



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Rol de la flagelina en el efecto antitumoral de *Salmonella*

Universidad de la República, Facultad de Ciencias

Licenciatura en Bioquímica

2011

Amy Mónaco Patiño

Orientador: Dra. María Moreno

Co-orientador: Dr. Alejandro Chabalgoity

Departamento de Desarrollo Biotecnológico,

Instituto de Higiene, Facultad de Medicina

I. Contenido

I.	Contenido	2
II.	Abreviaturas	4
III.	Resumen.....	5
IV.	Introducción	6
V.	Objetivos generales y específicos.....	11
	i. Objetivo general.....	11
	ii. Objetivos específicos.....	11
VI.	Materiales y Métodos	12
	i. Línea celular	12
	ii. Medios de cultivo	12
	iii. Cepas bacterianas y construcción de mutantes.....	12
	iv. Animales	13
	v. Amplificación por PCR	13
	vi. Ensayos de Movilidad.....	15
	vii. Ensayos de Aglutinación.....	16
	ix. Ensayos de Invasión y Replicación.....	16
	x. Determinación de apoptosis por MTT	16
	xi. Inducción de la respuesta inmune <i>in vitro</i>	17
	xii. Inducción de tumores y efecto tumoricida	17

VII.	Resultados	19
i.	Construcción y caracterización de una cepa de <i>S. Typhimurium</i> carente de flagelina...	19
a.	Confirmación por PCR.....	19
b.	Aglutinación	23
c.	Ensayo de Movilidad al microscopio	24
d.	Ensayo de Movilidad en agar blando.....	25
e.	Curva de crecimiento.....	26
ii.	Ensayos de Invasión-Replicación.....	27
iii.	Ensayo de viabilidad celular	29
iv.	Expresión de moléculas coestimuladoras	29
v.	Inducción tumoral y efecto tumoricida.....	32
VIII.	Discusión	34
IX.	Conclusiones y Perspectivas.....	36
X.	Agradecimientos.....	37
XI.	Referencias Bibliográficas.....	38

II. Abreviaturas

(recordar ordenar alfabéticamente cuando tenga todas las abreviaciones)

APC: Célula presentadora de antígeno

BCG: Bacilo Calmette Guerin

LPS: Lipopolisacárido

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MOI: Multiplicidad de infección

ON: Toda la noche (corresponde a 16 horas aproximadamente)

PAMP: Motivos moleculares asociados a patógenos

pb: Pares de bases

PRR: Receptor de reconocimiento de PAMP

SF: Suero Fisiológico

TLR: Receptor tipo Toll

III. Resumen

La compleja interacción entre el sistema inmune (SI) y el cáncer ha sido minuciosamente estudiada por décadas. La relevancia de una respuesta inmune efectiva para prevenir el desarrollo de tumores está sustentada por observaciones en pacientes inmunocomprometidos, los cuales presentan una mayor incidencia de tumores.

Salmonellas vivas atenuadas demostraron ser efectivas para la prevención y tratamiento del cáncer en diversos modelos experimentales gracias a su actividad anti-tumoral intrínseca y su capacidad de activar el sistema inmune. Recientemente, en los laboratorios donde se realizó esta pasantía, se ha demostrado el efecto anti-tumoral de una cepa atenuada de *Salmonella* Typhimurium, LVR01 (*aroC*-), en un modelo de linfoma a células B. Dicho efecto podría ser debido a la capacidad de *Salmonella*, a través de sus PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) como LPS y flagelina, de inducir la expresión de moléculas coestimuladoras en las células B, aumentando la capacidad presentadora de la misma célula tumoral. De hecho, una vacuna basada en células tumorales infectadas *ex vivo* con *Salmonella* resultó ser altamente efectiva, induciendo una respuesta inmune específica más potente.

En el presente trabajo se propuso evaluar en particular la relevancia de la flagelina en la observada capacidad de *Salmonella*. Para ello, se construyó un mutante carente de flagelina, y se comparó su capacidad invasiva, replicativa y tumoricida con la cepa parental, no encontrándose diferencias significativas entre ambas. Una hipótesis para explicar esta carencia de efecto detectable, es que la flagelina es sólo uno de varios PAMPs responsables de la activación del sistema inmune que presenta *Salmonella*, razón por la cual se propone como perspectiva a futuro generar mutantes múltiples que carezcan de flagelina mas otros PAMPs bacterianos para realizar estudios similares. De esta manera, se pretende avanzar en el conocimiento del mecanismo de acción anti-tumoral de *Salmonella* para lograr un acercamiento a una posible futura aplicación clínica a largo plazo, en un intento de ofrecer mejores opciones a las actuales en el tratamiento de esta enfermedad que compromete la calidad de vida de tantos pacientes a nivel mundial.

IV. Introducción

Los tumores malignos constituyen la segunda causa de muerte en Uruguay luego de las enfermedades cardiovasculares, dando cuenta actualmente de más de 24,8% de todas las defunciones [1]. Las terapias ofrecidas actualmente como cirugía, quimioterapia o radioterapia tienen limitaciones considerables, incluyendo toxicidad, penetración inadecuada de tejidos y poca especificidad tumoral, entre otras; y frecuentemente se asocian a efectos secundarios severos [2-3].

Desde mediados del siglo XIX, algunas bacterias y sus productos se han utilizado como agentes terapéuticos para tratar tumores sólidos [4-5]. Uno de los ejemplos más notorios del caso es del uso de la cepa de BCG de *Mycobacterium bovis* para el tratamiento del cáncer de vejiga. Varios estudios han demostrado una clara relación entre el uso inmunoproliférico de BCG luego de la remoción quirúrgica del tumor y la disminución de la tasa de recurrencia del mismo [6-7], llevando dicha terapia a una extensa aplicación clínica.

Hace ya varios años, se sabe que cepas de bacterias anaerobias facultativas como *Salmonella*, son capaces de acumularse y replicarse preferencialmente en los tejidos tumorales en modelos murinos [8], induciendo en algunos casos un enlentecimiento en el desarrollo tumoral y prolongando la sobrevivencia de los animales [9]. También ha sido reportado el uso de otras bacterias como *Shigella* [10] o *Clostridium* [11].

Salmonella además posee muchas características que la postulan como vector ideal de vacunación (Figura 1). Algunas de estas se detallan a continuación:

- Facilidad de crecimiento en condiciones de laboratorio. *Salmonella* tiene ciclos de replicación cortos y los costos de manutención de las cepas son muy bajos. Además, la posibilidad de inmunización vía oral hace que su utilización sea muy sencilla, generando una respuesta inmune tanto local como sistémica [12].

- Capacidad de acumularse y replicarse preferentemente en el microambiente tumoral [13]. Esa replicación preferencial ofrece el gran potencial de amplificar el efecto terapéutico únicamente en el sitio tumoral, evitando de esa manera la toxicidad en los tejidos circundantes. Debe tenerse en cuenta que la biodistribución de *Salmonella* depende de la vía de inoculación y del tipo de tumor.

- *Salmonella* es capaz de multiplicarse tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, lo cual la habilita a replicarse tanto en tumores grandes como pequeños. Además, el poseer flagelo le permite dispersarse en la totalidad del tumor (zonas hipóxicas y necróticas), atraída por las altas concentraciones de nutrientes disponibles en el microambiente tumoral sensadas por receptores localizados en los polos de la membrana externa de estas bacterias, como TAR y TRG [14]. Por microscopía se ha observado que la gran mayoría de las bacterias se localizan en las regiones necróticas de tumores sólidos y en la interfase entre la zona necrótica y la periférica [5, 15-16].

- *Salmonella* puede ser atenuada a través de mutaciones genéticas seleccionadas, posibilitando la creación de cepas recombinantes atenuadas, con función de vector en condiciones ideales: ciclo de replicación limitado y pérdida de virulencia. De ésta manera, causa patogénesis limitada y en caso de diseminación puede ser controlada, ya que es sensible a un amplio espectro de antibióticos. La bioseguridad del uso de estas cepas atenuadas ha sido demostrada en ensayos clínicos fase I y II, tanto en pacientes sanos como en pacientes con melanoma en fase metastásica [17-19]. De hecho, la FDA (Food and Drug Administration) ha aprobado el uso de una cepa de *Salmonella* Typhi en humanos.

- *Salmonella* posee una actividad anti-tumoral intrínseca ampliamente demostrada, que depende de la cepa y el modelo experimental utilizado [13, 20]. Se ha comprobado que es capaz de inhibir el crecimiento de tumores ya establecidos, así como metástasis llevando a una reducción en el número y tamaño de micrometástasis [21].

Clásicamente se atribuye el efecto antitumoral de las infecciones bacterianas a dos tipos de mecanismos diferentes: Por un lado, a una acción anti-tumoral intrínseca observada en *Salmonella*, así como en varias especies de *Clostridium* productoras de exotoxinas histotóxicas con efecto oncolítico. Por otro lado, al efecto de estimulación inespecífica del sistema inmune, que conlleva a la activación de mecanismos efectores implicados en la inmunidad antitumoral, como es el caso de las infecciones por *Listeria* o *Salmonella* [22]. En este contexto, luego de la infección con *Salmonella* se produce una gran infiltración de neutrófilos [4] y se activan vías de señalización como NF κ B y MAPK que llevan a la secreción de varias citoquinas con acción proinflamatoria, entre las cuales se destacan IL-6, IL-12 y TNF- α [23]. Distintas especies del género *Salmonella* son capaces de estimular la respuesta inmune del hospedero dado que

expresan PAMPs (Motivos Moleculares Asociados a Patógenos, del inglés Pathogen-Associated Molecular Patterns), los cuales pueden ser reconocidos por células del sistema inmune innato, desencadenando una respuesta apropiada. Entre los PAMPs más estudiados están el LPS y la flagelina que activan los receptores del tipo Toll (TLR, del inglés Toll Like Receptor) 4 y 5, respectivamente [23].

- Además, *Salmonella* puede ser fácilmente modificada de manera de expresar y presentar concomitantemente antígenos tumorales, agentes oncolíticos o moléculas moduladoras de la respuesta inmune contra el tumor, actuando como vector de liberación de moléculas de interés en el entorno tumoral.

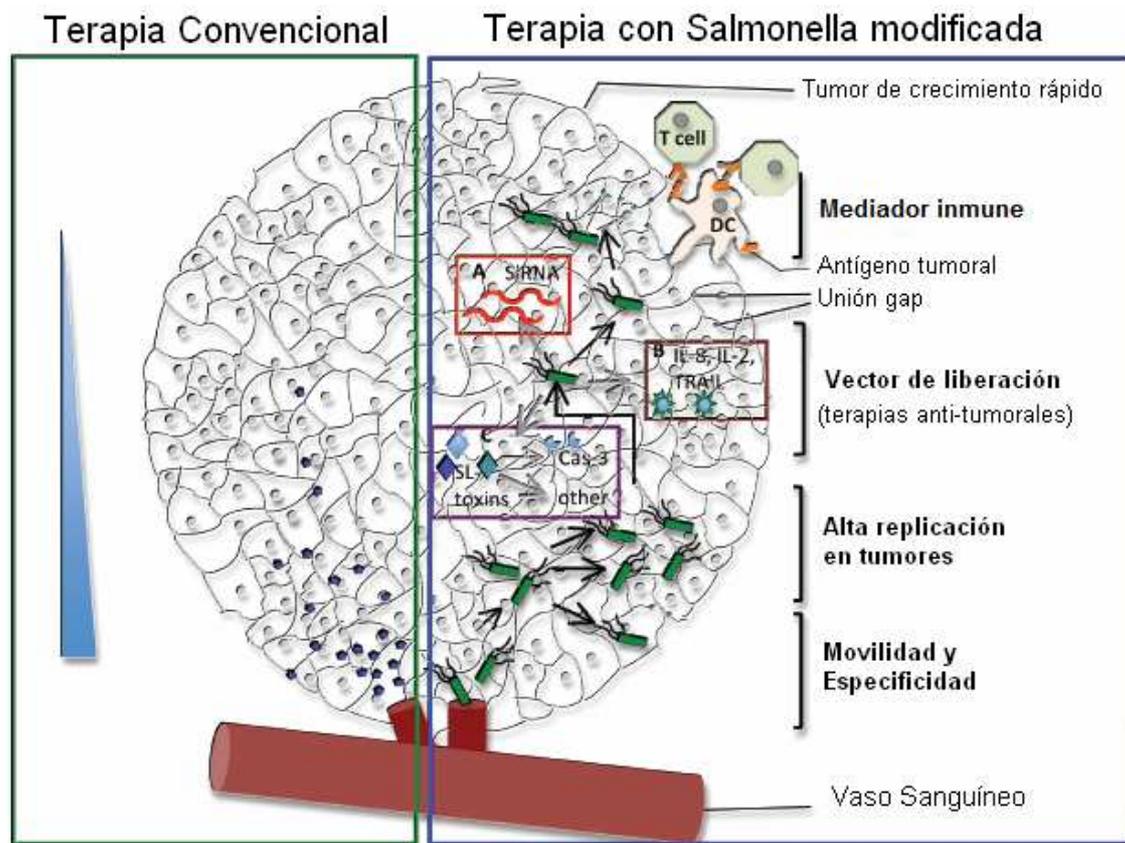


Figura 1. Representación esquemática de las ventajas ofrecidas por *Salmonella* como agente terapéutico antitumoral. El recuadro verde muestra como los agentes antitumorales convencionales son incapaces de penetrar en lo profundo de tumores de rápido crecimiento. El recuadro azul representa la terapia mediante *Salmonella* modificada. El triángulo azul indica el gradiente de agente quimioterapéutico. Imagen extraída y modificada de Wall *et al*, 2010 [2].

Como se mencionó anteriormente, la flagelina es un potente activador de la respuesta inmune, siendo sensada por IPAF intracelular [24] y/o por el receptor TLR5 de superficie expresado en células epiteliales intestinales y en un conjunto de células dendríticas intestinales [25-28]. La flagelina es el monómero proteico de los filamentos flagelares que forman los flagelos, apéndices superficiales requeridos para la movilidad y quimiotaxis de *Salmonella* y otros tantos géneros bacterianos [29]. En particular, el serovar Typhimurium de *S. enterica* presenta variación de fase, en la cual por inversión de un segmento de ADN que contiene al promotor anterior al gen se expresan alternativamente dos tipos diferentes de genes *-fliC* y *fljB-* (Figura 2) [30] para dar lugar a dos subunidades proteicas de flagelina distintas, FliC y FljB (51,61 KDa y 52,54 KDa, respectivamente) [31]

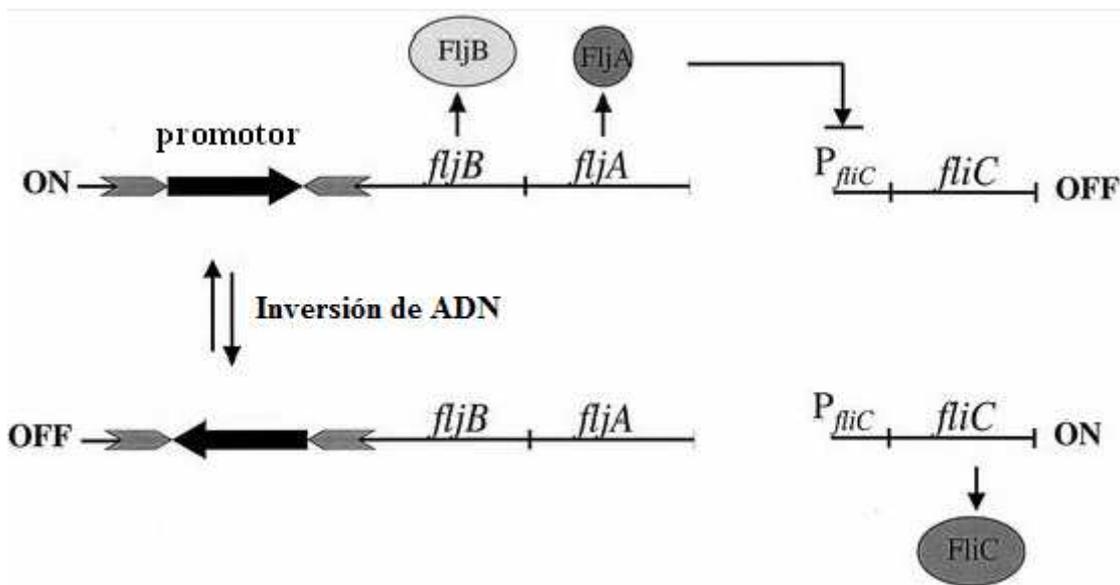


Figura 2. Representación esquemática de la variación de fase en *S. enterica*. El promotor del operón *fljBA* se localiza en un segmento de ADN de 970 pb invertible por acción de la enzima *Hin* recombinasa. En una orientación, el operón *fljBA* se expresa y se produce flagelina FljB junto con FljA, represor del gen *fliC* que codifica la flagelina FliC. En la orientación opuesta, el gen *fljB* no se expresa y tampoco el represor FljA, permitiendo así la transcripción del gen *fliC* y la concomitante producción de flagelina FliC. Imagen extraída y modificada de Bonifield *et al*, 2003 [32].

En conjunto, las características mencionadas anteriormente indican que en condiciones ideales *Salmonella* sería capaz de infectar células tumorales, induciendo su muerte. La generación de antígenos derivados de las células tumorales en un contexto inflamatorio, también inducido por *Salmonella*, sería propicia para la captación y presentación de éstos al sistema inmune,

desencadenando una respuesta específica contra el tumor. Todo ello sumado a la capacidad de *Salmonella* atenuada como vector de liberación de moléculas de interés en el entorno tumoral permite proponer su uso como base de inmunoterapias para el tratamiento de cáncer. Sin embargo, hasta la fecha no se conocen los mecanismos responsables de su eficiencia, ni se han reportado casos de remisión total.

Recientemente, en nuestros laboratorios se ha implementado un modelo murino de linfoma a células B, bien caracterizado y fácilmente reproducible, que ha sido empleado para evaluar diferentes inmunoterapias basadas en *Salmonella* viva atenuada [33-34]. La administración intratumoral de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), LVR01, conllevó a un retardo en el crecimiento del tumor y consecuentemente una prolongación de la supervivencia que se correlacionó con una estimulación de la respuesta inmune innata y adquirida en forma sistémica. Dado que las células A20 (provenientes de linfoma no-Hodgkin de células B) son linfocitos B maduros con capacidad de presentar antígenos propios, se evaluó una aproximación experimental más novedosa donde las células tumorales fueron infectadas *ex vivo* con *Salmonella*. Esto determinó un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras de linfocitos T como CD80, CD86, CD40 y MHC de clase II, que incrementó la capacidad presentadora de antígeno de las células B tumorales y resultó, por lo tanto, en una respuesta inmune específica más potente [34]. En vista de los resultados obtenidos en los que se observó un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras y MHC de clase II en las células B tratadas con *Salmonella*, y con el objetivo de conocer que componentes bacterianos eran capaces de inducir la maduración de las células presentadoras, se analizó preliminarmente el efecto de la flagelina, entre otros PAMPs, como factor de maduración, observándose un aumento de la expresión de MHC de clase II y CD40 similar al causado por la bacteria viva y con valores menores de expresión de CD80 y CD86.

En el presente trabajo se avanzó en estudios específicos sobre el rol de la flagelina en el efecto antitumoral de *Salmonella* en el modelo murino de linfoma a células B.

V. Objetivos generales y específicos

i. Objetivo general

Estudiar el papel de la flagelina en el efecto antitumoral de *S. Typhimurium* en un modelo murino de linfoma a células B.

ii. Objetivos específicos

- a. Construir una cepa mutante de *S. Typhimurium* carente de flagelina.
- b. Testear la capacidad invasiva y replicativa del mutante generado en células B leucémicas y su potencial efecto citolítico *in vitro*.
- c. Estudiar la capacidad del mutante generado para inducir la expresión de moléculas coestimuladoras en células B leucémicas *in vitro*.
- d. Evaluar el efecto tumoricida desencadenado por la administración del mutante a ratones portadores de tumor.

VI. Materiales y Métodos

i. Línea celular

Se utilizó la línea celular murina A20 (American Type Culture Collection, ATCC) proveniente de un linfoma no-Hodgkin de células B.

ii. Medios de cultivo

Las células A20 fueron cultivadas en medio RPMI (PAA, Tanirel) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (PAA, Tanirel), L-glutamina 2mM (Sigma), 1,5 g/L bicarbonato de sodio (Sigma), 2,5 g/L D-glucosa (Sigma), piruvato de sodio 1mM (AppliChem) y β -mercaptoetanol 100 μ M (Sigma) (RPMI_{sup}).

Para el crecimiento de las cepas de *S. Typhimurium* se utilizó el medio Luria Bertani (LB) y LB agar (LBA) (Sigma) suplementado cuando fue necesario con kanamicina (50 μ g/mL) (Sigma) y/o cloranfenicol (24 μ g/mL) (Sigma).

iii. Cepas bacterianas y construcción de mutantes

Se utilizó la cepa auxotrófica de *S. Typhimurium*, LVR01, atenuada por mutación en un gen de la vía de los compuestos aromáticos (*aroC*⁻) [35], sin resistencia a antibióticos como cepa parental. A partir de ésta, se construyeron los mutantes TR5 (LVR01 *fliC::kan^R*) y TR7 (LVR01 *fliC::kan^R/fljB::Cm^R*) mediante transducción con fago P22, como se describe a continuación. Primeramente se incubaron 100 μ l de un cultivo de 16 horas con agitación a 37 ° C (cultivo ON) de la cepa a transducir (LVR01) durante 15 minutos a 37 ° C sin agitación con 100, 10, ó 1 μ l de un lisado de fago P22 para obtener una relación de 1 a 100 fagos/bacteria. Este lisado fue preparado a partir de la cepa de *S. Enteritidis* SEFK32 portadora del gen *fliC* inactivado mediante inserción de un cassette conteniendo el gen de resistencia a kanamicina [36], cedida por el Dr. Jean-Claude Sirard (Institut Pasteur de Lille, France) (ver Tabla 1). Luego se agregó 1ml de medio LB conteniendo EGTA 10mM pH 7,5 para detener la infección y se incubó en las mismas condiciones durante 15-20 minutos. Con el fin de seleccionar una clona transductante la mezcla de transducción se plaqueó en LBA con kanamicina para asegurar que la misma adquirió resistencia. Las colonias obtenidas se realsaron en LBA con kanamicina, y posteriormente se sembraron en EBU agar para controlar ausencia de fagos que contaminasen el cultivo. Finalmente se seleccionó una colonia que reuniese todos los requisitos (resistencia a kanamicina y color azul claro en placas de EBU agar), y la cepa obtenida de esa manera se

designó TR5. Posteriormente se inactivó el gen *fljB* de la cepa TR5 por transducción nuevamente con fago P22, utilizando como donadora la cepa TH2795 de *S. Typhimurium* portadora del gen *fljB* inactivado con un cassette con resistencia a cloranfenicol (ver Tabla 1), cedido también por el Dr. Sirard. Una vez más se seleccionó el doble mutante por plaqueo en LBA con cloranfenicol y se controló la ausencia de fagos por plaqueo en EBU agar. La cepa doble mutante obtenida de esa manera se designó TR7 y se comprobó que fuese resistente a ambos antibióticos (kanamicina y cloranfenicol). Finalmente, se verificó por PCR la inserción de los respectivos genes de resistencia en ambas cepas transductantes TR5 y TR7 (ver apartado v de Materiales y Métodos).

Nombre	Descripción	Referencia
LVR01	<i>S. Typhimurium</i> P228067 <i>aroC</i> -	[35]
SEFK32	<i>S. Enteritidis</i> <i>fliC::kan^R</i>	[36]
PT4	<i>S. Enteritidis</i> PT4 P125109	[37]
TR5	<i>S. Typhimurium</i> LVR01 <i>fliC::kan^R</i>	Este trabajo
TH2795	<i>S. Typhimurium</i> <i>fljB::Cm^R</i>	[38]
TR7	<i>S. Typhimurium</i> LVR01 <i>fliC::kan^R/fljB::Cm^R</i>	Este trabajo

Tabla 1. Descripción de las cepas utilizadas en el presente trabajo.

iv. Animales

Se utilizaron ratones Balb/C de 6-8 semanas de edad, de sexo femenino (Dilave, Uruguay). Estos fueron mantenidos en el bioterio del Instituto de Higiene, con ciclos de 12 horas luz - 12 horas oscuridad, a 21 ° C y con agua y ración *ad libitum*. Todos los procedimientos realizados en animales de experimentación fueron aprobados previamente por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, Uruguay).

v. Amplificación por PCR

La amplificación del gen *fliC* se realizó bajo las siguientes condiciones (ver Figuras 3a y b)

1) Amplificación región variable:

Cebadores 5'-GTGATCTGAAATCCAGCTTCAAG-3' (directo) y 5'-AAGTTTCGCACTCTCGTTTTTGG-3' (reverso).

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

5 min a 95° C,

30 ciclos de: 45 seg a 94° C, 45 seg a 50 ° C, 1 min 30 seg a 72 ° C,

10 min a 72 ° C

2) Amplificación región constante

Cebadores 5'-GATCATGGCACAAAGTCATTA-3' (directo) y 5'-CGGATTAACGCAGTAAAGAG-3' (reverso).

El programa de amplificación en este caso fue:

5 min a 94° C,

30 ciclos de: 30 seg a 94° C, 30 seg a 50 ° C, 2 min 30 seg a 72 ° C,

3 min a 72 ° C

Se usaron como controles positivos las cepas SEFK32 [36] y PT4 P125109 (PT4) [37] de *S. Enteritidis*.

La amplificación el gen *fljB* se realizó bajo las siguientes condiciones (ver Figura 3c)

Cebadores 5' CACTAACAGTCTGTCGCTGC 3' (directo) y 5' CGTAACAGAGACAGCACGTTC 3' (reverso).

Las condiciones de amplificación fueron:

5 min a 94° C,

30 ciclos de: 30 seg a 94° C, 30 seg a 55 ° C, 2 min 30 seg a 72 ° C,

3 min a 72 ° C

En todos los casos, los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa 0,8%.

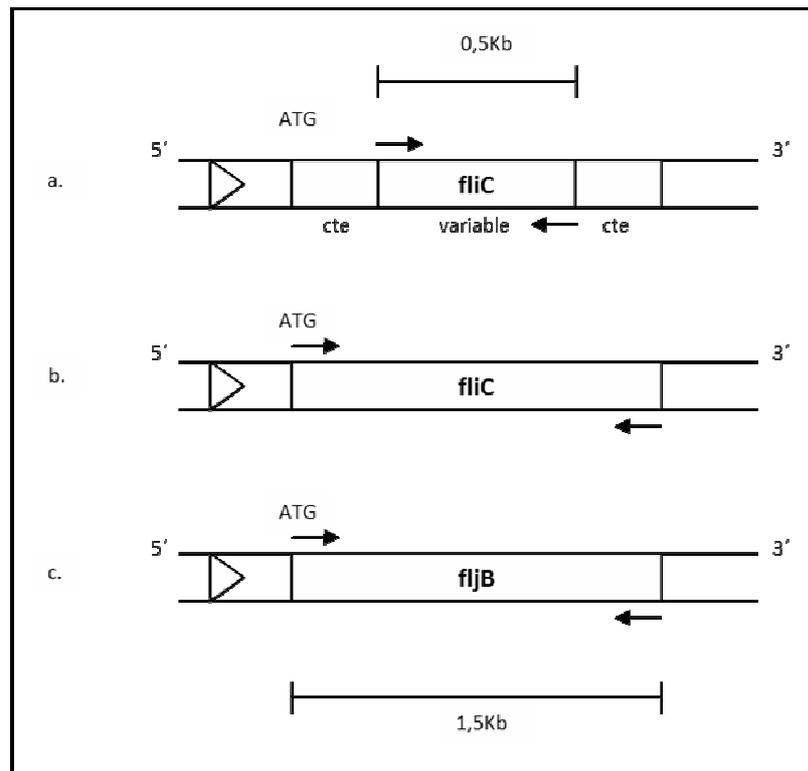


Figura 3. Esquema de los genes *fliC* (a,b) y *fljB* (c). Los promotores están representados con triángulos y los sitios de unión de los cebadores se muestran con flechas. a. El tamaño esperado del fragmento amplificado es 0,5Kb como se indica. b y c. El tamaño esperado de los fragmentos amplificados en cada caso es 1,5Kb, correspondiente a la totalidad de cada gen.

vi. Ensayos de Movilidad

Para determinar la presencia o ausencia de flagelo se llevaron a cabo ensayos de movilidad. La movilidad de LVR01 y de los diferentes mutantes fue evaluada frente a un control positivo (cepa PT4 de *Salmonella* Enteritidis) en ensayos de movilidad en agar blando (LBA 0,3%) sembrando en éste 2 μ L de un cultivo ON de cada cepa y midiendo el diámetro a las 6 horas de incubación a 37 ° C. Además se analizó la movilidad por microscopía óptica (Nikon Eclipse Ti-S) con objetivo de inmersión 60x y en modo contraste de fases, colocando sobre un portaobjetos 3 μ L de un cultivo de bacterias de 2 y 3 horas realizado a partir de una dilución 1/100 de cada cultivo ON.

vii. Ensayos de Aglutinación

Para comprobar la presencia de los distintos tipos de flagelo en cada mutante se realizaron ensayos de aglutinación. Para ello se utilizaron los sueros polyHA (reconoce los flagelos de fase 1 de varios grupos, incluido el grupo i), polyHB (reconoce flagelos de fase 1 y 2 de otros grupos entre los que no se encuentran los flagelos de *S. Typhimurium*), suero i (reconoce FliC) y suero 2 (reconoce FljB) (todos de Sifin, Alemania).

Para inducir la fase en los ensayos de aglutinación se procedió a crecer los cultivos bacterianos en presencia de suero inductor i (inductor de fase 2, en la que se expresa *fljB*), y luego se realizó aglutinación contra el propio suero i y suero 2.

viii. Curva de crecimiento

Para verificar que la ausencia de flagelina no afecta el crecimiento de los transductantes se realizaron curvas de crecimiento. Para ello se realizaron diluciones 1/100 en LB de cultivos ON tanto de LVR01 como de los transductantes, midiéndose la absorbancia a 600nm a distintos tiempos durante un período de 7 horas.

ix. Ensayos de Invasión y Replicación

Se incubaron 1×10^6 células A20 en presencia de *Salmonella* en una relación bacteria:célula 100:1 durante 1 hora a 37° C en placas de 24 pocillos. Los ensayos fueron realizados sin centrifugar las células para evaluar el efecto real de la movilidad de la *Salmonella* en la capacidad invasiva. Luego de la incubación se reemplazó el medio por medio suplementado con gentamicina (100 µg/mL) (Sigma) para eliminar las bacterias que no ingresaron a las células. Para evaluar el nivel de invasión luego de 1 hora de incubación con gentamicina, se lavaron las células para eliminar trazas de gentamicina y se lisaron con Tritón-X100 0,1%. Finalmente se plaquearon diluciones adecuadas en medio LBA para recuento. Para los ensayos de replicación se procedió de la misma manera a distintos tiempos de incubación con gentamicina (1, 4 y 24 horas).

x. Determinación de apoptosis por MTT

Se incubaron 1×10^6 células A20 en medio RPMI sup (control negativo), LVR01 (control positivo) o la cepa mutante, ambas en una relación bacteria:célula 100:1 durante 1 hora a 37° C y 5% CO₂ en placas de 96 pocillos de fondo plano. Posteriormente se reemplazó el medio por medio suplementado con gentamicina (100 µg/mL) para eliminar las bacterias que no ingresaron a las

células y se incubó durante 24 horas en las mismas condiciones. Luego, se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm para decantar las células pero no las bacterias y se sustituyó el medio por medio suplementado con tetraciclina (10 µg/ml) para eliminar las bacterias intracelulares capaces de procesar el MTT. Después de incubar durante 1 hora a 37°C y 5% CO₂, se agregó 50 µL/pocillo de MTT (bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-y1)-2,5-difeniltetrazolio) (5 mg/ml) y se incubó en cámara oscura con papel aluminio durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Finalmente se agregó 50 µL/pocillo de SDS 20% (en agua miliQ) y se incubó nuevamente en cámara oscura por al menos 6 horas a temperatura ambiente para que se solubilicen los cristales de MTT-formazán. La lectura de la placa se realizó a 570nm a las 16 horas. Se define el porcentaje de citotoxicidad como el porcentaje de células A20 muertas luego de invasión con *Salmonella*, y se calcula como

$$\text{Citotoxicidad} = 100 - \left[\frac{\text{D.O.}_{A20+Salmonella} - \text{D.O.}_{Salmonella}}{\text{D.O.}_{A20} - \text{D.O.}_{\text{blanco}}} \right] \times 100$$

xi. Inducción de la respuesta inmune *in vitro*

Para estudiar la inducción de moléculas coestimuladoras en las células A20 luego de la invasión por la cepa mutante TR7 en comparación con la cepa parental LVR01, se realizó citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-CD40, CD80, CD86 y MHC-II en células A20 luego de ser infectadas con *Salmonella*, según método puesto a punto en el laboratorio previamente [34]. Las células fueron marcadas con los siguientes paneles de anticuerpos: CD40-FITC/MHCII-PE y CD86-FITC/CD80-PE. La información colectada con el citómetro fue posteriormente analizada mediante FACS Diva. Para ello en el gráfico de FSC-SSC se definió una región de células A20 vivas, y dentro de dicha población se analizó la expresión de las moléculas coestimuladoras.

xii. Inducción de tumores y efecto tumoricida

Para la inducción tumoral, se inocularon ratones a nivel del flanco derecho por punción subcutánea (s.c.) con una suspensión de 2x10⁶ células A20 (ATCC).

Al momento que los tumores se hicieron palpables, a los distintos grupos de ratones se les inyectó vía intratumoral (i.t) tres dosis de 100 µL de SF (grupo control), *Salmonella* LVR01 o la cepa mutante TR7, cada dosis con una semana de diferencia, tal como se indica en la Figura 4.

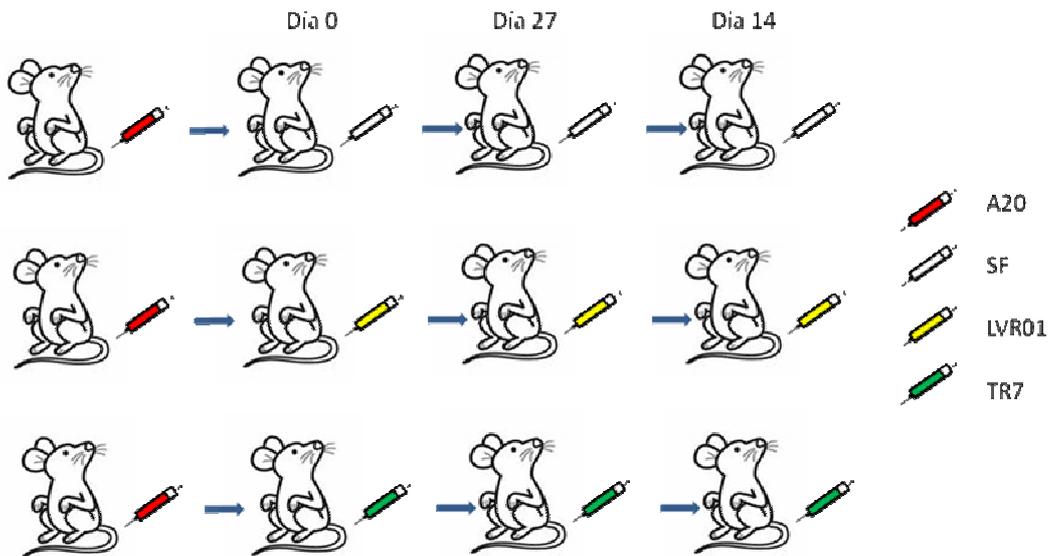


Figura 4. Esquema del ensayo. A los distintos grupos de ratones se les determinó crecimiento tumoral y sobrevida. Se considera Día 0 el día de la primera inoculación de *Salmonella* i.t. y a partir de ese momento se designan los subsiguientes días.

Para determinar el efecto tumoricida de la cepa TR7 en comparación con un control negativo (SF) y un control positivo (LVR01) se midió el tamaño tumoral (largo L, ancho A y profundidad P) con caliper cada dos o tres días y se calculó el volumen tumoral según la fórmula $L \times A \times P \times \pi / 6$. En paralelo, se registró la sobrevida de los animales tratados. A aquellos ratones que presentaron síntomas clínicos de enfermedad o un volumen tumoral mayor a 4000mm^3 se les practicó eutanasia humanitaria.

VII. Resultados

i. Construcción y caracterización de una cepa de *S. Typhimurium* carente de flagelina

A partir de la cepa parental LVR01 y mediante sucesivos ensayos de transducción con fago P22 se obtuvieron diferentes cepas (mutantes simples: solo en el gen *fliC* y mutantes dobles: genes *fliC* y *fljB*) que posteriormente fueron seleccionados según la característica buscada (ausencia de uno o ambos genes codificantes para flagelina) mediante plaqueo en medio con antibiótico. Luego de la primera ronda de transducción se seleccionaron por resistencia a kanamicina los transductantes designados TR1 al TR5, con el gen *fliC* inactivado, siendo elegido el TR5 para los posteriores ensayos; mientras que para la segunda ronda de transducción a partir de TR5 se seleccionaron por plaqueo en LBA-cloranfenicol los transductantes designados TR6 al TR11, con ambos genes *fliC* y *fljB* inactivados, seleccionando el TR7 para posteriores ensayos. Por esa razón, en algunos de los resultados presentados a continuación se hará mención a otros mutantes además de los transductantes TR5 y TR7 citados en la sección *Materiales y Métodos*. Para caracterizar los mismos se realizaron ensayos de PCR, aglutinación y movilidad; y finalmente se efectuó una curva de crecimiento para verificar que la ausencia de flagelina no afectara el crecimiento de las bacterias.

a. Confirmación por PCR

En una primera instancia se confirmó mediante PCR la inactivación de los genes de flagelina, *fliC* y *fljB*, en los mutantes obtenidos. Para *fliC*, se utilizó un par de cebadores G rev y G for, diseñados para hibridar sólo con la región variable del gen codificante para flagelina (ver Figura 3a) en *Salmonella* Enteritidis, pero no en *S. Typhimurium*. Por esa razón, sería de esperar que sólo amplificaran SEFK32 (*S. Enteritidis fliC::kan^R*) esperando un fragmento de 1500 pb correspondiente a la región variable con el cassette de kanamicina insertado y PT4 (*S. Enteritidis* control) esperando un fragmento de solo 500 pb ya que no hay cassette, además de los mutantes que adquirieron una región de *S. Enteritidis* junto con el cassette de kanamicina en el proceso de transducción (Tabla 1). Como LVR01 pertenece al serovar Typhimurium, no es de esperarse ninguna banda de amplificación.

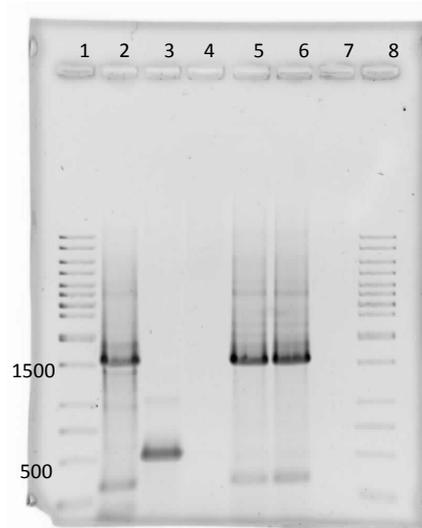


Figura 5. Gel de agarosa 0,8%. 1. Marcador de peso molecular (MPM, 1kb DNA Ladder, Fermentas), 2. SEFK32, 3. PT4, 4. LVR01, 5. TR1, 6. TR5, 7. Control negativo, 8. MPM.

En el gel se observa que tanto para SEFK32 como para TR1 y TR5 se obtuvieron 2 bandas de aproximadamente 1500 pb y 350 pb. Para PT4 se obtuvo una única banda de aproximadamente 500 pb mientras que para LVR01 no se observa banda alguna.

La banda observada de 1500 pb se corresponde con la región variable del gen *fliC* con el cassette de kanamicina inserto en cualquiera de los casos.

La banda de 500 pb observada en PT4 corresponde a la región variable del gen *fliC* sin el cassette de kanamicina.

Finalmente, no es tan evidente a qué corresponde la banda de 350 pb. Hay dos hipótesis que podrían explicarla:

1) Corresponde a la región variable de *fliC* pero modificada por inserción y posterior pérdida del cassette, que podría haber llevado a la pérdida neta de algunos pb. Esto implicaría la existencia de dos copias de *fliC* en esas cepas: una con el cassette de kanamicina y otra delecionada pero sin el cassette.

2) Hibridación inespecífica de cebadores debido al cassette de kanamicina (que es la única región en común entre SEFK32, TR1 y TR5, que no está presente en LVR01). Ésta última hipótesis parecería ser más plausible que la anterior dado que la banda de 350 pb es menos intensa que la de 1500 pb, sugiriendo una hibridación menor a 100% (ya que si hibridasen 100% como lo hacen para dar la banda de 1500 pb se vería favorecida la amplificación de la más pequeña, dado que menores fragmentos amplifican más eficientemente). Asimismo, se

utilizó un segundo par de cebadores para amplificar *fliC*, diseñado para hibridar en los extremos del gen *fliC* (ver Figura 3b), constantes entre serovariedades de *Salmonella enterica*, por lo que debería verse amplificación de todas las cepas. En este caso los fragmentos esperados son mayores, ya que se corresponderían con la totalidad del gen.

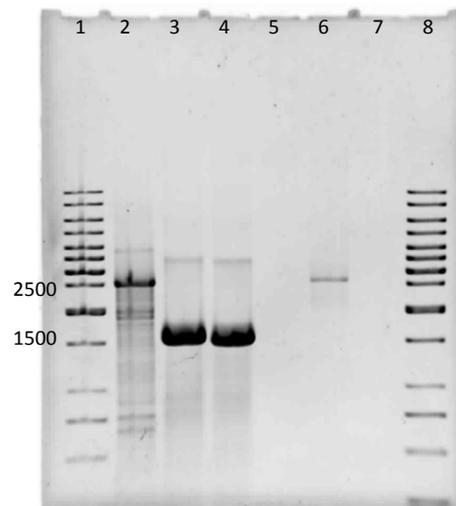


Figura 6. Gel de agarosa 0,8%. 1. MPM (Fermentas), 2. SEFK32, 3. PT4, 4. LVR01, 5. TR1, 6. TR5, 7. Control negativo, 8. MPM.

En el gel se observan bandas de amplificación de 2500 pb en los carriles correspondientes a SEFK32 y TR5, mientras que para las cepas PT4 y LVR01 se ven bandas de 1500 pb. En TR1 no se observa amplificación alguna.

La banda de 2500 pb se corresponde con el gen *fliC* con el cassette de kanamicina inserto, mientras que la banda de 1500 pb se puede atribuir a *fliC* sin el inserto de kanamicina. El resto de las bandas observadas en SEFK32 probablemente se deban a interacciones inespecíficas de los cebadores con el ADN molde.

Es posible que TR1 no haya amplificado debido un problema en la carga del molde de ADN en el ensayo, pero dado este resultado TR1 no fue seleccionado para la construcción del doble mutante.

Los cebadores para amplificar *fljB* fueron diseñados igual que el juego anterior para amplificar el gen *fliC* completo, pero se le cambiaron algunas bases de manera que amplificara

específicamente *fljB* y no *fljC*, que guarda una gran homología con *fljB* (ver sección *Amplificación por PCR en Materiales y Métodos*). Como PT4 pertenece al serotipo Enteritidis no presenta variación de fase, y por lo tanto, carece del gen *fljB*, es de esperar que no amplifique.

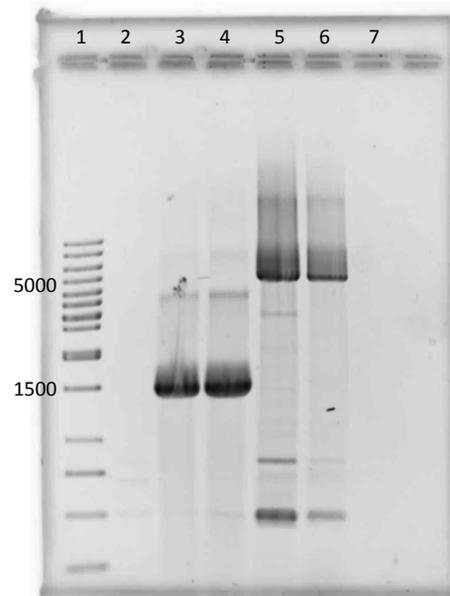


Figura 7. Gel de agarosa 0,8%. 1. MPM, 2. PT4, 3. LVR01, 4. TR5, 5. TR7, 6. TR11, 7. Control negativo.

Tal como se mencionó anteriormente, el carril de PT4 efectivamente no presenta ninguna banda. En los carriles de LVR01 y TR5 se observa claramente una banda de 1500 pb que corresponde a la totalidad del gen *fljB*, mientras que en los carriles correspondientes a TR7 y TR11 esta banda no se aprecia, y en lugar de la misma aparecen una banda de 5000 pb y otras dos bandas correspondientes a fragmentos pequeños, de aproximadamente 800 y 500 pb. Dado que el cassette de resistencia a cloranfenicol consta de 3000 pb aproximadamente [39], cabe asignar las bandas de 5000 pb al gen *fljB* con el inserto, mientras que las pequeñas bandas observadas se pueden asociar a pegado inespecífico. A partir de estos resultados, se eligió TR7 como cepa de trabajo carente de flagelina.

b. Aglutinación

Se llevaron a cabo ensayos de aglutinación para determinar presencia o ausencia de los diferentes tipos de flagelo en las cepas de estudio.

A los efectos de realizar el ensayo de aglutinación en tubo se utilizó el suero polyHA, suero policlonal que reconoce los flagelos de fase 1 de varios grupos, incluido el grupo i, al que pertenece el flagelo de *S. Typhimurium*. Al observar la Tabla 2 podemos comprobar que LVR01 es la única cepa que presenta flagelo de fase 1 (FliC), ya que existe aglutinación, mientras que los transductantes no aglutinan, confirmando la ausencia de flagelo de FliC.

Como control negativo se utilizó el suero polyHB, que reconoce flagelos de fase 1 y 2 de otros grupos entre los que no se encuentran los flagelos de *S. Typhimurium*, no observándose aglutinación en ningún caso (Tabla 2).

Como control positivo se utilizó para aglutinar el suero i que reconoce el flagelo de fase 1 del grupo i, observándose los mismos resultados que con el suero polyHA, verificando la presencia de flagelo FliC únicamente en LVR01.

Este mismo suero se utilizó para inducir cambio de fase de flagelo en los ensayos de aglutinación en lámina. Cuando las bacterias crecen en presencia de suero i, se bloquea la expresión de flagelo de fase 1 (FliC) y el fenómeno de aglutinación con el mismo suero no ocurre (control interno) (Tabla 3). El suero 2, por otra parte, reconoce el flagelo de la segunda fase, donde se expresa el gen *fliB*.

Al crecer los cultivos en presencia de suero i, tanto LVR01 como TR5 deberían aglutinar con el suero 2 porque ambas poseen el gen *fliB* funcional. Sin embargo, a pesar de que se observa aglutinación en LVR01, éste no es el caso en TR5, donde los resultados no son tan claros. Una posible explicación a esta observación puede estar dada por el hecho de que la presencia del gen *fliC* tendría un rol fundamental en la correcta expresión del gen *fliB* y funcionalidad de la proteína correspondiente por lo que al inactivarlo, *fliB* se expresaría en menor medida.

	polyHA	polyHB	suero i
LVR01	++	-	++
TR5	-	-	-
TR7	-	-	-

Tabla 2. Aglutinación en tubo. Se realiza sin inducción de fase. El grado de aglutinación se indica en una escala creciente de - a ++.

	suero i	suero 2
LVR01	-	++
TR5	-	+/-
TR7	-	-

Tabla 3. Aglutinación en lámina. Se realiza con inducción de flagelo de fase 2 utilizando el suero i, y luego se aglutina usando suero i o 2.

c. Ensayo de Movilidad al microscopio

Con el fin de estudiar la movilidad de la cepa parental y las mutantes obtenidas se realizó un ensayo de movilidad al microscopio óptico utilizando nuevamente como referencia de movilidad elevada la cepa PT4 de cultivos bacterianos en crecimiento exponencial (2 horas y 3 horas).

La Tabla 4 refleja los resultados obtenidos, donde todas las cepas muestran menos movilidad que la cepa PT4 de referencia. Mientras LVR01 presenta una movilidad elevada, el TR5 (carente de uno de los genes codificantes para flagelina) presenta movilidad moderada y el TR7 (carente de ambos genes para flagelina) no se mueve.

	2 hs	3 hs
PT4	+++	+++
LVR01	++	++
TR5	+/-	+/-
TR7	nd	-

Tabla 4. Ensayo de movilidad al microscopio óptico. Los símbolos de + indican diferentes grados de movilidad, -: no movilidad, nd: no determinado.

d. Ensayo de Movilidad en agar blando

Además, se estudió la movilidad de los mutantes parciales o completos de flagelina respecto a la cepa control por ensayo de movilidad en LBA 0,3%. Luego de 6 horas se midieron los halos de movilidad (Figura 8), y se determinó la movilidad relativa frente a PT4 (Tabla 5).

De esta manera quedó confirmado lo mencionado en la sección anterior; la movilidad del TR5 se ve disminuida frente a la de LVR01, mientras que movilidad del TR7 es nula.

Varias hipótesis permitirían explicar la reducida movilidad de la cepa TR5 carente del gen *fliC*, pero con *fliB* funcional, aunque la confirmación de las mismas no está dentro del alcance de este trabajo:

- 1) Como se mencionó anteriormente, la presencia del gen *fliC* tendría un rol fundamental en la correcta expresión del gen *fliB* y funcionalidad de la proteína correspondiente por lo que al inactivarlo, *fliB* se expresaría en menor medida.
- 2) La expresión del gen *fliB* genera menos cantidad de flagelos que su contraparte de primera fase, *fliC*, por lo que la movilidad neta de la bacteria disminuiría.
- 3) La movilidad causada por el flagelo FljB sería menor que la movilidad causada por el flagelo FliC, independientemente de si el gen *fliC* está presente o no.

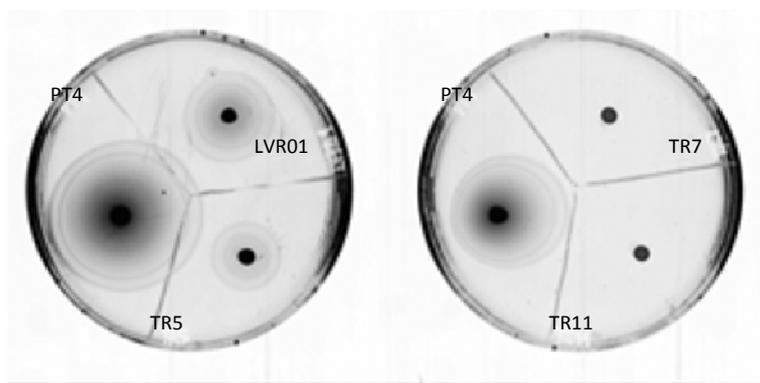


Figura 8. Ensayo de movilidad en agar blando (LBA 0,3%).

	cepa (mm)	cepa/PT4
PT4 a	40	---
PT4 b	30	---
LVR01	24	0,60
TR5	19	0,50
TR7	4	0,13

Tabla 5. Ensayo de movilidad en agar blando. Para comparar los resultados de movilidad de las distintas cepas de *Salmonella* obtenidos en ambas placas se calcula la relación entre la movilidad de cada cepa y la de la cepa de referencia PT4.

e. Curva de crecimiento

Está reportado que mutantes de *S. Typhimurium* carentes de flagelina crecen a una tasa levemente mayor que sus contrapartes flageladas [40]. Esto probablemente se deba a la incapacidad de estas cepas transductantes de sintetizar componentes flagelares para su posterior ensamblaje, economizando coste energético, y por ende, permitiendo un crecimiento más veloz. Por ello, se realizó una curva de crecimiento para verificar si la ausencia de flagelina afecta el crecimiento de nuestras mutantes. Como se puede apreciar en la Figura 9, en la que se presentan los datos de densidad óptica a 600nm obtenidos para las diferentes cepas testeadas a distintos tiempos, en nuestro modelo la ausencia de flagelina no afecta el crecimiento de las bacterias.

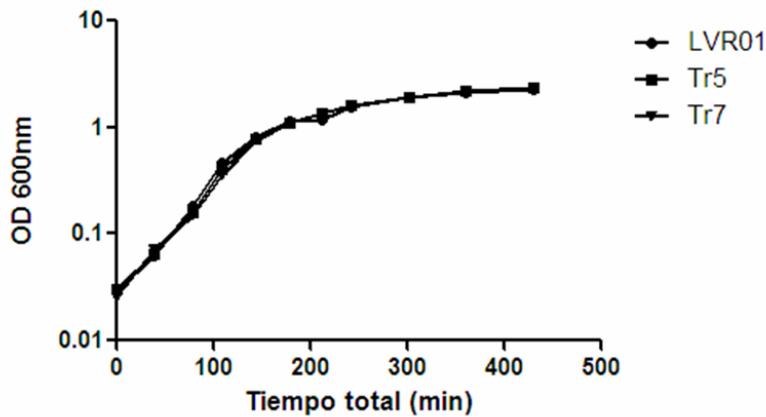


Figura 9. Curva de crecimiento de las distintas cepas LVR01, TR5 y TR7.

ii. Ensayos de Invasión-Replicación

Luego de finalizada la caracterización de las cepas transductantes, se seleccionó únicamente el doble mutante en flagelina TR7 para los demás ensayos, de manera que de aquí en más, la cepa parental LVR01 solamente se comparó con el mismo.

Se evaluó la habilidad de la cepa transductante TR7 para invadir y replicar en la línea celular A20 en comparación con la cepa LVR01 mediante ensayos de invasión *in vitro*. LVR01 presenta una baja capacidad de invadir células A20 (1 ufc/1x10³ células A20), y no es capaz de replicarse dentro de las mismas, observándose una disminución en la cantidad de bacterias a lo largo del tiempo (Figura 10). La ausencia de flagelina en la cepa TR7 no altera este comportamiento, a pesar de estar reportado que la falta de la misma reduce la invasividad de *Salmonella* Typhimurium en otros modelos celulares como MODE-K, Henle-407 (células epiteliales del intestino delgado) [40] o Caco-2 [41], en donde la invasión de *Salmonella* a las células eucariotas estaría dada por vías diferentes: fagocitosis versus endocitosis mediada por receptor. De todas maneras, además de que las células utilizadas en este trabajo son linfocitos B mientras que las anteriormente mencionadas no lo son, las bacterias carentes de flagelina en el presente trabajo difieren de las utilizadas por Schmitt y colaboradores, siendo estas últimas mutantes en el regulador mayor de la expresión de genes flagelares *-flhD-* y por lo tanto, incapaces de sintetizar no solo la flagelina sino también el aparato de secreción flagelar.

Asimismo, la incapacidad observada para replicar intracelularmente luego de la invasión de células A20 se explicaría mediante dos hipótesis:

- 1) Dado el efecto apoptótico que genera *Salmonella* en las células A20 [34], quizá esté ocurriendo replicación de bacterias pero esta no se aprecia ya que al matar a la célula que las contiene y salir al medio, la gentamicina las elimina y en los diferentes plaques no se observa un aumento en la cantidad de bacterias recuperadas del interior celular.
- 2) Una vez fagocitada, la bacteria queda confinada al fagolisosoma en condiciones hostiles como falta de nutrientes, bajo pH y presencia de enzimas lisosomales [23], lo que retardaría o incluso detendría la replicación. Dado que está reportado que el ingreso *in vitro* de *Salmonella* a macrófagos puede ocurrir vía endocitosis mediada por receptor [42] y no por fagocitosis, posiblemente en las células B A20 ocurra lo mismo, ya que ambas son células presentadoras de antígeno; haciéndose menos plausible esta última opción planteada.

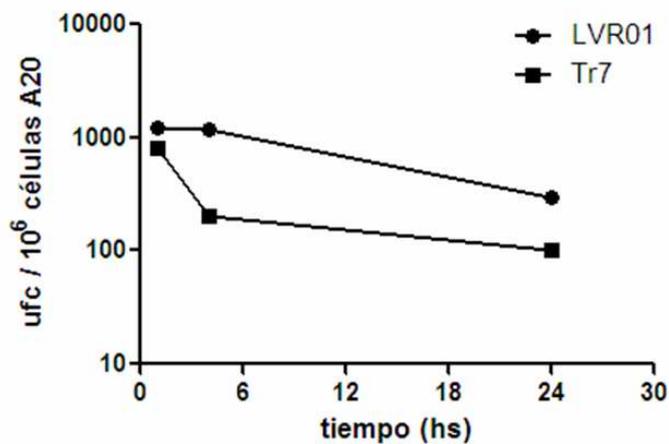


Figura 10. Ensayo de invasión y replicación bajo protección con gentamicina.

iii. Ensayo de viabilidad celular

Por otro lado, se evaluó la citotoxicidad generada por LVR01 y la cepa transductante TR7 sobre las células A20 mediante ensayos de viabilidad celular utilizando el colorante MTT, tal como se describe en la sección *Determinación de apoptosis por MTT* en *Materiales y Métodos*. No se observaron diferencias significativas entre la citotoxicidad mediada por LVR01 y la generada por TR7 (59% y 66% respectivamente).

iv. Expresión de moléculas coestimuladoras

Como se mencionó anteriormente, las células A20 son linfocitos B maduros con la capacidad de presentar antígenos propios, por lo que son llamadas APC (del inglés Antigen Presenting Cells). Por esa razón, se propuso estudiar mediante citometría de flujo la expresión basal de MHCII y de moléculas coestimuladoras, para determinar si la infección con LVR01 o TR7 la modifican. Se sabe que las células A20 expresan en forma basal niveles elevados de MHC de clase II, intermedios de CD40 y muy bajos o ausentes de CD80 y CD86 [43-44], lo que comprobamos mediante los controles de A20 sin infectar (Figura 12). Asimismo, se observó que la infección con *Salmonella* LVR01 indujo un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras, observándose la expresión de MHC-II y CD40 en todas las células A20, CD86 en el 70% y CD80 en el 50% de las mismas. Cabe destacar que la infección de células A20 por el TR7 carente de flagelina también induce un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras, aunque en menor medida (Figura 13). Si bien los porcentajes de células A20 que expresan las distintas moléculas son iguales después de la infección por cualquiera de las *Salmonellas* testeadas (Figura 12), los niveles de expresión (es decir, cantidad de moléculas expresadas por células) analizados por intensidad de fluorescencia son levemente menores en las células A20 post-infección con TR7 en comparación con LVR01 (Figura 13).

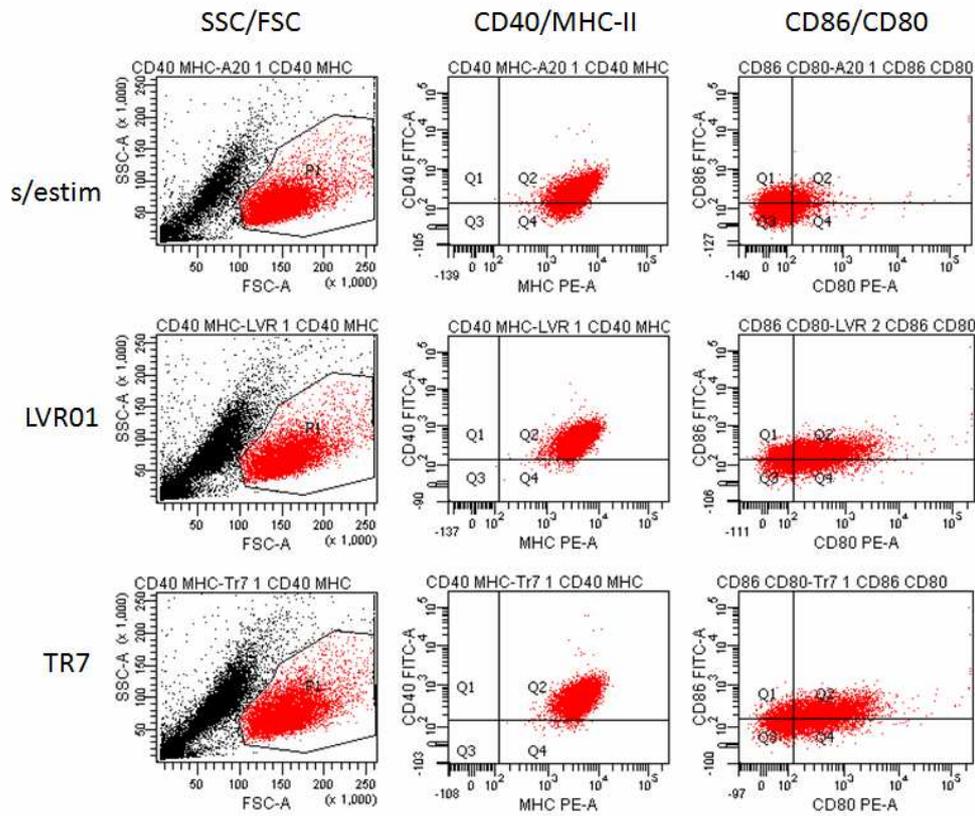


Figura 11. Gráficas de dot plot representativas de cada condición: A20 (fila superior), A20 infectadas con Tr7 (fila medio), y A20 infectadas con LVR01 (fila inferior). Las células A20 a analizar fueron definidas en el gráfico de SSC vs FSC (columna izquierda), y analizadas para las diferentes combinaciones de marcadores: MHC de clase II-PE y CD40-FITC (columna medio), y CD80-PE y CD86-FITC (columna derecha).

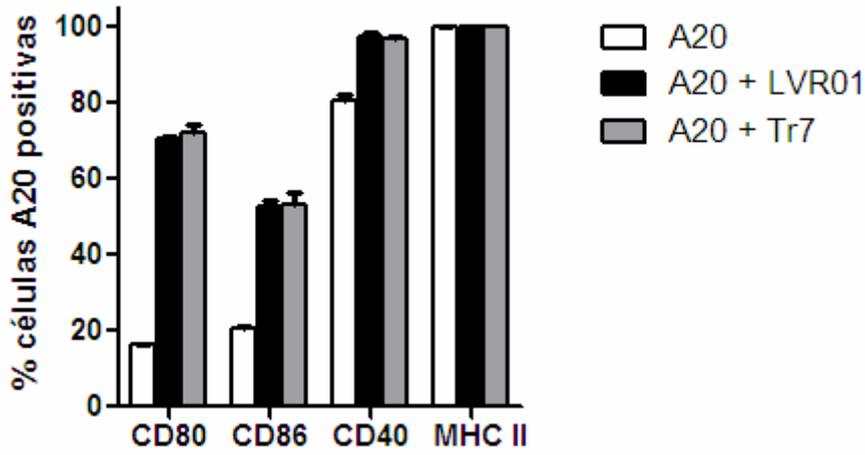


Figura 12. Porcentaje de células A20 positivas para cada marcador luego de la estimulación con las distintas *Salmonellas* frente al control de células sin infectar.

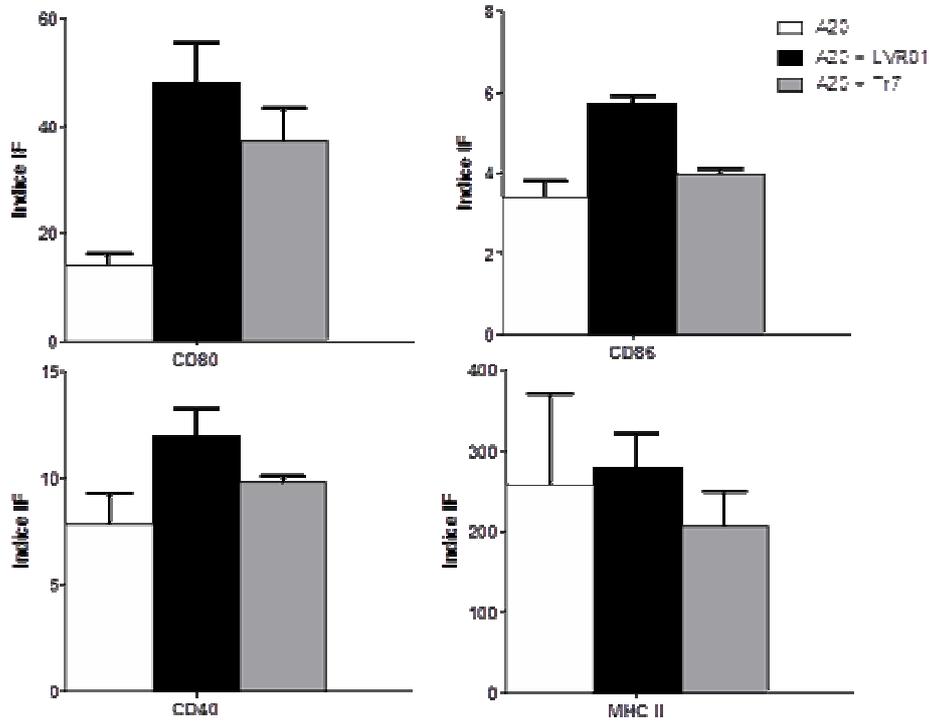


Figura 13. Índice de intensidad de fluorescencia para los marcadores CD80, CD86, CD40 y MHC-II en la superficie de células A20 luego de 24 hs de estimulación con las cepas de *Salmonella* LVR01 o TR7.

v. Inducción tumoral y efecto tumoricida

Se evaluó la sobrevida de los ratones portadores de tumor luego de la administración intratumoral de tres dosis (cada siete días) de las distintas cepas de *Salmonella*. La Figura 14 muestra las curvas de sobrevida obtenidas para los diferentes grupos de ratones, observándose que los ratones inoculados ya sea con LVR01 o TR7 presentan sobrevida más prolongada que los pertenecientes al grupo control SF. Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas entre la sobrevida de ratones en ambos grupos inoculados con *Salmonella*. Las curvas de crecimiento tumoral (Figura 15) lo confirman, ya que no hay diferencias significativas entre el tamaño de los tumores luego de la inoculación i.t. ya sea con LVR01 o con TR7, aunque si existe un retraso en el crecimiento de los mismos frente al control negativo SF. A modo de ejemplo, en la Figura 16 se muestra la mayor diferencia a nivel de tamaño tumoral entre los grupos *Salmonella* y el grupo control correspondiente al día 9 post-inoculación de la primera dosis de bacteria, siendo las medias de volumen tumoral 2954 ± 481 para el grupo control, 1803 ± 306 para LVR01 y 1666 ± 322 para TR7. Cabe destacar que se observó una regresión importante en el tamaño tumoral de aquellos ratones a los cuales se les administró *Salmonella* en una etapa muy temprana de desarrollo tumoral, observándose incluso regresión total en un caso.

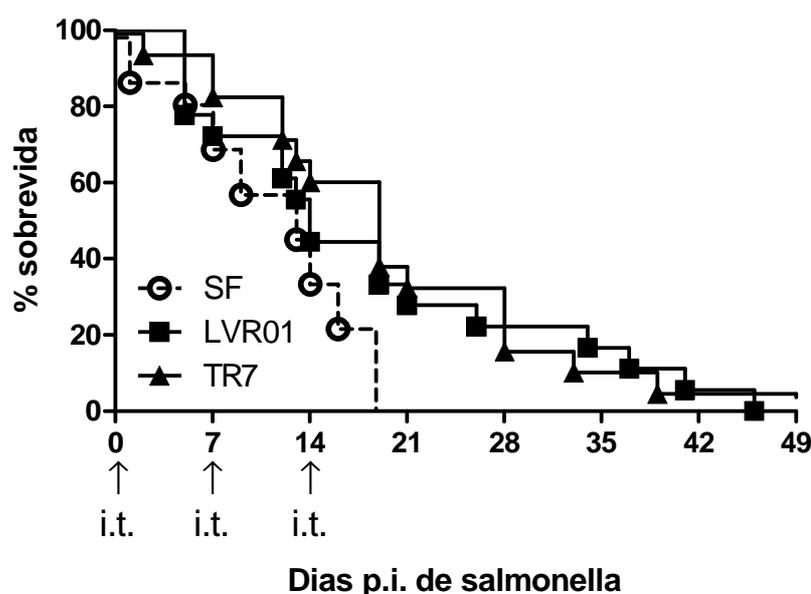


Figura 14. Curva de sobrevida. Se indican con flechas las tres inoculaciones intratumorales, ya sea de SF o de *Salmonella*.

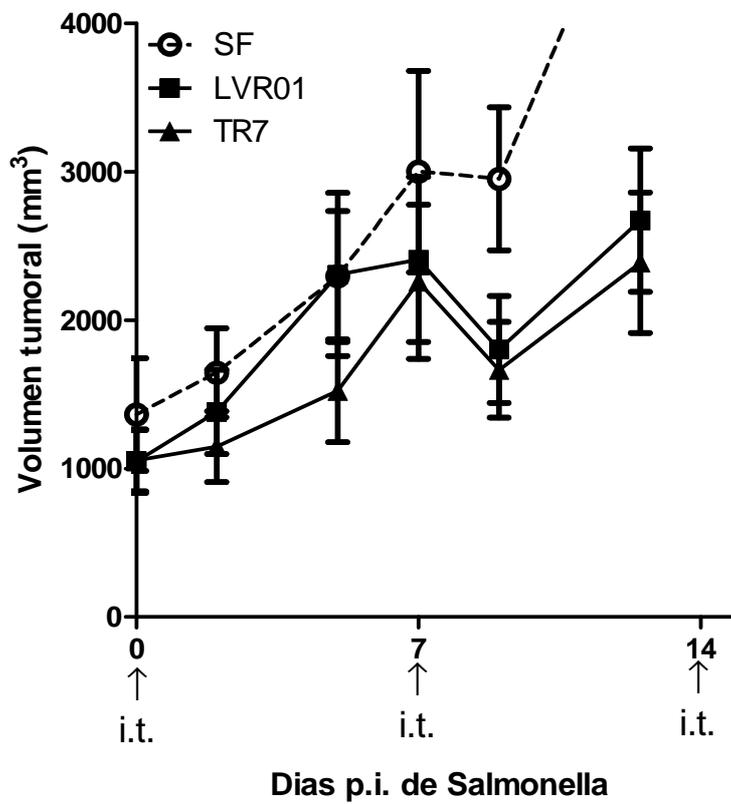


Figura 15. Curva de crecimiento tumoral. Se muestran los valores hasta el día 14 post-inoculación de la primera dosis de *Salmonella* ya que luego, debido a la muerte de los ratones, el crecimiento aparente se ve afectado.

9 días p.i. de *Salmonella*

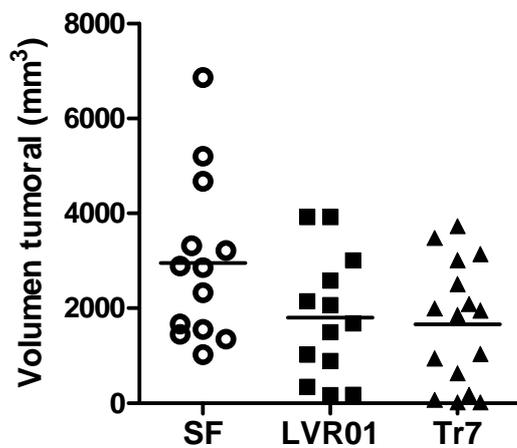


Figura 16. Medias de los valores de crecimiento tumoral al día 9 post-inoculación de la primera dosis de *Salmonella* i.t..

VIII. Discusión

Las diversas terapias utilizadas actualmente para combatir el cáncer no han demostrado ser completamente efectivas [2, 45], tornándose necesario otro enfoque complementario a las mismas. Bacterias del género *Salmonella enterica* poseen características intrínsecas ideales y una vasta capacidad de ser modificadas por lo que se han vuelto candidatos promisorios en el área de la inmunoterapia (Figura 1). Luego de la infección por *Salmonella*, la detección de antígenos de origen bacteriano como flagelina o LPS desencadena la producción de TNF- α mayoritariamente por parte de macrófagos, promoviendo a su vez la producción de interleuquinas como IL-1 para generar un entorno proinflamatorio. Además aumenta la expresión de MCH-I y MHC-II, mejorando la presentación de antígeno y se potencia la estimulación de linfocitos B y T de tal forma que se genera una respuesta más potente frente al próximo desafío [46]. Conjuntamente, la liberación de TNF- α produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, conduciendo al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y sistema del complemento para provocar la activación de los linfocitos T y B. TNF- α también aumenta la activación y adhesión plaquetaria y, probablemente, la oclusión vascular sea la causa de la necrosis tumoral, de donde proviene su nombre [47].

En este trabajo se estudió el rol que juega la flagelina en el efecto anti-tumoral de *Salmonella* en un modelo de linfoma a células B. Se hipotetizaba que la carencia de flagelina y la concomitante falta de movilidad podrían reducir el efecto anti-tumoral intrínseco de *Salmonella* ya que la misma no puede dispersarse hacia zonas lejanas al punto de inoculación. Sin embargo, los ensayos *in vitro* no revelaron diferencias significativas entre la capacidad invasiva de la cepa parental motil LVR01 y la cepa no motil TR7 (Figura 10); y los ensayos *in vivo* en ratones tampoco mostraron diferencias significativas en el efecto antitumoral de ambas (Figura 15).

Por otra parte, la carencia de flagelina, un conocido PAMP, parecería causar menor activación del sistema inmune dado que disminuye la expresión de moléculas coestimuladoras. Sin embargo, en nuestro modelo TR7 es capaz de inducir la expresión de CD40, CD80 y CD86 en las células tumorales, aunque en menor medida que LVR01 (Figura 13). De todas maneras, esto no parece afectar la capacidad antitumoral de *Salmonella* dado que ensayos *in vivo* no muestran

diferencias significativas en crecimiento tumoral ni sobrevida entre grupos tratados con ambas *Salmonellas* (Figuras 13 y 14). Esto podría deberse al retardo con el cual se produce la respuesta T dependiente contra *Salmonella*, que llega al máximo al día 21 *post* inoculación [23], fecha para la cual los ratones ya habrían excedido el volumen tumoral máximo para ser sacrificados.

Finalmente, está reportada una correlación positiva entre la habilidad de producir TNF- α y la expresión de la proteína FliC, o en menor medida, la expresión de la subunidad FljB correspondiente a los flagelos de segunda fase [48]. A pesar de ello, la ausencia de flagelina no parecería alterar el efecto antitumoral de *Salmonella* en los ensayos propuestos (Figuras 14-16).

Podemos afirmar que no se encontraron diferencias significativas entre la *Salmonella* transductante generada y la cepa parental de la que se originó, dado que en el presente trabajo se demostró que *in vitro* crecen con la misma cinética, invaden y replican igual en el modelo celular A20 y provocan la generación de moléculas coestimuladoras de manera similar. Por otra parte, se advirtieron diferencias interesantes respecto a la movilidad *in vitro* de ambas bacterias, sin embargo, no se estudió la misma *in vivo*. Para esto podría realizarse un estudio de biodistribución de las mismas extrayendo a distintos tiempos tumores de ratones inoculados i.t. con ambas *Salmonellas* para luego analizar mediante microscopía. Estos análisis no se llevaron a cabo por no abarcar los objetivos propuestos en el inicio de este trabajo.

Por otro lado, es posible que el rol de la flagelina en el efecto antitumoral de *Salmonella* sea moderado en el modelo tumoral utilizado, ya que se necesitaron por lo menos dos dosis i.t. de la misma para encontrar diferencias significativas con el grupo control. Una buena aproximación al problema sería utilizar un modelo tumoral más sensible a la misma, de manera de ser capaces de detectar efectos leves en modelos *in vivo*. Uno de éstos podría ser el modelo de melanoma, aunque presenta el inconveniente no menor de crecer demasiado rápido de manera que las tres dosis no serían aplicables dado que los ratones alcanzarían antes es tamaño tumoral mínimo para ser sacrificados.

IX. Conclusiones y Perspectivas

A pesar de que la flagelina es solo uno de varios PAMPs de origen bacteriano capaces de ser reconocidos por TLR y desencadenar la respuesta inmune mediante producción de citoquinas [25], la falta del mismo no parece ser suficiente para detener el efecto anti-tumoral observado en el modelo de linfoma A20. De hecho, está reportado que la flagelina no funciona como antígeno protector en inmunización oral con *Salmonellas* atenuadas [49]. Asimismo, la carencia de flagelina que afecta la movilidad de la bacteria y su distribución en el entorno tumoral, no parece ser determinante en el desarrollo de una respuesta efectiva contra linfoma. Otras moléculas como el LPS de la pared bacteriana parecerían ser clave en la activación de los mecanismos responsables de una respuesta inmune eficiente ya que han demostrado ser potentes inductores de la producción de TNF- α [23] y estudios con mutantes carentes de lípido A mostraron menor inmunogenicidad [50]. Por esa razón una buena aproximación al problema sería construir bacterias carentes de LPS, de manera de lograr mutantes que pasen desapercibidos por los TLR 4, y realizar con los mismos un estudio análogo al descrito en este trabajo.

X. Agradecimientos

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) que financió en su totalidad este trabajo.

A Alejandro, que me dió lugar en el laboratorio y tuvo fe en mi desde el principio, gracias!

A María, mi orientadora, cuya ayuda y buena disposición durante todo el proceso de preparación de esta tesina fue invaluable. Mi más profundo y sincero agradecimiento.

A todos mis compañeros del LVR que de una manera u otra forman parte de esta tesina mediante sus aportes constantes.

A mi familia, ya que sin su apoyo en todos los ámbitos nunca podría haber llegado hasta aquí.

A Marcos, por aguantarme la cabeza, siempre.

XI. Referencias Bibliográficas

1. Pública, M.d.S., *Causas de muerte en Uruguay*. 2008.
2. Wall, D.M., C.V. Srikanth, and B.A. McCormick, *Targeting tumors with salmonella Typhimurium- potential for therapy*. *Oncotarget*, 2010. **1**(8): p. 721-8.
3. Leschner, S. and S. Weiss, *Salmonella-allies in the fight against cancer*. *J Mol Med (Berl)*, 2010. **88**(8): p. 763-73.
4. Westphal, K., et al., *Containment of tumor-colonizing bacteria by host neutrophils*. *Cancer Res*, 2008. **68**(8): p. 2952-60.
5. Leschner, S., et al., *Tumor invasion of Salmonella enterica serovar Typhimurium is accompanied by strong hemorrhage promoted by TNF-alpha*. *PLoS One*, 2009. **4**(8): p. e6692.
6. Lamm, D.L., et al., *Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of superficial bladder cancer*. *J Urol*, 1980. **124**(1): p. 38-40.
7. Morales, A., D. Eidinger, and A.W. Bruce, *Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors*. *J Urol*, 1976. **116**(2): p. 180-3.
8. Gill, G.V. and A. Holden, *A malignant pleural effusion infected with Salmonella enteritidis*. *Thorax*, 1996. **51**(1): p. 104-5.
9. Eisenstein, T.K., et al., *Immunotherapy of a plasmacytoma with attenuated salmonella*. *Med Oncol*, 1995. **12**(2): p. 103-8.
10. Sizemore, D.R., A.A. Branstrom, and J.C. Sadoff, *Attenuated Shigella as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization*. *Science*, 1995. **270**(5234): p. 299-302.
11. Fox, M.E., et al., *Anaerobic bacteria as a delivery system for cancer gene therapy: in vitro activation of 5-fluorocytosine by genetically engineered clostridia*. *Gene Ther*, 1996. **3**(2): p. 173-8.
12. Moreno, M., et al., *Salmonella as live trojan horse for vaccine development and cancer gene therapy*. *Curr Gene Ther*, 2010. **10**(1): p. 56-76.
13. 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.
14. Kasinskas, R.W. and N.S. Forbes, *Salmonella typhimurium lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis*. *Cancer Res*, 2007. **67**(7): p. 3201-9.

15. Pawelek, J.M., K.B. Low, and D. Bermudes, *Bacteria as tumour-targeting vectors*. *Lancet Oncol*, 2003. **4**(9): p. 548-56.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Kirkpatrick, B.D., et al., *The novel oral typhoid vaccine M01ZH09 is well tolerated and highly immunogenic in 2 vaccine presentations*. *J Infect Dis*, 2005. **192**(3): p. 360-6.
20. Sznol, M., et al., *Use of preferentially replicating bacteria for the treatment of cancer*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(8): p. 1027-30.
21. Luo, X., et al., *Antitumor effect of VNP20009, an attenuated Salmonella, in murine tumor models*. *Oncol Res*, 2001. **12**(11-12): p. 501-8.
22. Chabalgoity, J.A., et al., *Live bacteria as the basis for immunotherapies against cancer*. *Expert Rev Vaccines*, 2002. **1**(4): p. 495-505.
23. Shahabi, V., et al., *Live, attenuated strains of Listeria and Salmonella as vaccine vectors in cancer treatment*. *Bioeng Bugs*, 2010. **1**(4): p. 235-43.
24. Miao, E.A., et al., *Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via IpaF*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(6): p. 569-75.
25. Hayashi, F., et al., *The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5*. *Nature*, 2001. **410**(6832): p. 1099-103.
26. Gewirtz, A.T., et al., *Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression*. *J Immunol*, 2001. **167**(4): p. 1882-5.
27. Gewirtz, A.T., et al., *Salmonella typhimurium translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(1): p. 99-109.
28. Uematsu, S., et al., *Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(8): p. 868-74.

29. Winter, S.E., et al., *Contribution of flagellin pattern recognition to intestinal inflammation during Salmonella enterica serotype typhimurium infection*. Infect Immun, 2009. **77**(5): p. 1904-16.
30. Yamamoto, S. and K. Kutsukake, *FljA-mediated posttranscriptional control of phase 1 flagellin expression in flagellar phase variation of Salmonella enterica serovar Typhimurium*. J Bacteriol, 2006. **188**(3): p. 958-67.
31. Ikeda, J.S., et al., *Flagellar phase variation of Salmonella enterica serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence Salmonella-induced enteropathogenesis*. Infect Immun, 2001. **69**(5): p. 3021-30.
32. Bonifield, H.R. and K.T. Hughes, *Flagellar phase variation in Salmonella enterica is mediated by a posttranscriptional control mechanism*. J Bacteriol, 2003. **185**(12): p. 3567-74.
33. Grille, S., et al., *A B-cell lymphoma vaccine using a depot formulation of interleukin-2 induces potent antitumor immunity despite increased numbers of intratumoral regulatory T cells*. Cancer Immunol Immunother. **59**(4): p. 519-27.
34. Grille, S., *Desarrollo de inmunoterapias en linfoma no Hodgkin de células B. Programa de Investigación Biomédica (ProInBio). Tesis de Doctorado*. 2010.
35. 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.
36. Van Asten, F.J., et al., *Inactivation of the flagellin gene of Salmonella enterica serotype enteritidis strongly reduces invasion into differentiated Caco-2 cells*. FEMS Microbiol Lett, 2000. **185**(2): p. 175-9.
37. Thomson, N.R., et al., *Comparative genome analysis of Salmonella Enteritidis PT4 and Salmonella Gallinarum 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways*. Genome Res, 2008. **18**(10): p. 1624-37.
38. Didierlaurent, A., et al., *Flagellin promotes myeloid differentiation factor 88-dependent development of Th2-type response*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 6922-30.
39. Altman, E., *Transposons Currently in Use in Genetic Analysis of Salmonella Species, in Escherichia coli and Salmonella*. 1996, ASM Press.
40. Schmitt, C.K., et al., *Absence of all components of the flagellar export and synthesis machinery differentially alters virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium in models of typhoid fever, survival in macrophages, tissue culture invasiveness, and calf enterocolitis*. Infect Immun, 2001. **69**(9): p. 5619-25.

41. Yim, L., et al., *Differential phenotypic diversity among epidemic-spanning Salmonella enterica serovar enteritidis isolates from humans or animals*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(20): p. 6812-20.
42. Metcalfe, H.J., et al., *Flagellin expression enhances Salmonella accumulation in TLR5-positive macrophages*. Dev Comp Immunol, 2010. **34**(8): p. 797-804.
43. Pizzoferrato, E., *B7-2 expression above a threshold elicits anti-tumor immunity as effective as interleukin-12 and prolongs survival in murine B-cell lymphoma*. Int J Cancer, 2004. **110**(1): p. 61-9.
44. Briones, J., J. Timmerman, and R. Levy, *In vivo antitumor effect of CD40L-transduced tumor cells as a vaccine for B-cell lymphoma*. Cancer Res, 2002. **62**(11): p. 3195-9.
45. Avogadri, F., et al., *Cancer immunotherapy based on killing of Salmonella-infected tumor cells*. Cancer Res, 2005. **65**(9): p. 3920-7.
46. Wei, N. *TNF in immune system*. 2004; Available from: <http://www.arthritis-treatment-and-relief.com>.
47. Balkwill, F., *TNF-alpha in promotion and progression of cancer*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 409-16.
48. Ciacci-Woolwine, F., et al., *Salmonella flagellin induces tumor necrosis factor alpha in a human promonocytic cell line*. Infect Immun, 1998. **66**(3): p. 1127-34.
49. Kodama, C. and H. Matsui, *Salmonella flagellin is not a dominant protective antigen in oral immunization with attenuated live vaccine strains*. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 2449-51.
50. 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.