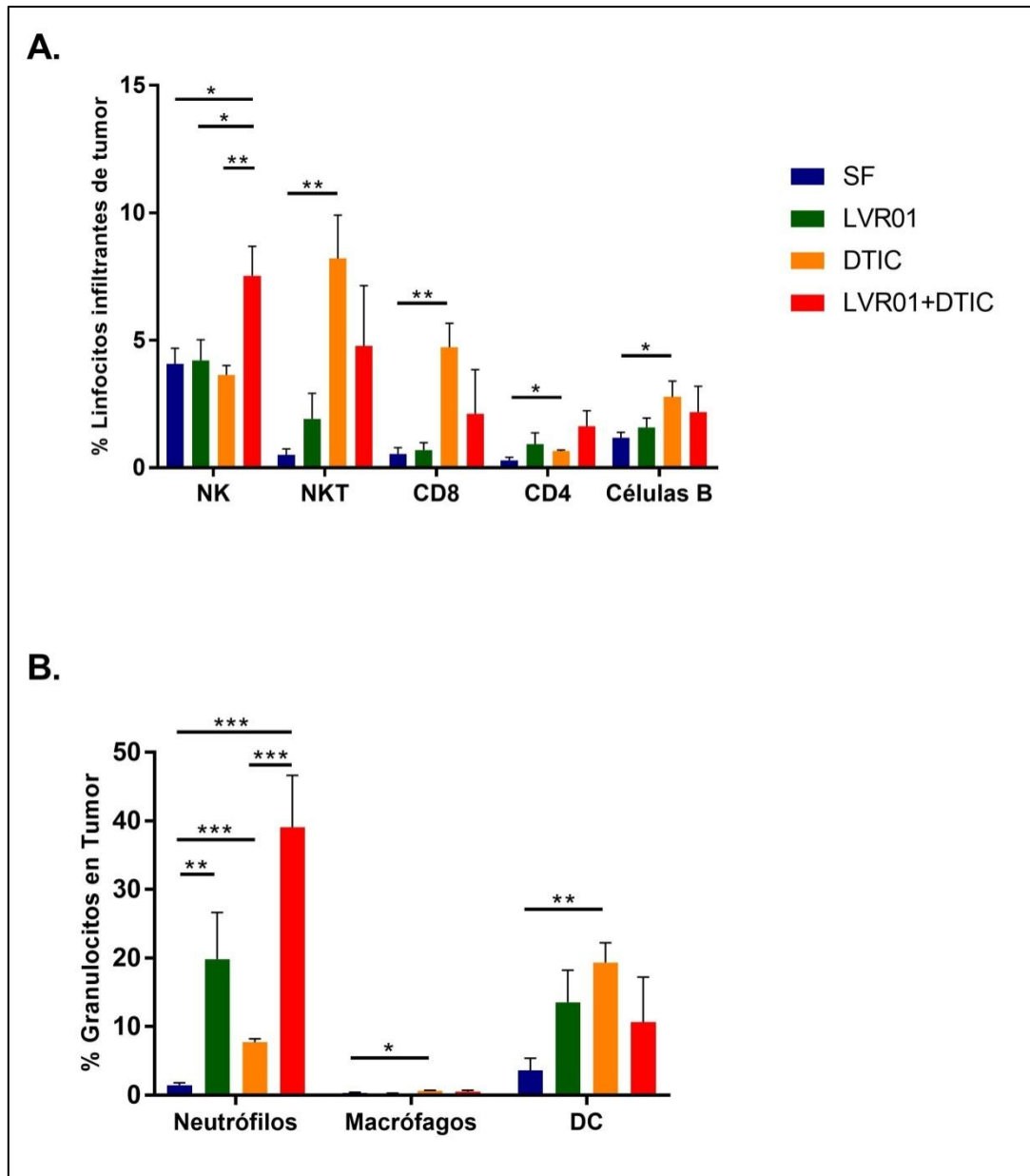


**Figura 10.** Volumen tumoral al momento del sacrificio de los ratones (día 27 p.i.t) (A). Muestras representativas del ganglio drenante de tumor (B) y del bazo (C). Los resultados son representativos de 2 ensayos independientes. N=6 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, DTIC: dacarbazina, LVR01+DTIC: *Salmonella*-dacarbazina. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$  y \*\*\*  $p<0,001$ .

### Reclutamiento de las células del sistema inmune al microambiente tumoral

Mediante citometría de flujo se estudiaron las distintas poblaciones celulares infiltrantes de tumor. Se observó un aumento significativo en el reclutamiento de células NK en los ratones que recibieron la terapia combinada en comparación con los grupos control ( $p=0,024$ , t test), *Salmonella* ( $p=0,049$ , t test) y dacarbazina ( $p=0,009$ , t test). En los ratones del grupo dacarbazina hay un aumento significativo en la población de linfocitos NKT, CD8, CD4 y células B en comparación con el grupo control ( $p=0,0011$ ,  $p=0,0015$ ,  $p=0,021$  y  $p=0,035$  respectivamente, t test) (Figura 11 A). Con respecto a los granulocitos en tumor se observó un aumento significativo en el reclutamiento de neutrófilos en los tres grupos tratados con respecto al control (SF vs LVR01  $p=0,022$ , SF vs DTIC y SF vs LVR01+DTIC

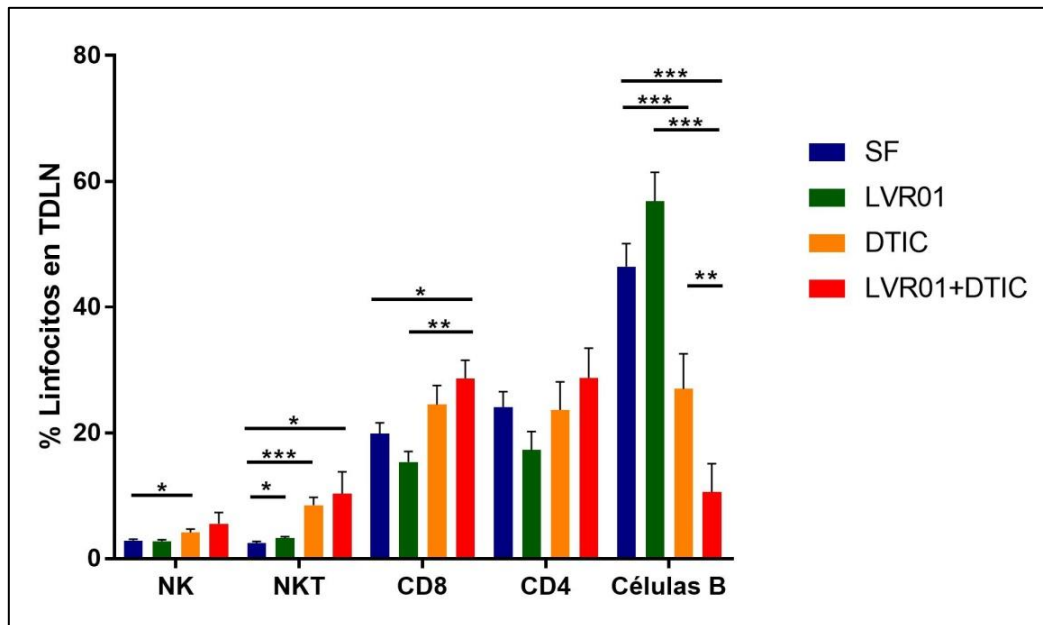
p<0,001, t test). Dentro de estos el grupo que recibió el tratamiento combinado es quien presentó el mayor aumento en esta población celular, seguido por el grupo tratado con *Salmonella*. Además, el grupo *Salmonella*-dacarbazina presenta un aumento significativo de neutrófilos con respecto al grupo dacarbazina (p=0,002, t test). En la población de células dendríticas (DC) y macrófagos se observó un aumento significativo en el grupo tratado con dacarbazina con respecto al grupo control (p=0,0016 y p=0,032 respectivamente, t test) (Figura 11 B).



**Figura 11.** Reclutamiento de poblaciones celulares en tumor. Los resultados son representativos de 2 ensayos independientes. N=6 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, DTIC: dacarbazina, LVR01+DTIC: *Salmonella*-dacarbazina. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \* p<0,05, \*\* p<0,01 y \*\*\* p<0,001.

También se estudió la población de linfocitos en el ganglio drenante de tumor. Como se ve en la Figura 12, no se encontraron diferencias con respecto a los porcentajes de linfocitos T CD4 entre los diferentes grupos. Con respecto a las poblaciones de NK y NKT se ve un

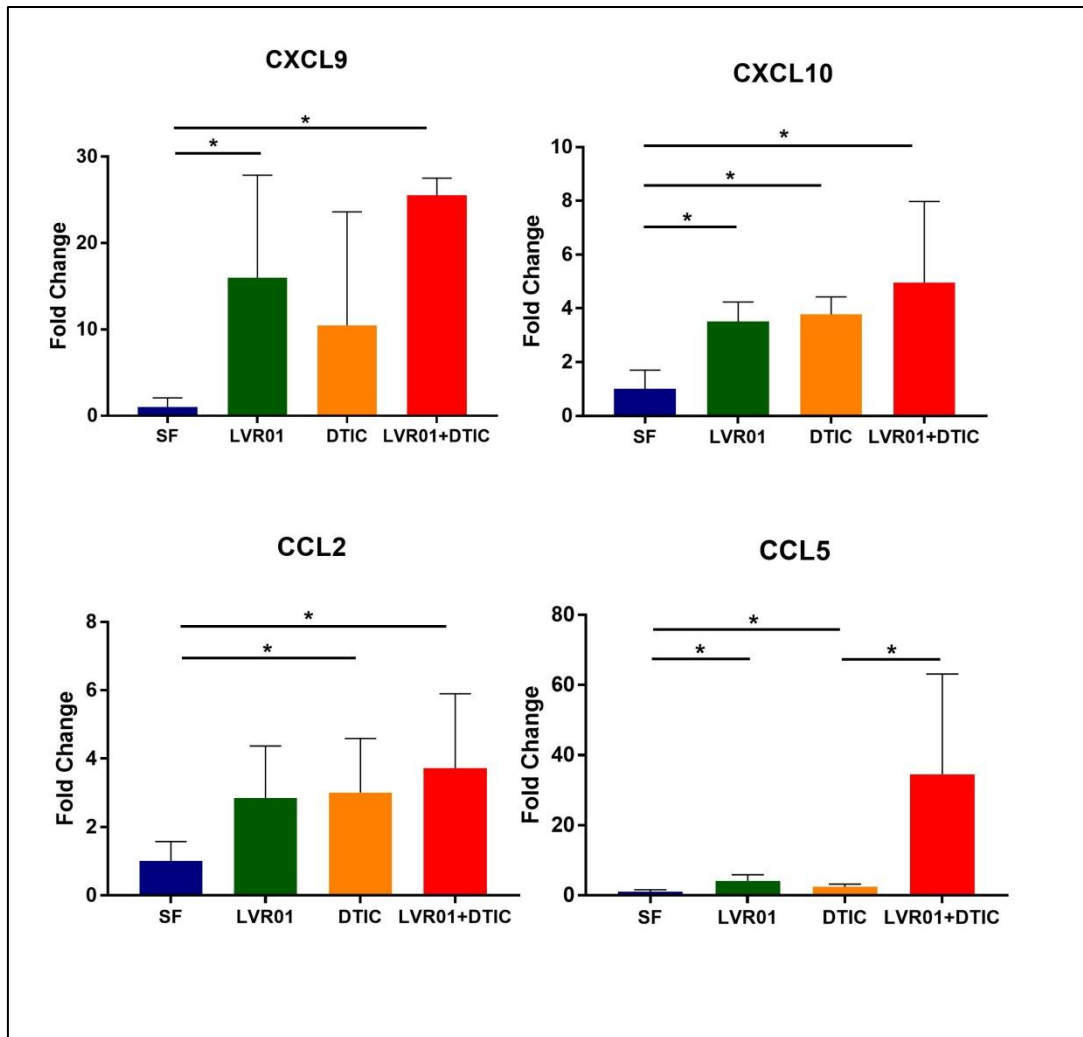
aumento significativo en el grupo tratado con dacarbazina con respecto al grupo no tratado ( $p=0,049$  y  $p<0,001$ , t test), también hay un aumento de NKT en el grupo *Salmonella* y en el grupo *Salmonella*-dacarbazina con respecto al control ( $p=0,05$  y  $p=0,035$ , t test). Los ratones que recibieron el tratamiento combinado también presentan un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos T CD8 con respecto al grupo control ( $p=0,024$ , t test) y al grupo tratado con *Salmonella* ( $p=0,0025$ , t test). La mayor diferencia se aprecia en la población de linfocitos B, donde el grupo que recibió el tratamiento combinado presenta un menor porcentaje de estos cuando se los compara con el resto de los grupos (LVR01+DTIC vs SF y LVR01+DTIC vs LVR01  $p<0,001$ , LVR01+DTIC vs DTIC  $p=0,05$ , t test), y el grupo que presenta mayor porcentaje de linfocitos B es el de los ratones tratados con *Salmonella*.



**Figura 12.** Porcentaje de linfocitos en TDLN. Los resultados son representativos de 2 ensayos independientes. N=6 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, DTIC: dacarbazina, LVR01+DTIC: *Salmonella*-dacarbazina. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$  y \*\*\*  $p<0,001$ .

#### Expresión de quimioquinas y citoquinas en el microambiente tumoral

Se determinó la expresión de ARN mensajero de *Ccl2*, *Ccl3*, *Ccl4*, *Ccl5*, *Ccl20*, *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ifng*, *Il10*, *Il12* e *Il15* por PCR cuantitativa en tiempo real en muestras de tumor. Se observaron cambios significativos en la expresión de los genes *Cxcl9*, *Cxcl10*, *Ccl2* y *Ccl5* (Figura 13). La expresión de *Cxcl9* se vio aumentada en los grupos *Salmonella* y *Salmonella*-dacarbazina con respecto al grupo control ( $p=0,045$  y  $p<0,001$  respectivamente, t test), el gen *Cxcl10* aumenta su expresión en los tres grupos que recibieron tratamiento en comparación con el grupo no tratado (SF vs LVR01  $p=0,002$ , SF vs DTIC  $p<0,001$  y SF vs LVR01+DTIC  $p=0,043$ , t test). *Ccl2* presenta un aumento frente al grupo control en su expresión en los grupos dacarbazina ( $p=0,049$ , t test) y *Salmonella*-dacarbazina ( $p=0,05$ , t test), y por último, la expresión de *Ccl5* se ve aumentada en los grupos *Salmonella* y dacarbazina con respecto al control ( $p=0,013$  y  $p=0,024$ , t test) y en el grupo *Salmonella*-dacarbazina en comparación con dacarbazina ( $p=0,037$ , t test). No se encontró expresión en el resto de los genes estudiados (los resultados no se muestran en este informe).



**Figura 13.** Expresión de citoquinas y quimioquinas en tumor. Los resultados son representativos de 1 ensayo independiente. N=4 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, DTIC: dacarbazina, LVR01+DTIC: *Salmonella*-dacarbazina. Las diferencias significativas se señalan con el asterisco (\*): \* p<0,05.

#### Estudio de la expresión del receptor NKG2D en células NK y linfocitos T citotóxicos infiltrantes del tumor

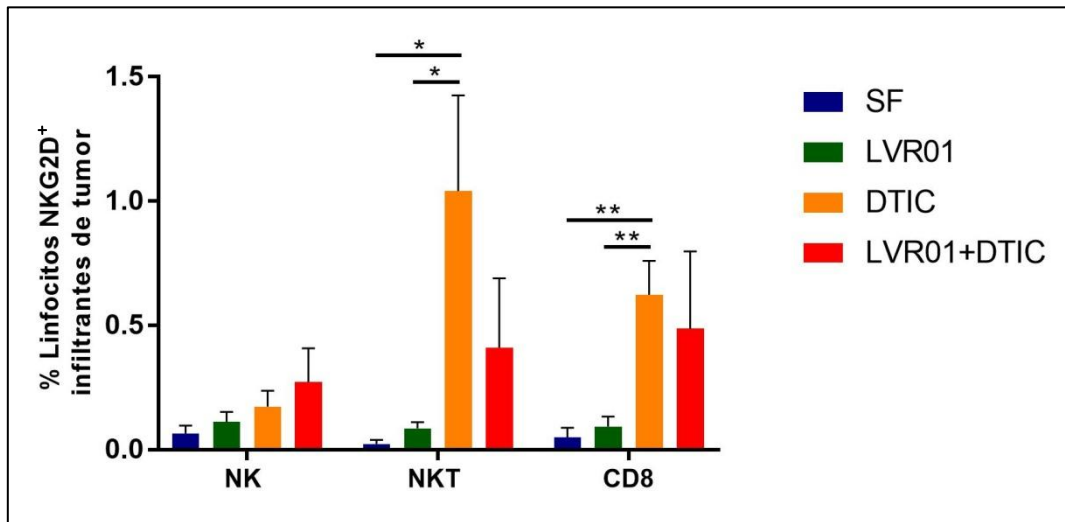
Se determinó la expresión del receptor NKG2D mediante citometría de flujo. Como muestra la Figura 14 no hay variaciones significativas en la expresión del mismo en las células NK. Con respecto a las células NKT y linfocitos T CD8 se observa un aumento significativo en la expresión del receptor NKG2D en los grupos tratados con dacarbazina en comparación con el grupo control (p=0,025 y p=0,0023, t test) y el grupo *Salmonella* (p=0,033 y p=0,0038, t test).

#### Evaluación del estado de activación de las células NK y los linfocitos T citotóxicos infiltrantes del tumor

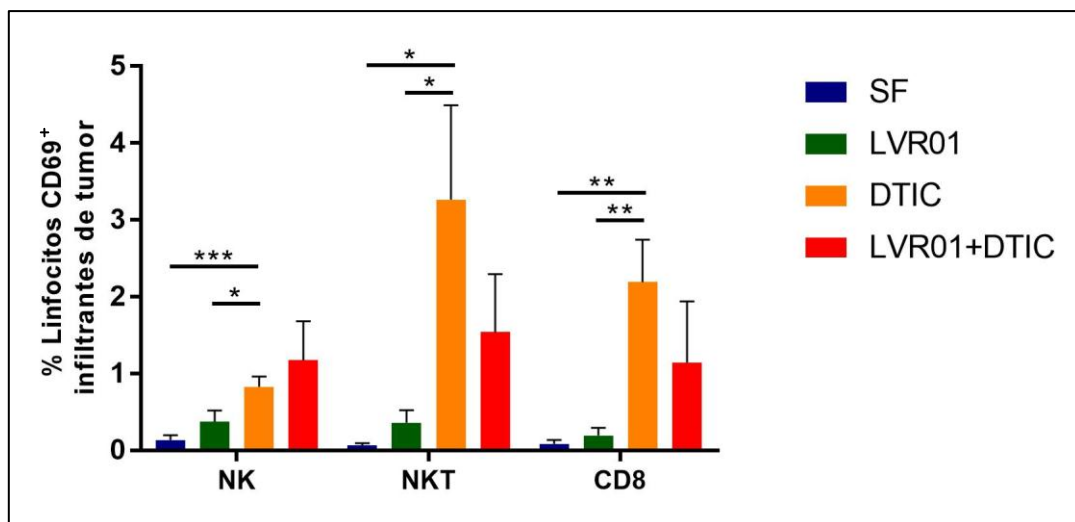
El estado de activación celular se evaluó midiendo la expresión en superficie de CD69 mediante citometría de flujo. Los ratones que recibieron de tratamiento exclusivamente dacarbazina presentaron un aumento significativo en los porcentajes de linfocitos que expresan CD69 con respecto al grupo control y al grupo *Salmonella* (Figura 15). Con



respecto a las células NK se obtuvo un  $p < 0,001$  para DTIC vs SF y un  $p = 0,049$  para DTIC vs LVR01, en NKT se obtuvo  $p = 0,018$  para DTIC vs SF y  $p = 0,03$  para DTIC vs LVR01, y para los linfocitos CD8 dió un  $p = 0,002$  para DTIC vs SF y  $p = 0,0037$  para DTIC vs LVR01 (t test para todos los casos).



**Figura 14.** Porcentajes de las células NK y de los linfocitos T citotóxicos infiltrantes del tumor que expresan el receptor NKG2D. Los resultados provienen de un único ensayo. N=6 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, DTIC: dacarbazina, LVR01+DTIC: *Salmonella*-dacarbazina. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$

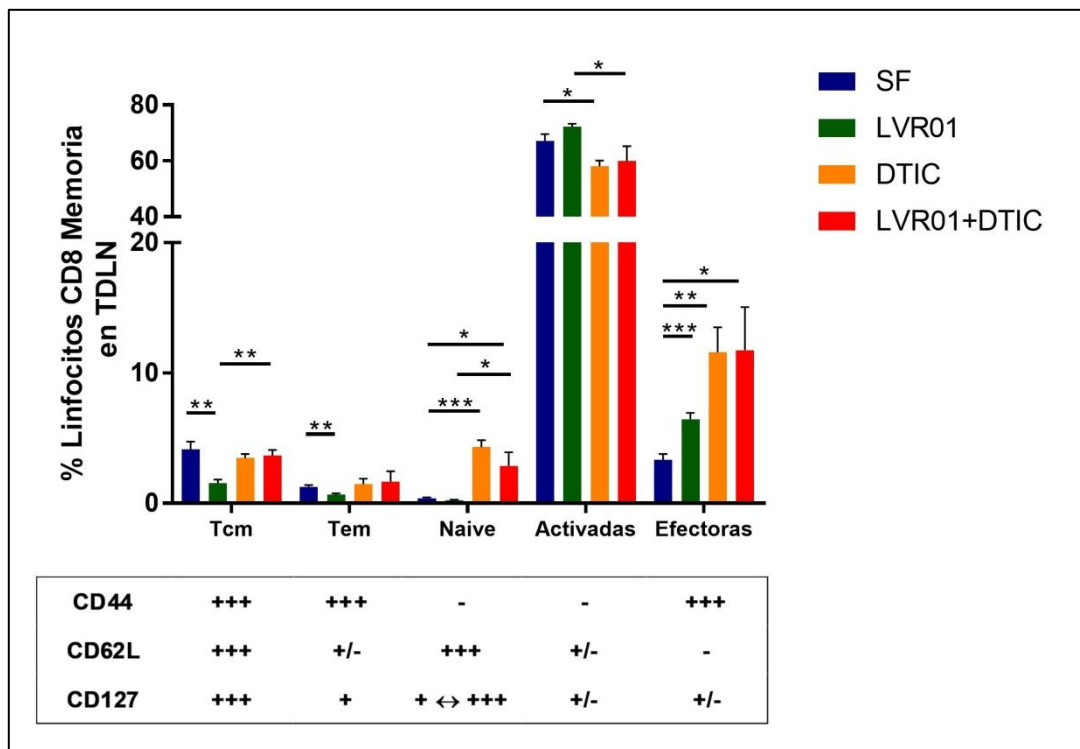


**Figura 15.** Porcentajes de las células NK y de los linfocitos T citotóxicos infiltrantes del tumor que expresan CD69. Los resultados provienen de un único ensayo. N=6 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, DTIC: dacarbazina, LVR01+DTIC: *Salmonella*-dacarbazina. Las diferencias significativas se señalan con el asterisco (\*): \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$

#### Evaluación del estado de memoria de los linfocitos T citotóxicos en TDLN

Para determinar las diferentes poblaciones de linfocitos T CD8, se realizó citometría de flujo y se definieron según la expresión de distintos marcadores de superficie como se

indica en la tabla de la Figura 16. Se observa en todos los grupos que una gran parte de la población de linfocitos T CD8 se encuentra activada, dentro de las células activadas se hallaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo dacarbazina ( $p=0,016$ , t test) y entre el grupo *Salmonella* y *Salmonella*-dacarbazina ( $p=0,046$ , t test). Con respecto a las células efectoras encontramos un aumento significativo de esta población en los grupos *Salmonella* ( $p<0,001$ , t test), dacarbazina ( $p=0,0019$ , t test) y *Salmonella*-dacarbazina ( $p=0,03$ , t test) con respecto al grupo control. En el grupo tratado con la terapia combinada hay un aumento significativo de las células naive en comparación con los grupos control ( $p=0,037$ , t test) y *Salmonella* ( $p=0,03$ , t test). Además, también se observa un aumento de la población de células naive en el grupo dacarbazina con respecto a *Salmonella* ( $p<0,001$ , t test). La población de linfocitos T de memoria central se encuentra aumentada en el grupo control con respecto al grupo *Salmonella* ( $p=0,003$ , t test) y también se observa un aumento en el grupo *Salmonella*-dacarbazina con respecto a *Salmonella* ( $p=0,002$ , t test). Los linfocitos T efectoros de memoria están aumentados en el grupo control con respecto al grupo *Salmonella* ( $p=0,0012$ , t test), en el resto de los grupos no se encontraron diferencias significativas para esta población.

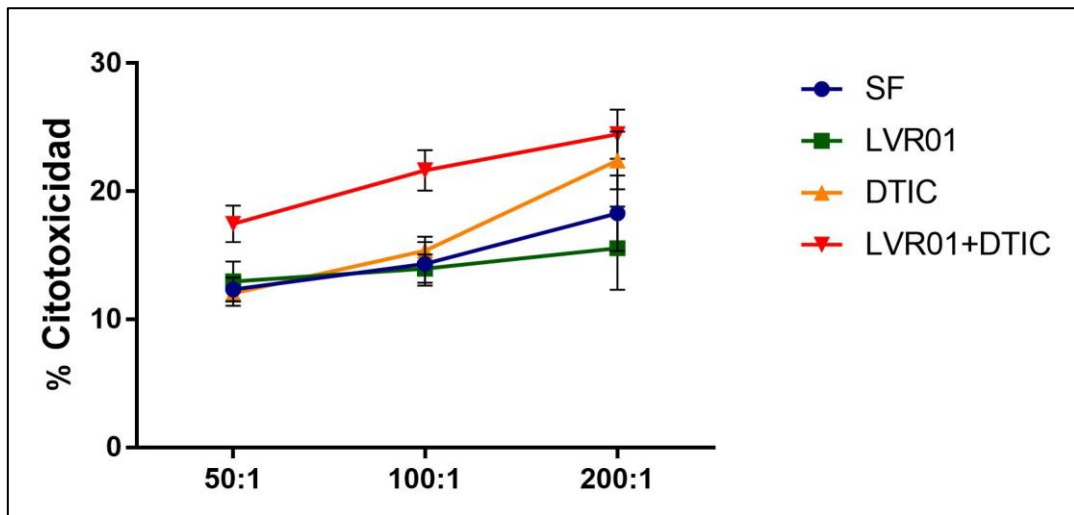


**Figura 16.** Estado de memoria de linfocitos T citotóxicos. Los resultados provienen de un único ensayo. N=6 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, DTIC: dacarbazina, LVR01+DTIC: *Salmonella*-dacarbazina, Tcm: linfocitos T de memoria central, Tem: linfocitos T de memoria efectoras. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$  y \*\*\*  $p<0,001$

#### Evaluación de la función citotóxica de células NK

Los esplenocitos fueron utilizados como células efectoras (E) y las células YAC1, sensibles a la acción de células NK, como células target o blanco (B). Los efectoras fueron incubados con las células blanco en diferentes relaciones E:B(200:1, 100:1, 50:1). Las células blanco también fueron incubadas solas, con el fin de medir la muerte espontánea de las mismas,

la cual resultó nula. Se observó un aumento significativo en el porcentaje de citotoxicidad mediada por NK en el grupo *Salmonella*-dacarbazina respecto al grupo control y al grupo dacarbazina en las relaciones 100:1 y 50:1, y con respecto a los ratones tratados con *Salmonella* presentó un aumento significativo en las relaciones 200:1 y 100:1 (Figura 17). Cabe destacar que dichos aumentos en la citotoxicidad son debidos a una mayor activación de las células NK ya que no se registraron variaciones significativas en los porcentajes de células NK en bazo por los distintos tratamientos (los resultados no se muestran en este informe).



**Figura 17.** Citotoxicidad mediada por NK. Los resultados provienen de un único ensayo. N=6 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, DTIC: dacarbazina, LVR01+DTIC: *Salmonella*-dacarbazina.

#### Evaluación de la respuesta humoral contra células de melanoma

Con respecto a los resultados del análisis de la respuesta humoral contra las células de melanoma no se detectaron anticuerpos específicos frente a las mismas en ningún grupo de los animales tratados (los resultados no se muestran en este informe).

## 7. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó el uso combinado de *Salmonella* viva atenuada con dacarbazina como una nueva estrategia terapéutica frente al melanoma. Ambas terapias han sido estudiadas de modo independiente y han demostrado tener un efecto antitumoral en este modelo de cáncer [19]. A pesar de esto los beneficios reportados en ambos casos se dan en plazos de tiempo cortos mientras que el pronóstico a largo plazo parece no variar, ya que eventualmente se genera resistencia frente a las diversas monoterapias [41]. Resulta pues interesante la combinación de terapias como estrategia de contener y limitar este escape tumoral, y entender cuáles son los mecanismos que están implicados en estas respuestas antitumorales inducidas.

Hervieu y colaboradores describieron que la dacarbazina además de poseer un efecto citotóxico directo sobre las células tumorales también posee un efecto inmunomodulador caracterizado por un aumento de la expresión de ligandos de NKG2D en las células tumorales, lo que conduce a la activación de células NK y a la secreción de IFN- $\gamma$ . El IFN- $\gamma$  lleva a un aumento de la expresión de MHC clase I en las células tumorales haciéndolas más susceptibles a la acción de los linfocitos T citotóxicos [21]. El estudio de las poblaciones linfocitarias infiltrantes de tumor mostró un aumento de NKT, linfocitos CD8, linfocitos CD4 y células B en los ratones tratados con dacarbazina respecto al control. En cuanto a los granulocitos se observó un aumento de las poblaciones de neutrófilos y macrófagos, así como de células dendríticas en el microambiente tumoral de los ratones que recibieron dacarbazina frente al grupo control (Figura 11). El reclutamiento de las células inmunes en el tumor es consecuente con el aumento de la expresión de los genes *Ccl2*, *Ccl5* y *Cxcl10* en el microambiente tumoral en el grupo dacarbazina con respecto al grupo control (Figura 13). CCL2 es un potente quimioatrayente de monocitos, linfocitos T memoria y células NK hacia el tumor. CCL5 también es un fuerte reclutador de linfocitos T y células NK [48]. CXCL10 participa en el reclutamiento de monocitos, NK y linfocitos T en el microambiente tumoral, y además se ha descrito que interfiere directamente sobre el crecimiento tumoral, reduciendo la proliferación e invasión de las células de melanoma [49]. En lugar de estudiar la expresión de ligandos de NKG2D en las células tumorales se realizó un ensayo donde se evaluó la expresión del receptor NKG2D en células NK, NKT y linfocitos T citotóxicos, observando un aumento en la expresión del receptor en NKT y linfocitos CD8 en los ratones tratados con dacarbazina con respecto al control y a la monoterapia con *Salmonella* (Figura 14). Los tumores primarios suelen expresar ligandos de NKG2D en su superficie, sin embargo desencadenan diversos mecanismos que les permiten evadir la respuesta inmune por ejemplo disminuyendo la expresión de los receptores NKG2D en las células NK y linfocitos T CD8 [50]. Por tanto, la expresión del receptor NKG2D en los ratones que recibieron dacarbazina evidencia el efecto inmunomodulador que presenta este tratamiento favoreciendo la respuesta antitumoral. Al igual que en el experimento realizado por Hervieu y colaboradores, se evaluó el estado de activación de las células midiendo la expresión de CD69 en la superficie y se encontró que los ratones tratados con dacarbazina muestran un mayor porcentaje de células NK y linfocitos T citotóxicos activados que los grupos control y *Salmonella* (Figura 15). El tratamiento con dacarbazina se asocia a un retardo en el crecimiento tumoral junto a un aumento en la supervivencia de los ratones con respecto al grupo control, pero los efectos no son sostenidos en el tiempo.

En cuanto al tratamiento con *Salmonella* se han descrito diversos mecanismos por el que se da el efecto antitumoral por ejemplo: estimulando la respuesta inmune en el hospedero [29] y desencadenando apoptosis en las células tumorales [30]. Algunos componentes de *Salmonella* como el lipopolisacárido (LPS) y la flagelina promueven una fuerte señal proinflamatoria, que conduce a la secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias induciendo la infiltración de células inmunes en el tumor, principalmente neutrófilos [51]. Se ha descrito que *Salmonella* incrementa la expresión de quimioquinas dependientes de interferón en el tumor lo que lleva al reclutamiento de células NK y linfocitos T al mismo [30]. El estudio de las poblaciones infiltrantes de tumor muestra un aumento en el porcentaje de neutrófilos en el grupo tratado con *Salmonella* con respecto al grupo control (Figura 11), también se halló un aumento en la expresión de los genes *Cxcl9*, *Cxcl10* y *Ccl5* en los ratones tratados con *Salmonella* con respecto al control (Figura 13). CXCL9 es un quimioatrayente de linfocitos T que al igual que CXCL10 su secreción es inducida por IFN- $\gamma$  (las funciones de CXCL10 y CCL5 fueron explicadas anteriormente). Estos resultados son coherentes con los mecanismos de acción descritos en la literatura y comentados anteriormente. Con respecto a las poblaciones linfocitarias en el ganglio linfático drenante del tumor se observa un aumento de la población de células B en el grupo tratado con *Salmonella* en comparación con el grupo que recibió la terapia combinada (Figura 12). Se ha descrito que las células B juegan un rol fundamental en la actividad antitumoral mediada por *Salmonella*, ya que impiden la diseminación de la bacteria a otros órganos sanos concentrando su acción a nivel del tumor [30]. En este estudio también se evaluó la respuesta humoral frente a las células de melanoma. De acuerdo a resultados previos del grupo de trabajo, se esperaba encontrar anticuerpos específicos frente a las mismas en el grupo tratado con *Salmonella*. La no detección de los mismos en ningún grupo de animales nos hace pensar en alguna dificultad con la técnica. Al igual que el tratamiento con dacarbazina, la monoterapia con *Salmonella* presenta una extensión de la sobrevida asociada a un enlentecimiento del tamaño tumoral con respecto al grupo control, pero como mencionamos anteriormente esta respuesta no perdura en el tiempo y los tumores comienzan a crecer progresivamente.

Con respecto al uso de la terapia combinada, observamos un incremento en los efectos terapéuticos y perduración de los mismos en el tiempo. Existen reportes acerca del uso combinado de ciclofosfamida (agente quimioterapéutico) junto con *Salmonella* en modelos murinos de melanoma y los resultados obtenidos demostraban una mejora en el efecto antitumoral, así como en el estado sanitario de los animales tratados [52]. Los ensayos *in vivo* realizados en este estudio muestran que el tratamiento combinado con *Salmonella*-dacarbazina aumenta la sobrevida global de los ratones (Figura 9), disminuye significativamente los volúmenes tumorales (Figura 7) sin afectar el status sanitario, en lo que refiere al parámetro masa corporal, de los animales con respecto al resto de los grupos (Figura 8). Además, el hecho de que tanto en apariencia como en tamaño el ganglio linfático drenante del tumor y el bazo de los animales que recibieron la terapia combinada sean similares a los del grupo control nos indica que hay una recuperación hacia la normalidad de los mismos. Esta respuesta más eficiente al tratamiento puede explicarse por la existencia de un sinergismo en los efectos de ambas terapias. El estudio de las poblaciones infiltrantes de tumor muestra un aumento en la población de neutrófilos en el grupo *Salmonella*-dacarbazina con respecto al grupo dacarbazina y al grupo control (Figura 11 B), esta respuesta es característica del

tratamiento con *Salmonella* como se explicó anteriormente. También se aprecia un aumento en la población de las células NK en el grupo que recibió la terapia combinada en comparación con el resto de los grupos (Figura 11 A). El aumento en la población NK no se observó en los ratones que recibieron las diferentes monoterapias lo que nos indica que no sólo se aprecia la suma de los efectos individuales de los tratamientos sino que la acción combinada de ambos da lugar a nuevos efectos. Con respecto a la expresión de genes en el microambiente tumoral se ve un aumento en la expresión de *Cxcl9*, *Cxcl10* y *Ccl2* en los ratones que recibieron la terapia combinada frente al grupo control y también hay un fuerte aumento en la expresión de *Ccl5* en comparación con el grupo dacarbazina (Figura 13), aquí vemos reflejado el efecto sinérgico de las terapias. A nivel del ganglio linfático drenante de tumor, en el grupo *Salmonella*-dacarbazina, se observa un aumento en la población de NKT respecto al grupo control y un aumento en la población de linfocitos T CD8 respecto al grupo control y al grupo *Salmonella*. Se observa un menor porcentaje de células B en comparación con el resto de los grupos (Figura 12), al expresar los resultados en porcentajes el aumento de determinadas poblaciones conlleva necesariamente a un descenso en el porcentaje de otras sin que ello implique que haya menos cantidad de células. Con este resultado podemos inferir que hay una respuesta celular más potente en el grupo que recibe la terapia combinada, lo que es consecuente con el resto de los resultados observados en este grupo. Se encuentra bien establecido que la infiltración tumoral por células T, especialmente por Th1 y linfocitos T CD8, se correlaciona con un mejor pronóstico en pacientes con cáncer [53]. Cabe destacar que la terapia combinada induce un aumento en porcentaje de linfocitos T CD8 efectores que lo podemos vincular con la respuesta más eficiente a la terapia en este grupo. Asimismo, las células NK de bazo presentaban mayor actividad citotóxica en el grupo tratado con *Salmonella*-dacarbazina (Figura 17), este efecto se debe a un mayor grado de activación de las células NK y se puede atribuir al efecto sinérgico de ambas terapias. Con estos resultados podemos decir que la terapia combinada de *Salmonella* en conjunto con dacarbazina resulta una opción terapéutica interesante para el tratamiento del melanoma, ya que presenta un mayor efecto antitumoral, menor grado de toxicidad y perdura más en el tiempo.

## 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este estudio demostramos la efectividad de la terapia combinada de *Salmonella* con dacarbazina en un modelo de melanoma murino. Probamos que con este tratamiento se produce un incremento de la respuesta antitumoral, debido a que se da un efecto sinérgico y/o aditivo en las respuestas de ambas terapias utilizadas. Esta eficiencia se ve reflejada *in vivo* en: (i) la reducción de los volúmenes tumorales en los ratones tratados, en algunos casos llegando a la remisión completa del tumor; (ii) la extensión de la supervivencia global en los animales que recibieron este tratamiento; (iii) no se vió afectado el estado sanitario de los animales, esto es de suma importancia porque nos indica que el tratamiento no presenta alta toxicidad.

El análisis de la respuesta anti-tumoral nos indica que la misma tiene un fuerte componente celular mediado principalmente por las células citotóxicas. Además, éstas mostraron tener un mayor grado de activación, función efectora y/o citotoxicidad con respecto a los otros grupos, lo que apoya la teoría de que cumplen un rol fundamental en la respuesta obtenida.

Si bien en este trabajo se abordaron parte de los mecanismos de acción implicados en esta respuesta quedan varios aspectos por elucidar. A continuación se presenta una lista de algunos ensayos que serían interesantes llevar a cabo a raíz de este estudio:

- Investigar qué es lo que sucede a nivel de las células inmunosupresoras cuando se utiliza la terapia combinada, ver si las mismas están presentes en este escenario y cuál es el rol que cumplen.
- Aislar las células citotóxicas efectoras generadas en los ratones que recibieron la terapia combinada y evaluar su efecto al introducirlas en un animal enfermo.
- Desafiar a los ratones que presentan remisión completa inyectando nuevamente células B16F1 de modo subcutáneo (de la manera que se encuentra estandarizado). Estudiar la respuesta que desencadenen los mismos con el fin de evaluar si el tratamiento inicial que recibieron estos ratones generó células memoria y si las mismas son suficientes para combatir un nuevo tumor.

## **9. AGRADECIMIENTOS**

A María, tutora de carrera y orientadora de pasantía, gracias por aceptarme desde el inicio, por tu buena disposición y siempre tener una mirada positiva frente a cualquier problema que se pudiera presentar en el proceso.

A Amy, co-orientadora de pasantía, gracias por todo lo que me enseñaste en este tiempo y por la paciencia que me tuviste.

A mi familia y amigos, gracias por acompañarme y apoyarme durante todos los cambios vividos que hoy me traen hasta acá.



## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Nestle, F.O.K., H, *Melanoma*. 1st ed. Dermatología, ed. J.L. Bologna. 2005. 1789–1816.
2. Olszanski, A.J., *Current and future roles of targeted therapy and immunotherapy in advanced melanoma*. J Manag Care Spec Pharm. **20**(4): p. 346-56.
3. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer Statistics, 2017*. CA Cancer J Clin. **67**(1): p. 7-30.
4. Eggermont, A.M., A. Spatz, and C. Robert, *Cutaneous melanoma*. Lancet. **383**(9919): p. 816-27.
5. Musetti, C.e.a., *V ATLAS DE MORTALIDAD POR CANCER EN EL URUGUAY 2009-2013*, COMISION HONORARIA DE LUCHA CONTRA EL CANCER Registro Nacional de Cáncer.
6. Balch, C.M., et al., *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*. J Clin Oncol, 2009. **27**(36): p. 6199-206.
7. Shah, D.J. and R.S. Dronca, *Latest advances in chemotherapeutic, targeted, and immune approaches in the treatment of metastatic melanoma*. Mayo Clin Proc. **89**(4): p. 504-19.
8. Halama, N., I. Zoernig, and D. Jaeger, *Advanced malignant melanoma: immunologic and multimodal therapeutic strategies*. J Oncol. **2010**: p. 689893.
9. Morton, D.L., et al., *Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes. Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic*. Ann Surg, 1991. **214**(4): p. 491-9; discussion 499-501.
10. Morton, D.L., et al., *Demonstration of antibodies against human malignant melanoma by immunofluorescence*. Surgery, 1968. **64**(1): p. 233-40.
11. Cipponi, A., et al., *Tumor-infiltrating lymphocytes: apparently good for melanoma patients. But why?* Cancer Immunol Immunother. **60**(8): p. 1153-60.
12. Boasberg, P.D., et al., *Enhanced survival associated with vitiligo expression during maintenance biotherapy for metastatic melanoma*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(12): p. 2658-63.
13. Cunha, D., F.A. Pacheco, and J. Cardoso, *Vitiligo: a good prognostic factor in melanoma?* Dermatol Online J, 2009. **15**(2): p. 15.
14. Avogadri, F., et al., *Cancer immunotherapy based on killing of Salmonella-infected tumor cells*. Cancer Res, 2005. **65**(9): p. 3920-7.
15. Redondo, P., et al., *Imiquimod enhances the systemic immunity attained by local cryosurgery destruction of melanoma lesions*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(7): p. 1673-80.
16. van Leeuwen, M.T., et al., *Effect of reduced immunosuppression after kidney transplant failure on risk of cancer: population based retrospective cohort study*. BMJ. **340**: p. c570.
17. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science. **331**(6024): p. 1565-70.

18. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 329-60.
19. Bertolotto, C., *Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options*. Scientifica (Cairo). **2013**: p. 635203.
20. Owen J.A, P.J., Stranford S.A., *Kuby Inmunología*. 7 ed, ed. McGraw-Hill. 2014. 830.
21. Hervieu, A., et al., *Dacarbazine-mediated upregulation of NKG2D ligands on tumor cells activates NK and CD8 T cells and restrains melanoma growth*. J Invest Dermatol. **133**(2): p. 499-508.
22. Gogas, H., A. Polyzos, and J. Kirkwood, *Immunotherapy for advanced melanoma: fulfilling the promise*. Cancer Treat Rev. **39**(8): p. 879-85.
23. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med. **363**(8): p. 711-23.
24. Chapman, P.B., et al., *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. N Engl J Med. **364**(26): p. 2507-16.
25. Ebelt, N.D. and E.R. Manuel, *Utilizing Salmonella to treat solid malignancies*. J Surg Oncol. **116**(1): p. 75-82.
26. Pawelek, J.M., K.B. Low, and D. Bermudes, *Tumor-targeted Salmonella as a novel anticancer vector*. Cancer Res, 1997. **57**(20): p. 4537-44.
27. Luo, X., et al., *Antitumor effect of VNP20009, an attenuated Salmonella, in murine tumor models*. Oncol Res, 2001. **12**(11-12): p. 501-8.
28. Pawelek, J.M., K.B. Low, and D. Bermudes, *Bacteria as tumour-targeting vectors*. Lancet Oncol, 2003. **4**(9): p. 548-56.
29. Shahabi, V., et al., *Live, attenuated strains of Listeria and Salmonella as vaccine vectors in cancer treatment*. Bioeng Bugs. **1**(4): p. 235-43.
30. Chang, W.W. and C.H. Lee, *Salmonella as an innovative therapeutic antitumor agent*. Int J Mol Sci. **15**(8): p. 14546-54.
31. Low, K.B., et al., *Construction of VNP20009: a novel, genetically stable antibiotic-sensitive strain of tumor-targeting Salmonella for parenteral administration in humans*. Methods Mol Med, 2004. **90**: p. 47-60.
32. Tacket, C.O., et al., *Phase 2 clinical trial of attenuated Salmonella enterica serovar typhi oral live vector vaccine CVD 908-htrA in U.S. volunteers*. Infect Immun, 2000. **68**(3): p. 1196-201.
33. Cunningham, C. and J. Nemunaitis, *A phase I trial of genetically modified Salmonella typhimurium expressing cytosine deaminase (TAPET-CD, VNP20029) administered by intratumoral injection in combination with 5-fluorocytosine for patients with advanced or metastatic cancer. Protocol no: CL-017. Version: April 9, 2001*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(12): p. 1594-6.
34. Kirkpatrick, B.D., et al., *Evaluation of Salmonella enterica serovar Typhi (Ty2 aroC-ssaV-) M01ZH09, with a defined mutation in the Salmonella pathogenicity island 2, as a live, oral typhoid vaccine in human volunteers*. Vaccine, 2006. **24**(2): p. 116-23.

35. Niethammer, A.G., et al., *Double-blind, placebo-controlled first in human study to investigate an oral vaccine aimed to elicit an immune reaction against the VEGF-Receptor 2 in patients with stage IV and locally advanced pancreatic cancer*. BMC Cancer. **12**: p. 361.
36. Kopecko, D.J., et al., *Genetic stability of vaccine strain Salmonella Typhi Ty21a over 25 years*. Int J Med Microbiol, 2009. **299**(4): p. 233-46.
37. Agorio, C., et al., *Live attenuated Salmonella as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma*. J Gene Med, 2007. **9**(5): p. 416-23.
38. Grille, S., et al., *A therapeutic vaccine using Salmonella-modified tumor cells combined with interleukin-2 induces enhanced antitumor immunity in B-cell lymphoma*. Leuk Res. **37**(3): p. 341-8.
39. Grille, S., et al., *Salmonella enterica serovar Typhimurium immunotherapy for B-cell lymphoma induces broad anti-tumour immunity with therapeutic effect*. Immunology. **143**(3): p. 428-37.
40. Kramer, M.G., et al., *Neoadjuvant administration of Semliki Forest virus expressing interleukin-12 combined with attenuated Salmonella eradicates breast cancer metastasis and achieves long-term survival in immunocompetent mice*. BMC Cancer. **15**: p. 620.
41. Najem, A., et al., *New Drug Combination Strategies in Melanoma: Current Status and Future Directions*. Anticancer Res. **37**(11): p. 5941-5953.
42. Chabalgoity, J.A., et al., *Salmonella typhimurium as a basis for a live oral Echinococcus granulosus vaccine*. Vaccine, 2000. **19**(4-5): p. 460-9.
43. Harlin, H., et al., *Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment*. Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 3077-85.
44. Maghazachi, A.A., *Role of chemokines in the biology of natural killer cells*. Curr Top Microbiol Immunol. **341**: p. 37-58.
45. Fujimura, T., et al., *Cytotoxic antimelanoma drugs suppress the activation of M2 macrophages*. Exp Dermatol.
46. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
47. Duan X-M, H.J., Ma H-X, et al, *A flow cytometric assay for simultaneously measuring the proliferation and cytotoxicity of cytokine induced killer cells in combination with carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) labeling*. African J Biotechnol., 2011. **10**(65): p. 14598-14607.
48. Palacios-Arreola, M.I., et al., *The role of chemokines in breast cancer pathology and its possible use as therapeutic targets*. J Immunol Res. **2014**: p. 849720.
49. Antonicelli, F., et al., *CXCL10 reduces melanoma proliferation and invasiveness in vitro and in vivo*. Br J Dermatol. **164**(4): p. 720-8.

50. Lanier, L.L., *NKG2D receptor and its ligands in host defense*, in *Cancer Immunol Res.* 2015: San Francisco, California.
51. Chang, S.Y., Y.J. Kim, and H.J. Ko, *Potential therapeutic anti-tumor effect of a Salmonella-based vaccine*. *Hum Vaccin Immunother.* **9**(8): p. 1654-60.
52. Jia, L.J., et al., *Tumor-targeting Salmonella typhimurium improves cyclophosphamide chemotherapy at maximum tolerated dose and low-dose metronomic regimens in a murine melanoma model*. *Int J Cancer*, 2007. **121**(3): p. 666-74.
53. Pages, F., et al., *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored*. *Oncogene.* **29**(8): p. 1093-102.