



Facultad de Ciencias – PEDECIBA Biología

Universidad de la República

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas - Biología Celular y Molecular

Marzo 2015

***Salmonella* como base para inmunoterapias contra melanoma**

Lic. Amy Mónaco Patiño

Orientador: Dra. María Moreno

Coorientador: Dr. Alejandro Chabalgoity

Tribunal Evaluador:

Dr. Gualberto González
Dr. Marcelo Hill
Dra. Sofía Grille

"He sido un hombre afortunado;
en la vida nada me ha sido fácil"

Sigmund Freud

Agradecimientos

Después de varios años que en momentos parecieron siglos y en otros pasaron volando, llega el momento de agradecer a todos quienes hicieron posible que este trabajo se plasmara en una tesis de Maestría.

Primeramente a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) por su financiación en distintos ámbitos del desarrollo de este trabajo.

A Alejandro, por seguir apostando a mi trabajo en este laboratorio y porque en los momentos que menos lo esperaba pero más lo necesitaba, estuvo ahí para tirarme flores ☺

A María... ¿qué decir? Tutora, compañera, amiga, consejera, confidente y hasta jefa pastelera cuando lo necesité... ¡No tengo palabras!

A mis amigos y compañeros de facultad y del laboratorio, por tantas charlas enriquecedoras entre mate y mate (y no voy a mentir, algún antojito dulce también!) que me levantaron el ánimo y dieron ideas y consejos, académicos y de la vida...

Del LVR, específicamente a Lu y Gabi por su incansable guía en lo que a biología molecular se refiere, a Andrés que el último tiempito me iluminó con la maravilla de la bioinformática y a la Negra, que hizo de mis fotos una obra de arte!

A mi familia, que desde la distancia siempre estuvieron presentes y nunca dudaron de mí, incluso cuando yo lo hacía.

A Marcos, el compañero de vida que me tuvo que bancar las rabietas, los experimentos fallidos, las llegadas ya entrada la noche a casa y las frustraciones, pero también me acompañó en las alegrías aunque muchas veces parecía que le hablara en chino...

A todos y cada uno de los que, de un modo u otro, se preocuparon por mí y me acompañaron en este largo camino de subidas y bajadas...

¡Gracias totales!

Índice de Contenidos

1.	Abreviaturas	1
2.	RESUMEN	3
3.	INTRODUCCIÓN	5
	Generalidades sobre el cáncer	5
	Melanoma	5
	Interacción sistema inmune-cáncer	7
	Inmunoterapias contra el cáncer	8
	Uso de bacterias para el tratamiento de cáncer	10
	<i>Salmonella</i> como inmunoterapia.....	11
	IL18 en terapias contra el cáncer	13
	<i>Salmonella</i> e inflamación.....	15
	Inflamasomas.....	15
	Inflamasomas y su activación mediada por <i>Salmonella</i>	17
	Flagelina e inflamación	18
	<i>Salmonella</i> LVR01 como vector de moléculas inmunomoduladoras	21
4.	OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	23
	Objetivo general	23
	Objetivos específicos.....	23
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
	1. Líneas celulares	25
	2. Generación de cepas bacterianas de trabajo.....	26
	3. Curvas de crecimiento	30
	4. Ensayo de estabilidad segregacional plasmídica	30
	5. Determinación del número de copias.....	31
	6. Western Blotting para detección de IL18	31
	7. Ensayos de invasión	33
	8. Evaluación de la citotoxicidad inducida por <i>Salmonella in vitro</i>	33
	9. Determinación de activación del inflamasoma mediada por <i>Salmonella in vitro</i>	33
	10. Animales	34
	11. Inducción de tumores y evaluación del efecto tumoricida de las distintas cepas de <i>Salmonella</i>	34
	12. Cuantificación de IL18 mediante ELISA	35

13.	Estudio de la expresión de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas en tumores tratados con <i>Salmonella</i>	35
14.	Análisis de células infiltrantes de tumor	37
15.	Análisis estadístico	37
16.	Análisis de Correspondencias	37
6.	RESULTADOS.....	39
1.	Puesta a punto de modelos experimentales	39
2.	Evaluación del rol de la flagelina en el efecto antitumoral de <i>Salmonella</i>	44
1)	Análisis de capacidad invasiva y citotóxica	44
2)	Evaluación de la participación de flagelina en la activación del inflamasoma	46
3)	Flagelina en la respuesta inmune inducida por <i>Salmonella</i> en un contexto tumoral.	48
4)	Estudio de las poblaciones celulares infiltrantes de tumor.....	51
5)	Análisis de correspondencias	54
3.	Evaluación de constructos plasmídicos codificantes para IL18 en LVR01	56
1)	Optimización de la expresión de IL18	60
7.	DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	63
	La expresión de IL18 no mejora el efecto antitumoral de <i>Salmonella</i>	63
	PAMPs... ¿los buenos o malos de la película?	65
	Caracterización de la respuesta inmune inducida por las diferentes cepas de <i>Salmonella</i> ...	70
8.	Perspectivas a futuro	73
9.	Referencias bibliográficas.....	77
10.	Trabajos derivados de esta Tesis	89
	Publicaciones	89
	Presentaciones orales dictadas.....	89
	Presentaciones de poster en congresos.....	89

1. Abreviaturas

ACo	Análisis de Correspondencias
BCG	Bacilo Calmette Guerin
CD	Célula dendrítica
cdK	Ciclo de Krebs
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
FDA	Food and Drug Administration
GFP	Proteína verde fluorescente
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
HsdR-/HsdM+	Restricción - / Modificación +
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFNγ	Interferón gamma
IK-DC	Células dendríticas citolíticas productoras de interferón (interferon-producing killer dendritic cell)
ILx	Interleuquina x
MRD	Enfermedad mínima residual
NLR	Nod-Like Receptor
NK	Natural killer
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PR-3	Proteinasa-3
pre-mNK	Pre-mature Natural Killer
qPCR	PCR cuantitativa
rhIL18	Interleuquina 18 recombinante humana
ROS	Especies reactivas del oxígeno

SPI-1/2	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> 1/2
SST3	Sistema de secreción de tipo 3
TAA	Antígenos asociados a tumor
TAR	Aspartate/maltose receptor
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TLR	Toll-Like Receptor
Tregs	Células T reguladoras
TRG	Ribose/galactose receptor
ufc	Unidades formadoras de colonia
VEGF	Vascular endothelial growth factor

2. RESUMEN

Con la notable excepción de las leucemias agudas y cáncer testicular que representan los grandes éxitos de la quimioterapia, los tumores sólidos se curan sólo cuando se extirpan quirúrgicamente en un estadio local. Después de un largo período de evaluar el uso de agentes inmunoestimulantes genéricos tales como BCG o citoquinas, la inmunoterapia ha comenzado a concretar su gran potencial con las primeras vacunas terapéuticas dirigidas. Dentro de la gran variedad de tipos de cáncer, el melanoma resalta dado el gran aumento en su incidencia a nivel mundial; y su inmunogenicidad lo hace un buen candidato para inmunoterapias. En particular, aquellas basadas en el uso de bacterias como *Salmonella* se vuelven atractivas por su naturaleza antitumoral intrínseca y su capacidad de liberar diferentes moléculas coestimuladoras específicamente en el microambiente tumoral.

En este trabajo nos propusimos avanzar en el uso de *Salmonella* viva atenuada como vacuna para melanoma y en ese sentido abordamos el problema mediante el desarrollo de un modelo preclínico de enfermedad mínima residual que se ajuste más a la realidad de los pacientes clínicos. Asimismo, en un intento por establecer las bases moleculares responsables de la respuesta antitumoral inducida por *Salmonella* valoramos la relevancia de la flagelina, dado que es un patrón molecular clave en la actividad inflamatoria desencadenada por la bacteria. Por otra parte, intentamos optimizar esta modalidad terapéutica induciendo a *Salmonella* a producir IL18, molécula con conocida capacidad antitumoral y antiangiogénica.

Nuestros resultados muestran que si bien flagelina no es esencial en la actividad antitumoral de *Salmonella*, existen diferencias en los mecanismos inmunes activados, particularmente en lo que refiere a los complejos de inflamasoma e infiltración celular, los cuales ameritan un estudio más profundo. *Salmonella* sigue siendo una alternativa a tener en cuenta para el tratamiento de melanoma, hecho demostrado tanto en los modelos clásicos como en el desarrollado en este trabajo, debido a que es capaz de inducir una fuerte activación de la respuesta inmune global. Esto se evidencia por el reclutamiento al tumor de neutrófilos y otras células con fenotipo pre-mNK, acompañado por una fuerte expresión de citoquinas y quimioquinas entre las que se destacan CXCL1, CXCL2, IFN γ , IL12 e IL18. A pesar de ello, encontramos que la expresión de esta última citoquina mediada por *Salmonella* no potencia el efecto antes mencionado por lo que la curación total de esta enfermedad sigue representando un desafío que debe ser considerado.

3. INTRODUCCIÓN

Generalidades sobre el cáncer

En Uruguay, así como en el resto de América Latina los tumores malignos constituyen la segunda causa de muerte por enfermedad luego de las patologías cardiovasculares, dando cuenta actualmente de una cuarta parte de todas las defunciones registradas [1]. Si bien en general tanto la tasa de incidencia como la de mortalidad por cáncer han disminuido a nivel mundial, tipos particulares de cáncer como melanoma aumentan constantemente, encontrándose entre los tipos de cáncer más frecuentes en adultos jóvenes [2]. Los tratamientos con drogas contra el cáncer comúnmente se clasifican en cuatro clases diferentes: i) quimioterapia, que implica un gran grupo de fármacos citotóxicos que interfieren con la síntesis de ADN y la división celular; ii) terapia hormonal, en la que fármacos interfieren con la señalización del crecimiento a través de receptores hormonales en células cancerosas; iii) terapia dirigida, que consiste en un grupo novedoso de anticuerpos y pequeñas moléculas inhibitoras de quinasa específicamente dirigidas a las proteínas implicadas en vías de señalización de crecimiento en las células cancerosas; y iv) inmunoterapia, que apunta a la inducción o al aumento de la respuesta inmune contra el cáncer [3]. Otras terapias ofrecidas actualmente como radioterapia tienen limitaciones considerables, incluyendo toxicidad, penetración inadecuada de tejidos y poca especificidad tumoral, entre otras; y frecuentemente se asocian a efectos secundarios severos [4, 5]. Por esas razones, la inmunoterapia se vuelve una estrategia muy atractiva, ya que en ciertas circunstancias modula al propio sistema inmune del individuo para actuar contra el tumor (evitando la tolerancia generada por el tumor) y desarrollando respuestas inmunes más específicas y por lo tanto menos tóxicas para el resto de los tejidos circundantes. Dado que la mayor parte del conocimiento sobre las respuestas inmunes específicas se obtuvo en pacientes con melanoma, gran parte de los estudios en este campo se han realizado en este tipo de tumor [3].

Melanoma

“Melanoma” es el nombre genérico que se le asigna a tumores melánicos o pigmentados, y en su estadio metastásico es el causante de un 75% de las muertes relacionadas con cáncer de piel [6]. Se estima que al año 2012 se diagnosticaron alrededor de 76.000 casos, registrándose más de 9.000 muertes debidas a esta enfermedad [7]. Se trata de un tumor generalmente cutáneo y altamente invasivo por su capacidad de generar metástasis. A pesar de varios años de investigaciones extensivas, el único tratamiento efectivo actualmente es la resección

quirúrgica del tumor primario antes de que logre un grosor mayor de 1 mm y si no está diseminado. El método para estadificarlo se basa principalmente en el grosor del tumor (descrito mediante la escala de Breslow) y en el hecho de que se haya diseminado o no hasta los ganglios linfáticos u otras zonas del cuerpo (ya sea a través de tejido, linfa o sangre); siendo fundamental conocer ambos parámetros para planificar el tratamiento óptimo. De esta manera, el melanoma se clasifica en cinco estadios, que van desde el melanoma *in situ* (estadio 0) hasta el melanoma metastásico (estadio IV), como se esquematiza en la Figura 3.1.

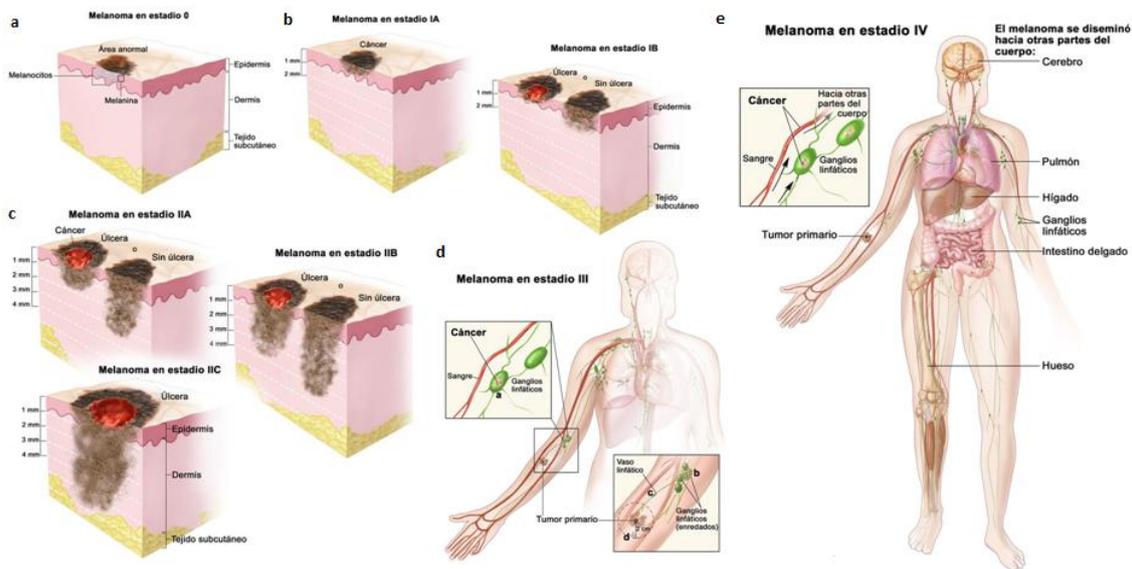


Figura 3.1. Estadios del melanoma. a. Melanoma *in situ*. Los melanocitos anormales se encuentran únicamente en la epidermis. b. Melanoma en estadio I. En el estadio IA, el tumor mide menos de 1 mm de grosor, pero no presenta úlcera. En el estadio IB, el tumor mide menos de 1 mm de grosor, con presencia de úlcera, o el tumor mide más de 1 mm pero no más de 2 mm de grosor, sin presencia de úlcera. c. Melanoma en estadio II. En el estadio IIA, el tumor mide entre 1 y 2 mm de grosor, con ulceración o mide más de 2 mm pero no más de 4 mm de grosor, sin ulceración. En el estadio IIB, el tumor mide más de 2 mm pero no más de 4 mm de grosor, sin ulceración o mide más de 4 mm de grosor, sin ulceración. En el estadio IIC, el tumor mide más de 4 mm de grosor, con ulceración. d. Melanoma en estadio III. El tumor puede ser de cualquier grosor, con o sin ulceración y a) el cáncer se diseminó hasta uno o más ganglios linfáticos; b) los ganglios linfáticos con cáncer pueden estar unidos entre sí (enredados); c) el cáncer puede estar en un vaso linfático entre el tumor primario y los ganglios linfáticos cercanos, o d) se pueden encontrar tumores muy pequeños debajo de la piel o sobre esta, que no están a más de 2 cm del tumor primario. e. Melanoma en estadio IV. El tumor se ha diseminado hacia otras partes del cuerpo, alejadas del melanoma primario. Imagen extraída y modificada del National Cancer Institute [8].

Interacción sistema inmune-cáncer

Dada la comprensión actual de los eventos que generan y regulan la inmunidad antitumoral, se postula que existen tres pasos básicos que se deben alcanzar -ya sea de manera espontánea o terapéutica- para que se genere una inmunidad antitumoral efectiva. Las respuestas inmunes antitumorales deben comenzar con la captura de antígenos asociados a tumores (TAA) por parte de células dendríticas (CD). Posteriormente las CD procesan el antígeno capturado para presentación en el MHC de clase II o I (presentación directa o cruzada, respectivamente) y migran a los ganglios linfáticos drenantes. Si la captura y presentación se produjo en presencia de un estímulo inmunogénico adecuado, las CD madurarán (induciéndose así la expresión de distintas moléculas coestimuladoras en su superficie) e inducirán respuestas de células T efectoras contra cáncer en el ganglio linfático. Por el contrario, si no reciben el estímulo apropiado inducirán tolerancia conduciendo a la eliminación de células T, anergia o producción de células T reguladoras (Tregs). En el ganglio linfático, la presentación de antígeno a las células T provocará una respuesta en función del tipo de estímulo de maduración recibido y de la expresión de moléculas coestimuladoras en las CD, los cuales interactuarán con receptores de superficie sobre las células T. Por lo tanto, la interacción de CD28 u OX40 con CD80/86 u OX40L (respectivamente) promoverá respuestas de células T potencialmente protectoras, mientras que la interacción de CTLA4 con CD80/86 o PD-1 con PD-L1/PD-L2 suprimirá las respuestas de células T, posiblemente promoviendo la formación de Tregs. Luego las células T antígeno-específicas (junto con las células B y NK) migran desde el nodo linfático hacia el lecho tumoral, donde el propio tumor o células mieloides supresoras infiltrantes pueden producir una serie de mecanismos de defensa inmunosupresores en oposición a la función efectora de las células T. Estos incluyen la regulación positiva de PD-L1/L2 en la superficie de células tumorales, la liberación de PGE2, arginasa e IDO (todos supresores de células T), y la liberación de VEGF (provocada en parte por la hipoxia intratumoral), que inhibe la diapédesis de las células T desde la vasculatura, y por lo tanto, su infiltración en el lecho del tumor (ver Figura 3.2) [9].

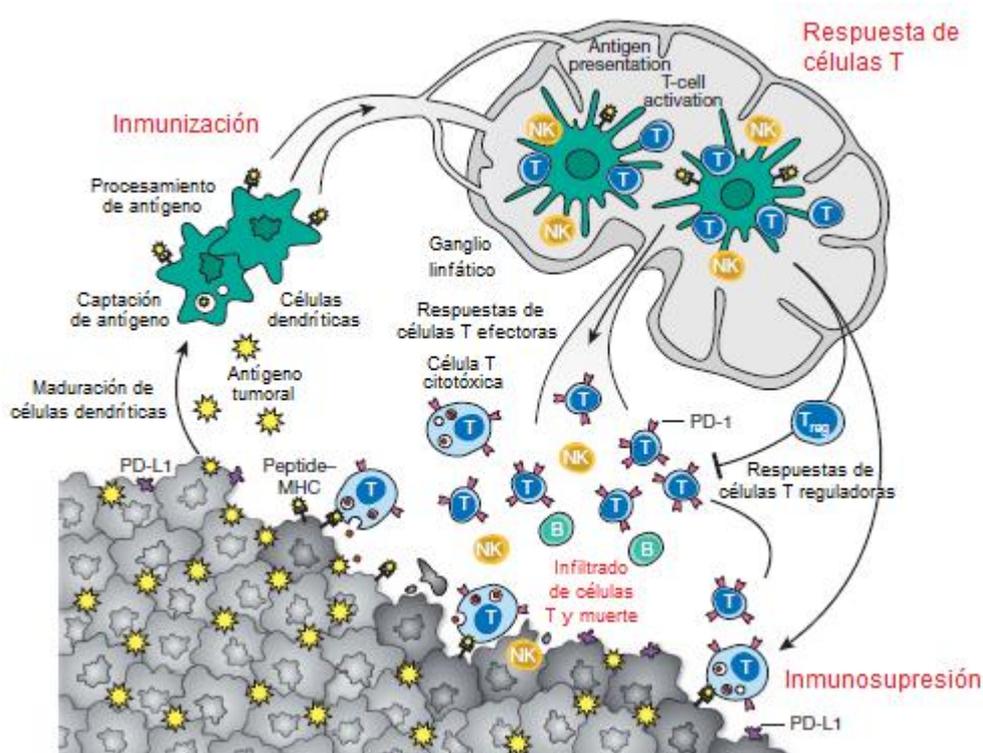


Figura 3.2. Generación y regulación de inmunidad antitumoral. Existen al menos tres sitios blanco para intervención terapéutica: promover las funciones de presentación de antígeno de las células dendríticas, promover la producción de respuestas protectoras de células T y superar la inmunosupresión en el lecho tumoral. Imagen extraída y modificada de Mellman *et al* 2011 [9].

Inmunoterapias contra el cáncer

Hasta el momento, más de cincuenta nuevos compuestos han sido aprobados para el tratamiento de malignidades sólidas o hematológicas [10], siete de los cuales son indicados para pacientes con distintas condiciones de melanoma, tal como se explicará más adelante. Además de antagonizar vías oncogénicas, estos bioterapéuticos también pueden actuar opsonizando células tumorales y provocando su muerte y eliminación por fagocitosis o citotoxicidad mediada por anticuerpos. Recientemente se ha logrado con éxito conjugar toxinas a anticuerpos de manera de inducir una respuesta clínica en pacientes refractarios al anticuerpo “desnudo” [11]. Sumado a esto, la adición al sistema de citoquinas inmunoestimuladoras como IL2 o GM-CSF aumenta aún más la eficacia de estas terapias.

Actualmente, Sipuleucel-T (Provenge®) es la única vacuna personalizada que utiliza células dendríticas autólogas cargadas con una proteína recombinante, fusión del antígeno PAP (sigla del nombre en inglés prostatic acid phosphatase) y GM-CSF (PA2024) como inmunógeno. Esta vacuna está indicada para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata recurrente dependiente de andrógenos desde el año 2010, dados resultados alentadores de ensayos

clínicos fase I y II en los que se demostró su seguridad y se observó prolongación de la supervivencia media de 6,9 a 12,7 meses así como disminución de los niveles de antígeno prostático específico (PSA) cuando se utilizó en combinación con bevacizumab (Avastin®), un anticuerpo monoclonal anti-VEGF-A [12].

En estos últimos años se han suscitado cambios sustanciales de la mano de la inmunoterapia y de los inhibidores de la transducción de señales que mejoraron las perspectivas. En particular, y debido a la comprensión de cómo el sistema inmune puede ser modulado para luchar contra melanoma así como la identificación de mutaciones oncogénicas, recientemente han surgido nuevos tratamientos para los pacientes con melanoma, en especial metastásico. De esta forma, en solo 2 años la Food and Drug Administration (FDA) aprobó cuatro nuevas drogas para tratamiento de este estadio del melanoma (revisado en [13]). En el 2011, se aprueba el uso de Ipilimumab (Yervoy®), anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 que promueve la activación de linfocitos T mediante el bloqueo de la vía de inhibición, respaldado en resultados alentadores obtenidos en ensayos clínicos fase III que demostraron claros beneficios en la supervivencia global a largo tiempo [14]. En el mismo año, se aprueba Vemurafenib (Zelboraf®) para el tratamiento de pacientes portadores de melanoma metastásico o irresecable que posean la mutación específica V600E en el gen BRAF. Su uso asociado a dacarbazina extiende 4 meses la supervivencia global en comparación con la monoterapia con dacarbazina [15]. Sucesivamente la FDA también aprueba el uso de Dabrafenib (Tafinlar®), otro inhibidor de BRAF, y Trametinib (Mekinist®), un inhibidor de MEK, ambos para el tratamiento del melanoma metastásico no resecable con la mutación V600E o V600K en BRAF [16, 17]. Asimismo, en setiembre y diciembre del 2014 la FDA aprobó el uso de Pembrolizumab (Keytruda®) y Nivolumab (Opdivo®) respectivamente, ambos anticuerpos monoclonales anti-PD-1, para usar en combinación con ipilimumab con o sin el uso adicional de algún inhibidor de BRAF.

A pesar de lo anteriormente mencionado, el poco aumento en la supervivencia global, el bajo índice de respuesta (ipilimumab) o la corta duración de la respuesta (vemurafenib), la toxicidad y los elevadísimos costos [18-21] hacen que la búsqueda de nuevas terapias, mejores y más económicas, continúe siendo imperiosa.

Por otra parte, otros tratamientos inmunes que han recibido aprobación de la FDA incluyen citoquinas recombinantes, solas o con modificaciones para mejorar su disponibilidad y biodistribución (IL-2, IFN- α , etc.). Un ejemplo claro de esto es la aprobación de Sylatron® (interferon alfa-2b pegilado) como adyuvante en pacientes con melanoma estadio III resecado, aunque el mecanismo por el que se ejercen sus efectos se desconoce [22].

Uso de bacterias para el tratamiento de cáncer

Desde mediados del siglo XIX algunas bacterias y sus productos se han utilizado como agentes terapéuticos para tratar tumores sólidos [23, 24]. Sin embargo, la toxicidad significativa asociada con estos tratamientos ha obstaculizado su uso generalizado [25-27], limitándolo al uso de la cepa de BCG de *Mycobacterium bovis* para el tratamiento de carcinomas superficiales de vejiga. En ese sentido, varios estudios han demostrado una clara relación entre el uso inmunoproláctico de BCG luego de la remoción quirúrgica del tumor y la disminución de la tasa de recurrencia del mismo [28, 29], llevando dicha terapia a una extensa aplicación clínica. En esa misma línea, actualmente un grupo de investigadores del Instituto Alexander Fleming de Buenos Aires se encuentra evaluando en fase final una vacuna terapéutica para el tratamiento adyuvante del melanoma cutáneo post-cirugía basada en el uso de células irradiadas de melanoma cutáneo humano, junto a BCG y molgramostin (rhGM-CSF). Esta vacuna, llamada CSF-470, ha prolongado la vida de los sujetos de prueba, conservando su calidad de vida y sin presentar efectos adversos severos. De hecho, datos de referencia indican que pacientes con tumores primarios profundos y metástasis regionales no tratados presentan una supervivencia libre de enfermedad promedio a 8 años del 30%. Resultados a la fecha de los pacientes de este ensayo de fase I indican que, con un seguimiento medio de 8 años, un 70% de los 12 pacientes estadio IIb y III vacunados continúa libre de enfermedad. Aún resta comparar su eficacia terapéutica con respecto al IFN α -2b, que es el tratamiento adyuvante estándar [30].

Finalmente, otro grupo de investigadores del Ludwig Institute for Cancer Research en Australia está evaluando en fase I la seguridad de una inmunoterapia combinada de BCG a nivel intralesión e ipilimumab intravenoso [31].

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 [32], llegando a concentraciones de hasta 10^9 unidades formadoras de colonia (ufc) por gramo de tejido tumoral [33]. Esta acumulación puede ser explicada por una variedad de mecanismos, como i) el acceso a los nutrientes liberados por las células necróticas en las zonas hipóxicas de los tumores de rápido crecimiento, ii) disminución de la actividad bactericida de los macrófagos y granulocitos debido a la falta de oxígeno, iii) la supresión del sistema inmunitario en regiones del tumor, iv) quimiotaxis defectiva de granulocitos debida a citoquinas derivadas de tumor como TGF- β , v) cantidad reducida de anticuerpos antimicrobianos y factores del complemento debido a la vasculatura irregular y presión positiva dentro de los tumores [34]. Esta acumulación tumoral observada en bacterias anaerobias

facultativas como *Salmonella*, *Shigella* [35] o *Clostridium* [36] ha demostrado en varios casos causar un enlentecimiento en el desarrollo tumoral y prolongar la supervivencia de los animales [37]. Por lo tanto, la capacidad intrínseca de las bacterias anaeróbicas para localizar a los tumores teóricamente podría ser aprovechada para la entrega de moléculas terapéuticas de una manera específica.

Salmonella como inmunoterapia

Salmonella además posee muchas características que la postulan como un excelente agente terapéutico antitumoral con potencial como vector de vacunación (Figura 3.3). Algunas de estas se detallan a continuación:

- Facilidad de crecimiento en condiciones de laboratorio. *Salmonella* tiene ciclos de replicación cortos y los costos de mantenimiento de las cepas son muy bajos [38].
- Capacidad de acumularse y replicarse preferentemente en el microambiente tumoral [39]. 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, tipo de tumor y cepa bacteriana utilizada.
- *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 sensedas por receptores localizados en los polos de la membrana externa de estas bacterias, como TAR y TRG [40]. 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 [24, 41, 42], hecho altamente favorable ya que estas zonas tienden a ser más resistentes a radiación y quimioterapia [34].
- *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 [43-45]. De hecho, la FDA ha aprobado el uso de una cepa de *Salmonella* Typhi en humanos como vacuna contra la fiebre tifoidea (*S. typhi* Ty21a, Vivotif®).

- *Salmonella* posee una actividad antitumoral intrínseca ampliamente demostrada, que depende de la cepa y el modelo experimental utilizado [39, 46]. 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 [47].

Clásicamente se atribuye el efecto antitumoral de las infecciones bacterianas a dos tipos de mecanismos diferentes: por un lado, a una acción antitumoral 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* [48]. En este contexto, luego de la infección con *Salmonella* se produce una gran infiltración de neutrófilos [23] y se activan vías de señalización como NFκβ 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 [49]. Distintas especies del género *Salmonella* son capaces de estimular la respuesta inmune del hospedero dado que expresan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que pueden ser reconocidos por células del sistema inmune innato, desencadenando una respuesta apropiada.

- 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 (revisado en Moreno et al., 2010 [38]).

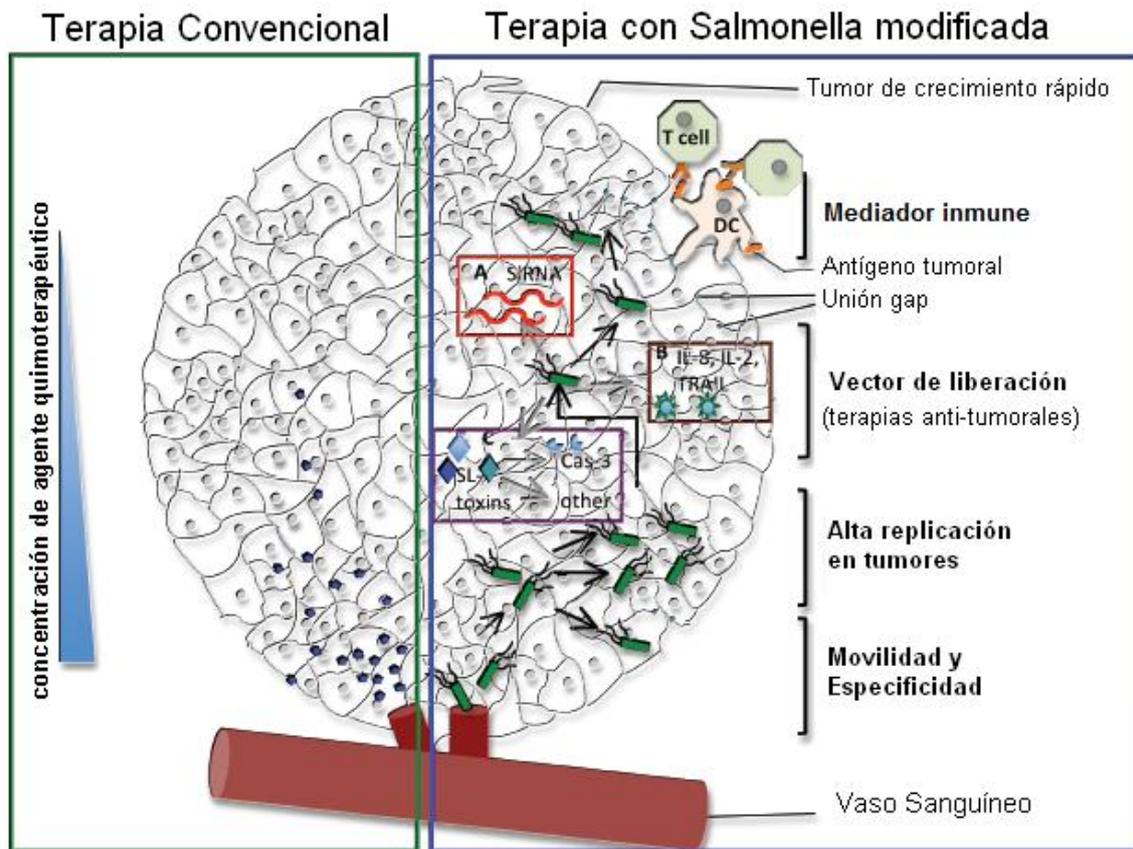


Figura 3.3. Representación esquemática de las ventajas ofrecidas por *Salmonella* como agente terapéutico antitumoral en comparación con terapias convencionales con agentes quimioterapéuticos. El recuadro verde muestra como los agentes antitumorales convencionales son incapaces de penetrar en lo profundo de tumores de rápido crecimiento, mientras que el recuadro azul representa la terapia mediante *Salmonella* modificada. Imagen extraída y modificada de Wall *et al* 2010 [4].

IL18 en terapias contra el cáncer

Existe una larga lista de citoquinas con potencial antitumoral que se están ensayando. Una de ellas es interleuquina 18 (IL18), una citoquina perteneciente a la superfamilia IL-1, que fue primariamente identificada como un factor inducible de interferón gama (IFN γ) [50]. Es producida en su forma inactiva (pro-IL18, de 24kDa) por macrófagos, células natural killer (NK) y linfocitos T, entre otras células del sistema inmune (aunque su producción no está supeditada únicamente a éstas células), para luego ser clivada intracelularmente por caspasa-1 resultando en una molécula funcional de 18kDa. Sin embargo, también ha sido identificada una esterasa de serina extracelular (PR-3) capaz de realizar este clivaje, sugiriendo que pro-IL18 también puede ser procesada extracelularmente [51]. Al estimular la producción de IFN γ , IL18 se describe como una citoquina inductora de respuestas tipo Th1, aunque también se conoce su rol en la inducción de respuestas Th2 en ausencia de IL12 [52, 53]. Ha demostrado

ser crucial tanto en la vigilancia como en la eliminación de células tumorales por lo que su aplicación como posible inmunoterapia contra el cáncer ha sido ampliamente investigada. Este efecto antitumoral estaría mediado por células NK de manera FasL dependiente [54] (Figura 3.4). De hecho, cuando éste subset de células es depletado mediante el uso de anticuerpos monoclonales en ratones BALB/c portadores de sarcoma, la actividad antitumoral de IL18 se ve suprimida [55]. Por otra parte, se ha demostrado que IL18 aumenta la presentación antigénica, induciendo así una respuesta antígeno específica mediada por linfocitos T citotóxicos [56].

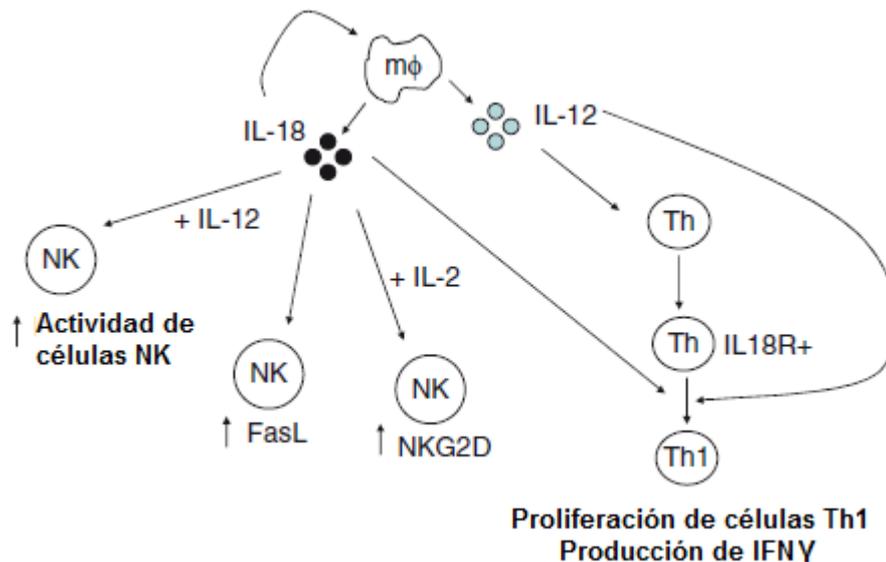


Figura 3.4. IL18 induce respuestas Th1 y activación de células NK. IL12 induce la expresión del receptor de IL18. Luego, IL12 e IL18 sinérgicamente inducen la producción de IFN γ y la proliferación de células Th1. IL18 induce la expresión de FasL, en combinación con IL12 activa células NK y en combinación con IL2 aumenta la expresión de NKG2D. Imagen extraída y modificada de Chirathaworn *et al* 2009 [57].

Sin embargo, diversos resultados que involucran IL18 en la progresión del cáncer también han sido reportados. Park y colaboradores fueron el primer grupo en reportar la elevada producción y secreción de IL18 en pacientes con distintos tipos de cáncer, incluido melanoma, en asociación positiva con la malignidad de la enfermedad [58]. Asimismo se ha relacionado también la expresión de IL18 por parte de células B16F10 (melanoma metastásico murino) con su capacidad de migrar [59].

Sin embargo, su valor como inmunoterapia aún sigue vigente. Estudios fase I de toxicidad, farmacocinética y actividad biológica en pacientes con melanoma avanzado (y otros tipos de cáncer) demostraron la seguridad del tratamiento con dosis biológicamente activas de IL18 humana recombinante (rhIL18) [60]. De igual forma, la inmunización con vacunas a ADN (con el gen de IL18 humana) ha sido ampliamente estudiada para aumentar la respuesta inmune tanto celular como humoral contra cáncer y otras enfermedades infecciosas. En ese contexto,

el gen codificante para IL18 ha sido usado solo o fusionado a varios genes para otras citoquinas o proteínas, demostrando que la forma de presentar y expresar IL8 resulta clave.

Salmonella e inflamación

Dado que *Salmonella* posee varios patrones moleculares que son detectados por el sistema inmune (entre ellos LPS, flagelina, ADN bacteriano), exhibe una gran capacidad de activarlo, induciendo así un estado de inflamación que se manifiesta fisiológicamente con una cascada de citoquinas pro-inflamatorias y reclutamiento de células inflamatorias como neutrófilos [61]. Este estado sería en parte, responsable de la respuesta antitumoral inducida por *Salmonella*. Asimismo, células tumorales infectadas con estas bacterias serían blanco de linfocitos T *Salmonella*-específicos que reconocen en las células tumorales infectadas determinantes antigénicos de origen bacteriano [62]. Sin embargo, hasta la fecha no se han podido caracterizar en profundidad los mecanismos efectores responsables de este efecto antitumoral.

Inflamasomas

Además de los TLRs, existe otra amplia familia capaz de mediar la activación de la inmunidad innata en respuesta al reconocimiento de PAMPs, y son los receptores de tipo Nod (NLRs). Estos sirven como plataforma de activación para los inflamasomas, grandes complejos multiproteicos (700 kDa) claves en lo que a inflamación se refiere, esenciales para la activación de caspasas (cisteinil-aspartato proteasas) [63] y la subsecuente maduración de sus sustratos, que terminan en la inducción de piroptosis, un tipo de muerte celular caracterizado por pérdida de la integridad de la membrana plasmática e inflamación local [64, 65]. La activación de caspasa-1 mediada por el inflamasoma ocurre en diversos tipos celulares, pero ha sido principalmente observada en macrófagos, células dendríticas y células epiteliales.

Estructuralmente, los NLRs poseen tres dominios bien definidos: un dominio C-terminal que presenta repeticiones ricas en leucina LRR, esenciales para el reconocimiento microbiano; el dominio central constituye un dominio de auto-oligomerización dependiente de ATP, que permite el reclutamiento de otros componentes tras la activación; y un dominio N-terminal variable, responsable de mediar la transducción de la señal y/o la activación de caspasa través del inflamasoma [66].

La composición del inflamasoma es dependiente del estímulo inicial y según sea el ligando reconocido, será ensamblado sobre los diferentes NLRs [67, 68]. Los ligandos de los NLRs son muy variados e incluyen componentes bacterianos, virales, parasitarios e incluso componentes

del propio hospedero que se reconocen como señales asociadas al daño (DAMPs, de Danger Associated Molecular Patterns), como por ejemplo ácido úrico o ATP (Figura 3.5). Algunos de los ligandos caracterizados incluyen el muramil-di-péptido de la pared celular por NLR2 (NOD2), flagelina por NLR4 o NAIP5, ácido-di-amino-pimélico por NLR1 (NOD1), o neumolisina por NLRP3 (NALP3), entre otros [66].

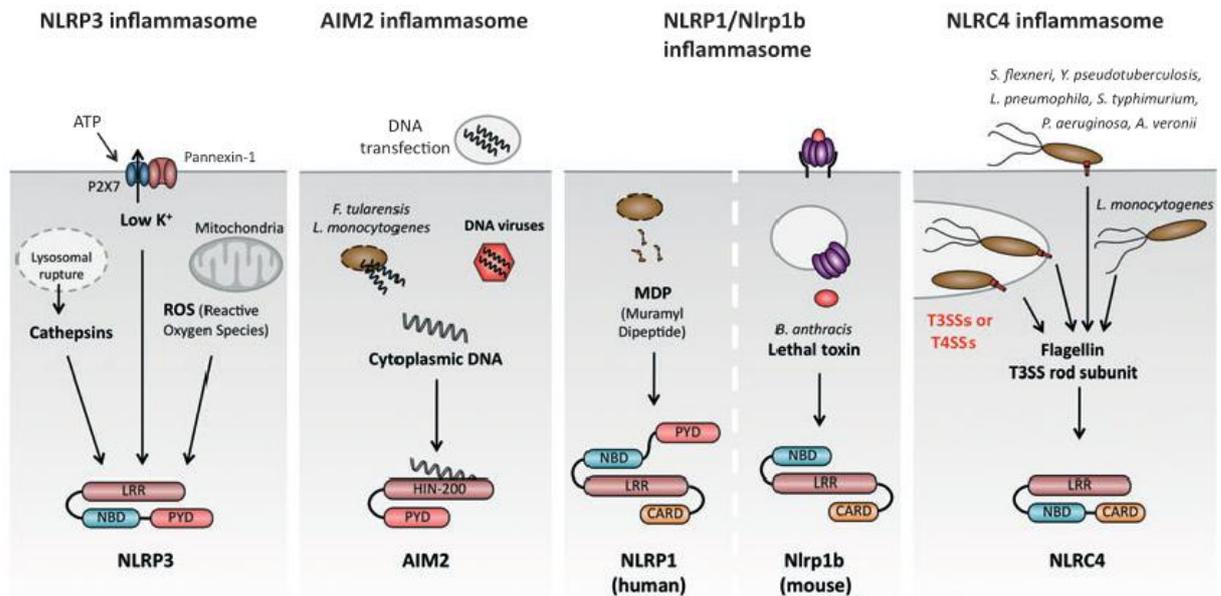


Figura 3.5. Esquema de los diferentes inflammasomas y sus estímulos de activación. Imagen extraída de Broz *et al* 2011 [69].

Varias proteínas juegan roles fundamentales en el correcto ensamblaje y activación del inflammasoma. Para la mayoría de los inflammasomas caracterizados, el adaptador ASC es requerido para activar la procaspasa-1 (si bien NLRP1 puede ensamblarse en ausencia de ASC, necesita esta proteína para potenciar su actividad inflamatoria), actuando como un puente entre los NLR activados y la procaspasa-1. Asimismo el dominio CARD es esencial para la agrupación de dos o más procaspasas para su transactivación autocatalítica inducida por proximidad [70] que a su vez iniciará la cascada proteolítica que desencadenará el procesamiento de procaspasa-1 y otros zimógenos como se menciona a continuación.

El ensamblaje del inflammasoma desencadena varios mecanismos efectores que participan en la eliminación de microorganismos y potencian la activación de la respuesta innata. Los efectos mediados a través de caspasa-1 son muy variados e incluyen la activación de IL1 β y IL18, dos potentes citoquinas proinflamatorias que presentan un rol crítico en la inflamación [67] y son sintetizadas en forma de precursores inactivos luego de una primera señal activada por ligandos de TLRs (Figura 3.6).

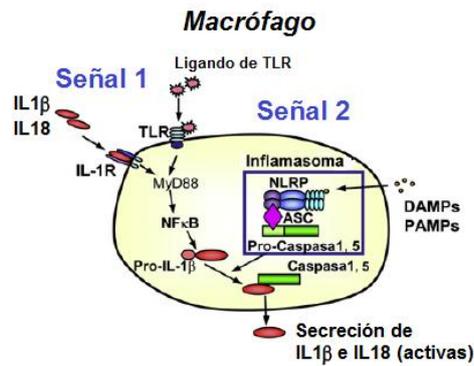


Figura 3.6. Diagrama representativo de las señales requeridas para la producción y secreción de IL1 β e IL18 en macrófagos humanos. Imagen extraída y modificada de Dunn *et al* 2012 [71].

Inflamasomas y su activación mediada por *Salmonella*

Salmonella en particular es capaz de activar los inflamasomas de diferentes maneras. La presencia de *Salmonella* a nivel intracelular activa NLRC4 y NLRP3. NLRC4 responde a flagelina inyectada mediante el SST3, mientras que NLRP3 responde a una señal aún no identificada, independiente del SST3 (Figuras 3.7A y 3.7B). Si bien ambos receptores inducen el ensamblaje de inflamasomas que procesan pro-IL1 β y pro-IL18 a sus formas maduras, el ensamblaje del NLRC4 puede ocurrir en ausencia del adaptador ASC, mientras que NLRP3 es completamente dependiente del mismo (Figura 3.7D). Asimismo, Broz y colaboradores demostraron que las cinéticas de ensamblaje de ambos varían, siendo la activación vía NLRC4 en cuestión de minutos luego de la infección mientras que la de NLRP3 es más lenta [72]. Sorprendentemente, la ausencia de ASC no tiene efecto en la susceptibilidad de ratones a la infección por *Salmonella* [73]. Una tercera vía de activación por *Salmonella* fue descrita en células epiteliales más recientemente, en la cual el factor de virulencia SopE sería el inductor de la activación de caspasa-1 (Figura 3.7C) mediante una vía aún desconocida. Müller y colaboradores demostraron que esta activación jugaría un rol significativo en la inflamación intestinal aunque no es suficiente para restringir la replicación bacteriana [74]. Finalmente, cabe destacar que NLRP3 y NLRC4 son redundantes frente a la infección por *Salmonella*, hecho que se comprobó mediante el uso de ratones mutantes para cada uno o ambos receptores. En el primer caso, los ratones eran tan susceptibles a la infección como los salvajes, mientras que los doble mutantes demostraron ser más susceptibles, al mismo nivel que los deficientes en caspasa-1 [72].

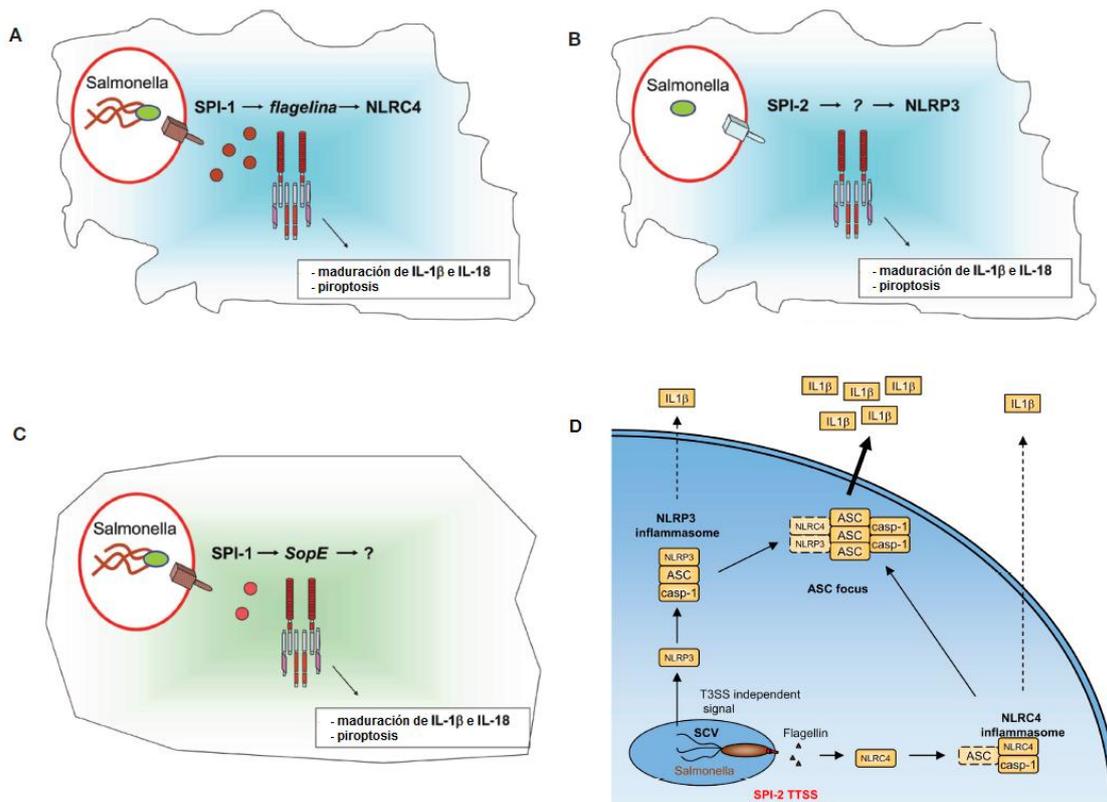


Figura 3.7. Representación esquemática de las vías de activación de caspasa-1 en células infectadas por *Salmonella* (A y B son macrófagos, C células de origen no hematopoyético). SCV: Vacuola contenedora de *Salmonella*. Imagen extraída y modificada de Franchi *et al* 2011 [75] y Broz *et al* 2010 [72].

Flagelina e inflamación

Como se mencionó recientemente, flagelina es uno de los componentes principales de la activación del inflammasoma por *Salmonella*. 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 [76], tanto patógenos como comensales. Esa ubicuidad es presumiblemente la responsable de que una variedad de organismos (desde plantas hasta vertebrados) hayan evolucionado hacia la detección de estas estructuras [77]. En mamíferos, la flagelina actúa como PAMP y, además del ya mencionado rol en la activación del inflammasoma [78, 79], es reconocida por el Toll-like receptor-5 (TLR5) a nivel de superficie basolateral de células epiteliales [77] desencadenando respuestas inmunes tanto locales como sistémicas (Figura 3.8).

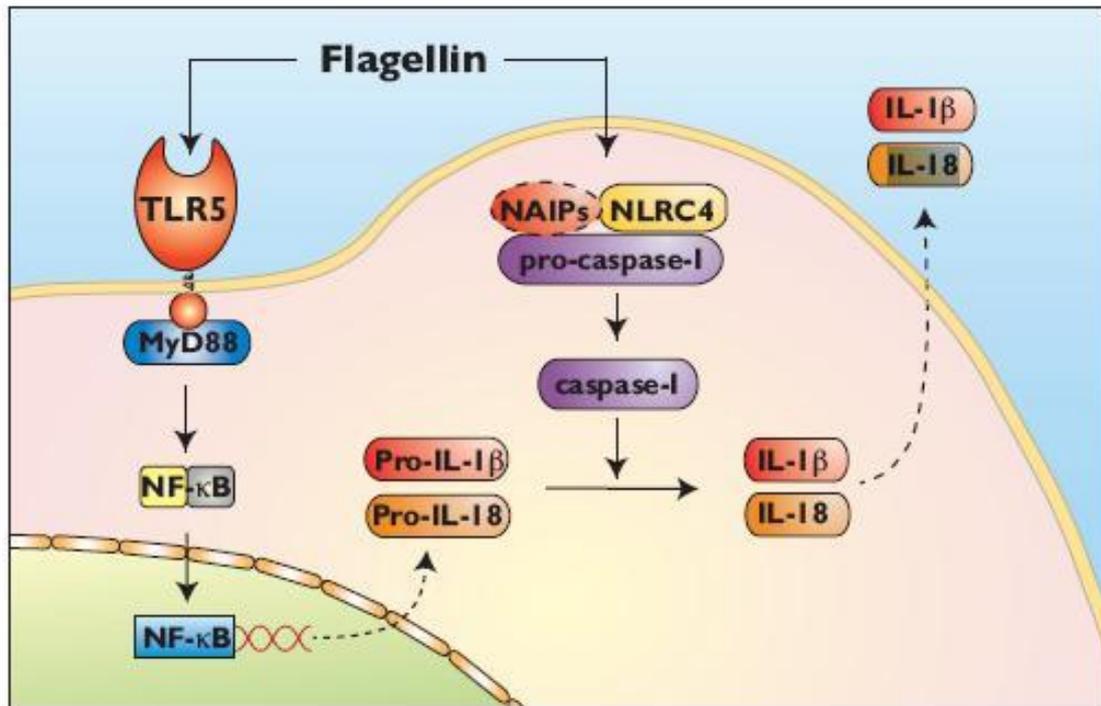


Figura 3.8. Vías de activación del sistema inmune mediadas por flagelina. La flagelina es un potente activador de sistema innato a través del reconocimiento por parte de dos receptores de diferente naturaleza: TLR5 y NLRC4. El reconocimiento mediante TLR5 conlleva a la activación de la vía de señalización MyD88 y ésta a la translocación nuclear del factor de transcripción NF-κB, lo que finalmente termina desencadenando la producción de las citoquinas pro-inflamatorias pro-IL1β y pro-IL18. Por otra parte la flagelina también puede ser inyectada en el citosol mediante el SST3, siendo allí reconocida por el receptor intracelular NLRC4, activando la formación de inflammasomas conduciendo a la activación de la caspasa-1 y la posterior maduración (mediante clivaje de sitio único) y secreción de IL1β e IL18. De esa manera, TLR5 y NLRC4 podrían actuar conjuntamente de modo de potenciar la inflamación, siendo TLR5 una señal capaz de inducir la transcripción de pro-IL1β y pro-IL18 y la activación de NLRC4 la segunda señal requerida para la maduración de dicha citoquina.

En particular, el serotipo Typhimurium de *S. enterica* presenta un fenómeno génico denominado variación de fase, en el cual por inversión de un segmento de ADN que contiene al promotor anterior al gen se expresan alternativamente dos genes diferentes *-fliC* y *fliB-* (Figura 3.9) [80] para dar lugar a dos subunidades proteicas de flagelina distintas, FliC y FliB (51,61 kDa y 52,54 kDa, respectivamente) [81].

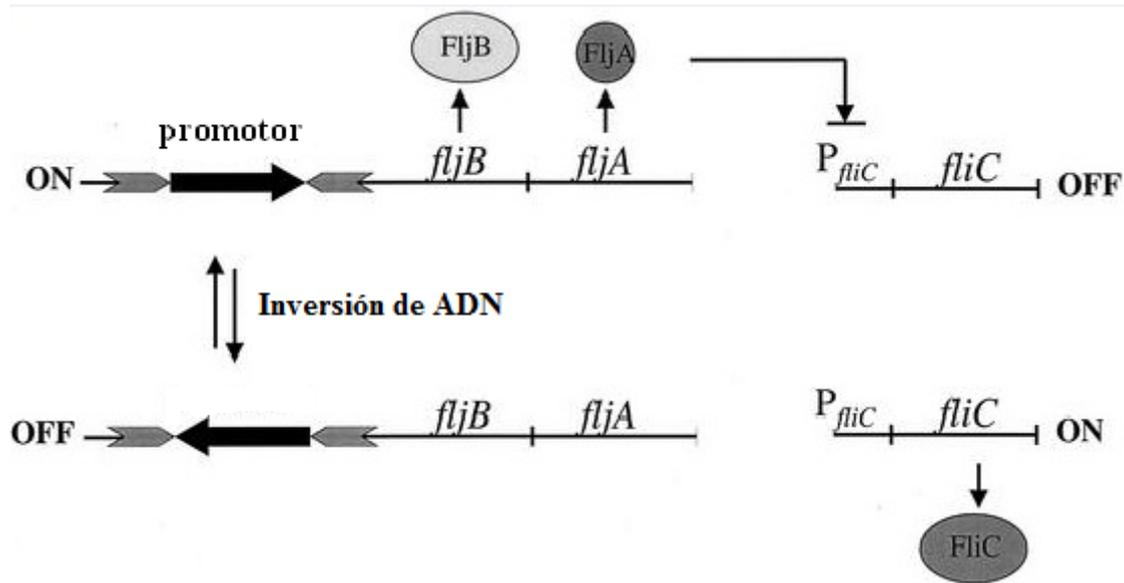


Figura 3.9. Representación esquemática de la variación de fase en *S. enterica*. El promotor del operón *fljBA* se localiza en un segmento de ADN de 970 pb invertible por acción de la enzima *Hin* recombinasa. En una orientación, el operón *fljBA* se expresa y se produce flagelina FljB junto con FljA, 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 [82].

El paso inicial de la patogénesis de *Salmonella* involucra el contacto entre la bacteria y la superficie apical de las células epiteliales del huésped, induciéndose así una clásica reacción inflamatoria aguda [83]. Ésta se caracteriza por translocación luminal de neutrófilos debido a gradientes quimiotácticos y la disrupción de la barrera epitelial que resulta en el eflujo de iones y agua. Además, muchas de las respuestas epiteliales a infección por *Salmonella* involucran activación transcripcional de mediadores inflamatorios, principalmente por las vías de NF- κ B y MAPK, con la finalidad de limitar la diseminación sistémica de la bacteria [84]. Zeng y colaboradores dedujeron mediante un extenso trabajo involucrando microarreglos que la flagelina no es solo necesaria sino que suficiente para estimular un perfil génico proinflamatorio en un modelo entérico *in vitro*. Al mismo tiempo ellos y otros autores han demostrado que la naturaleza proinflamatoria de la flagelina es una propiedad intrínseca de la proteína y no una consecuencia funcional de la movilidad bacteriana [76, 85] y comprobaron que los productos proteicos FliC y FljB (de *S. Typhimurium* en particular) son intercambiables respecto a su capacidad de señalización proinflamatoria [85]. En ese sentido, en nuestro laboratorio hemos demostrado que la inactivación de *fliC* (dejando *fljB* intacto) no altera la capacidad de *Salmonella* de aumentar la expresión *in vitro* de moléculas coestimuladoras en un modelo de linfoma a células B aunque sí modifica su capacidad de movilidad (datos no

publicados) [86], reforzando lo previamente reportado. Por su parte, otros autores han demostrado que mutantes inactivados en ambos genes *fliC* y *fljB* exhiben capacidad disminuida de inducir inflamación *in vivo* [84, 87, 88].

Por todo lo expuesto anteriormente entendemos que flagelina podría ser clave en la inducción de la inflamación y por ende en la respuesta antitumoral. En este trabajo proponemos estudiar dicho rol evaluando la respuesta inmune antitumoral inducida por *Salmonella* carente de flagelina en comparación con su cepa parental.

***Salmonella* LVR01 como vector de moléculas inmunomoduladoras**

Las vacunas a bacterias vivas con una variante atenuada del patógeno requieren un equilibrio intrínseco entre la invasión, persistencia y la inmunogenicidad que influye en el priming de la respuesta inmune. Se ha sugerido que la cepa vacunal ideal debería retener su patogenicidad en el momento de la inmunización para permitir la inducción de una respuesta inmune fuerte, pero atenuarse después para evitar la inducción de síntomas indeseables de la enfermedad [38]. Varias estrategias se han propuesto para alcanzar tales construcciones, en nuestro caso utilizamos una atenuación en la vía de los compuestos aromáticos, generando una cepa de *Salmonella* Typhimurium *aroC*⁻, llamada LVR01.

Distintas preparaciones vacunales multivalentes para el tratamiento de diversas enfermedades han sido desarrolladas a partir de esta cepa. Una vacuna recombinante expresando antígeno de *Echinococcus granulosus* (EgDF1) para su uso en perros demostró ser inmunogénica, desencadenando una respuesta parásito-específica en ratones y en perros [89, 90]. Asimismo, diferentes construcciones de LVR01 como vector de presentación de antígenos para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer y enfermedad priónica han sido evaluadas con éxito [91-93]. De hecho, recientemente se ha patentado el uso de dicha cepa como vector vacunal efectivo contra prionosis en ciervos [U.S. Patent No. 8.685.718]. Por su parte se ha evaluado positivamente el uso de esta cepa, ya sea sola o como vector para la administración de citoquinas, para el tratamiento del cáncer. En ese sentido, diversos trabajos fueron llevados a cabo en nuestro Departamento en los que quedó demostrado que las inmunoterapias basadas en *Salmonella* pueden constituir una alternativa para el tratamiento de melanoma y linfoma no-Hodgkin a células B dado su efecto antitumoral intrínseco sumado a la factibilidad de introducir genes foráneos fácilmente [42, 94-96].

Asimismo, existen varios antecedentes en lo que respecta al uso de *Salmonella* e IL18 para el tratamiento de cáncer. En nuestro laboratorio se evaluó el efecto terapéutico de una vacuna oral de *S. Typhimurium* LVR01 como vector portador de un plásmido codificante para IL18 bajo

la regulación de un promotor eucariota. En ese sentido, una única dosis de dicha vacuna resultó en una mayor supervivencia de los animales portadores de melanoma B16F1 subcutáneo [42].

Por otro lado, Loeffler y colaboradores evaluaron una cepa no virulenta de *S. Typhimurium* modificada para producir IL18, la cual produjo inhibición del crecimiento de tumores primarios subcutáneos así como metástasis pulmonares en ratones inmunocompetentes desafiados con distintas líneas celulares de carcinoma murino, sin causar toxicidad evidente a los tejidos normales [34]. La actividad antitumoral se asoció con aumento de la acumulación de los linfocitos T y las células NK en tumores, y la infiltración masiva de granulocitos, así como un aumento de la producción de varias citoquinas intratumorales.

Dado que esta estrategia no fue utilizada en melanoma, parte de nuestro trabajo se abocó a intentar reproducir estos resultados en distintos modelos de melanoma. En ese sentido, en el contexto de esta tesis nos centramos en la construcción y evaluación de distintas cepas vacunales de *S. Typhimurium* LVR01 expresando IL18 bajo el control del promotor procariota *pnir*, inducible en anaerobiosis. Este factor es clave ya que nuestro enfoque es que la bacteria comience a expresar IL18 una vez que alcanza la zona más interna del tumor, que es hipóxica, de forma de tratar el tumor desde adentro.

De esta manera esperamos ser capaces de incrementar la actividad antitumoral intrínseca exhibida por *Salmonella*, aumentando la especificidad de la terapia por el tumor y reduciendo así la posible toxicidad en tejidos circundantes.

4. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

Dados entonces los antecedentes y en base a estos resultados previos, los objetivos del presente trabajo son los siguientes:

Objetivo general

Avanzar en el uso de *Salmonella* como inmunoterapia para el tratamiento de melanoma, aportando a la optimización de los modelos experimentales, y al conocimiento de las bases celulares y moleculares de la actividad antitumoral de la bacteria

Objetivos específicos

- 1) Desarrollar un modelo pre-clínico de enfermedad mínima residual de melanoma, y evaluar el efecto antitumoral de *Salmonella* LVR01 en el mismo.
- 2) Evaluar el rol de flagelina en la respuesta inmune inducida y la capacidad antitumoral de *Salmonella*.
- 3) Estudiar el papel de la flagelina en la activación del inflamasoma por *Salmonella*.
- 4) Construir diferentes plásmidos para expresión de IL18 en *Salmonella* y evaluar su eficacia en distintos modelos experimentales.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas celulares

Para inducción de tumores *in vivo* se utilizaron las líneas celulares murinas B16F1 o B16F10 (American Type Culture Collection, ATCC) provenientes de melanoma de ratón con baja y alta capacidad metastásica, respectivamente, tal como se describe más adelante en la sección 5.11. Las células B16F1 y B16F10 fueron mantenidas en cultivo en medio DMEM High Glucose (PAA, Pasching, Austria) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (PAA) y L-glutamina 2mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) (DMEMsup). Cuando fue necesario, el mismo se suplementó con 200µg/ml geneticina (Sigma-Aldrich).

Asimismo, se evaluaron líneas de B16F10-GFP generadas en este laboratorio mediante transfección con plásmido codificante para esta proteína (pEGFP-N1 [97]). Brevemente, se transfectaron 2×10^5 células B16F10 por pocillo (sembradas en placa de 24 pocillos) con 500ng ADN plasmídico diluidos en 50µl medio DMEM con lipofectamina (Lipofectamine LTX and PLUS Reagents, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) durante 48 hs. Luego de este tiempo se cambió el medio para retirar trazas de complejos ADN-lipofectamina (que son tóxicos) y se comenzó a crecer las células con presión de antibióticos. De esta manera, las células se mantuvieron en cultivo con 200 µg/ml geneticina (Sigma-Aldrich) durante un mes y luego se seleccionó mediante separación celular por citometría de flujo (MoFlo, Beckman Coulter, Pasadena, California, USA; servicio del Instituto Pasteur de Montevideo) el 0,4% de las células más fluorescentes (se puede observar la región elegida en la Figura 5.1). Así, se obtuvieron 288 clones diferentes que fueron inspeccionadas periódicamente mediante microscopía de fluorescencia para comprobar el nivel de expresión de GFP y finalmente se eligieron 4 que fueron inyectadas i.d. (tal como se explicita más adelante en la sección 5.11) en ratones C57BL/6 para monitorear capacidad de implantación, crecimiento y metástasis en comparación con la línea sin transfectar, tanto externa como internamente (cámara In-Vivo MS FX Pro -Bruker, Billerica, Massachusetts, USA).

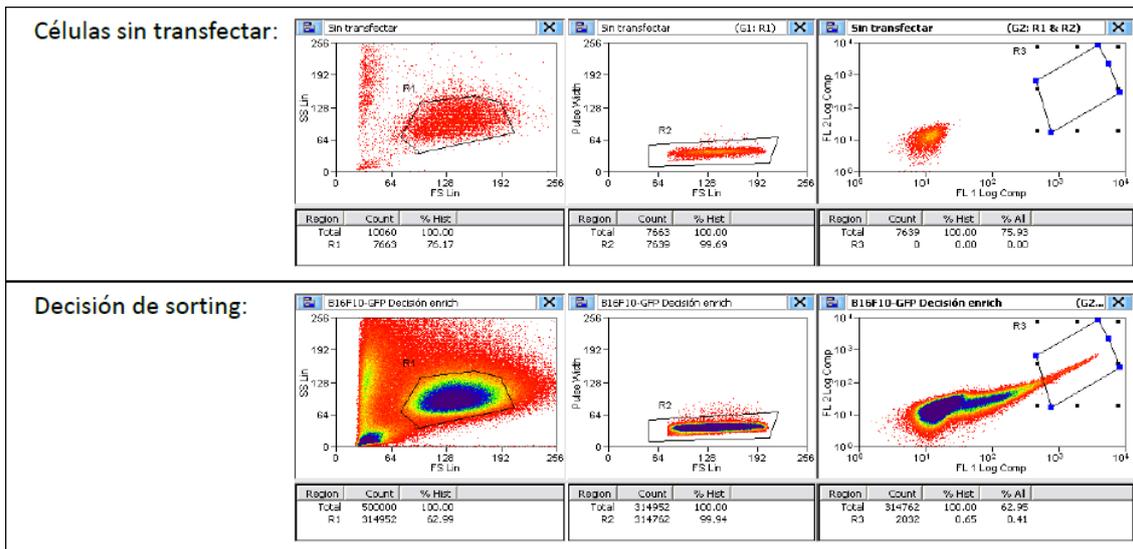


Figura 5.1. Decisión de sorting basada en la intensidad de fluorescencia de células de la línea B16F10-GFP en el canal FITC.

2. Generación de cepas bacterianas de trabajo

En el contexto del presente trabajo se utilizaron una serie de cepas bacterianas que se detallan en la Tabla 5.1. La mayoría fueron desarrolladas específicamente para este proyecto mediante transformación de LVR01 con diferentes plásmidos como se explicará a lo largo de esta subsección y una última contiene modificaciones a nivel de genoma cromosómico y fue generada en nuestro laboratorio anteriormente [86].

Para el crecimiento de las cepas de *S. Typhimurium* se utilizó el medio Luria Bertani (LB) y LB agar (LBA) suplementado cuando fue necesario con ampicilina (100µg/mL) o kanamicina (50µg/mL) (todos los reactivos de Sigma-Aldrich).

Tabla 5.1. Descripción de las cepas utilizadas en el presente trabajo

Nombre	Descripción	Referencia
LVR01	<i>S. Typhimurium</i> P228067 <i>aroC</i> -	[90]
LVR01-pnir-IL18	LVR01 con plásmido codificante para pro-IL18 (forma inactiva)	Este trabajo
LVR01-pnir-IL18sec	LVR01 con plásmido codificante para pro-IL18 y secuencia de secreción de <i>Yersinia</i>	Este trabajo
LVR01-pnir-IL18mad	LVR01 con plásmido codificante para IL18 (forma activa)	Este trabajo
LVR01-pnir-IL18madsec	LVR01 con plásmido codificante para IL18 y secuencia de secreción de <i>Yersinia</i>	Este trabajo
LVR01-pnir-IL18madflag	LVR01 con plásmido codificante para IL18 y secuencia de secreción de <i>Salmonella</i>	Este trabajo
LVR01flag-	<i>S. Typhimurium</i> LVR01 <i>fliC::kan^R/fjJB::Cm^R</i>	[86]

Como todas las cepas desarrolladas para este trabajo se generaron por transformación de LVR01 con diferentes constructos plasmídicos, en esta sección se explicitará el desarrollo de los mismos. Asimismo, se destaca que el esqueleto de todos proviene del mismo plásmido, pTECH2 [98], y la secuencia codificante para IL18 se extrajo de VR1012-IL18 [95].

Primeramente se construyó un plásmido codificante para el gen completo de pro-IL18 bajo control de un promotor procarionota inducible en anaerobiosis, que llamamos pnir-IL18. Con este fin, se amplificó este gen mediante PCR, utilizando cebadores que contuvieran extremos con sitios de corte para las enzimas de restricción XbaI y BglII (IL18 F y R, Tabla 5.2). Estas mismas enzimas fueron utilizadas para digerir el plásmido receptor pTECH2, por lo que luego se procedió a ligar ambos fragmentos con el Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas, Waltham, Massachusetts, USA) según instrucciones del fabricante. Para facilitar la visualización, todo el proceso se esquematiza en la Figura 5.2.

Tabla 5.2. Secuencias de cebadores. Descripción de las secuencias de los cebadores diseñados y utilizados en el contexto de este trabajo.

Cebadores		
IL18	F	5'-TCAGATCTAGGAGACGAATTCATGGCTGCCATGTCAGAA-3'
	R	5'-TGGTCTAGACTAACTTTGATGTAAGTTAGT-3'
IL18sec	F	5'-GATCTAGGAGAC GTCGAC ATGATCAGCAGCAGCAGCATCAGCG-3'
	R	5'-AATTCGCTGATGCTGCTGCTGCTGATCAT GTCGAC GTCTCCTA-3'
IL18mad	F	5'-CTGGTCGACAACCTTTGGCCGACTTCAC-3'
	R	(utilizamos IL18 R)
IL18madsec	F	5'-GAAGAATTCAACTTTGGCCGACTTCAC-3'
	R	(utilizamos IL18 R)
IL18madflag	F	5'-TCGACATGGGCACCGCGATTGAACGCCTGAGCAGCGGCCTGCGCATTACAGCGCGAAAGATGATGCGGCGGGCG-3'
	R	5'-AATTCGCCCCGCGCATCATCTTTCGCGCTGTTAATGCGCAGGCCGCTGCTCAGGCGTTCAATCGCGGTGCCCATG-3'

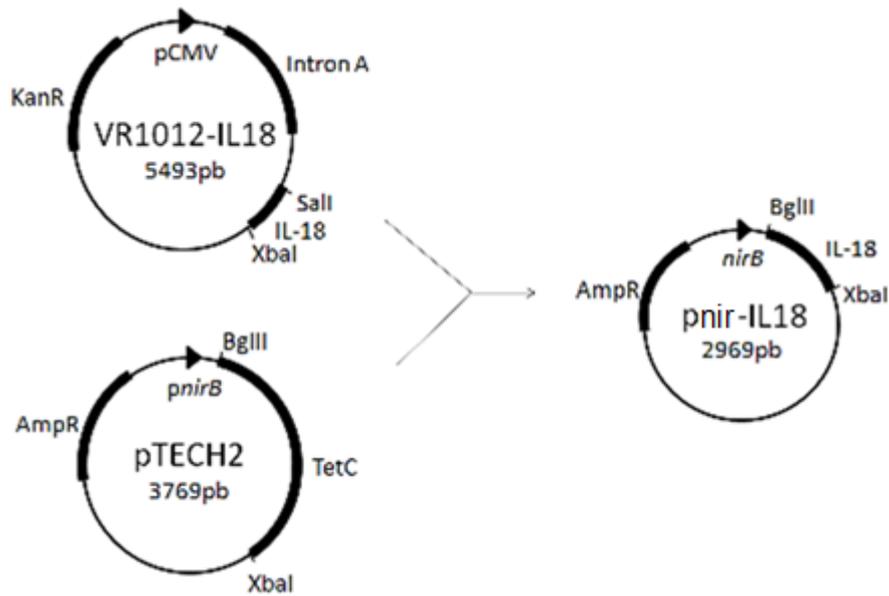


Figura 5.2. Partiendo de los plásmidos VR1012-IL18 y pTECH2 se construyó el plásmido de trabajo pnr-IL18 con un cassette de resistencia a ampicilina y el gen codificante para IL18 murina bajo control del promotor procariota inducible por anaerobiosis *nirB*.

De manera de optimizar el plásmido pnr-IL18 para la secreción de IL18, se incorporó una secuencia de secreción en el extremo N terminal del gen de interés. La misma se diseñó considerando el uso de codones de *E. coli* reportado por Sharp y colaboradores [99] y la secuencia aminoacídica proveniente de un sistema secretorio de *Yersinia* spp. descrita en Lloyd et al 2002 [100], como se muestra en la Tabla 5.3.

Esta secuencia se insertó por digestión de pnr-IL18 con EcoRI y BglII y posterior ligación con un fragmento doble hebra conteniendo esta secuencia sintetizado por hibridación de dos oligos complementarios con extremos cohesivos para estos sitios de corte (IL18sec F y R, Tabla 5.2); el plásmido resultante se denominó pnr-IL18sec (Figura 5.3).

En paralelo otra estrategia para mejorar la producción de IL18 fue utilizar solamente la secuencia codificante para IL18 en su forma activa en lugar de pro-IL18. De esta manera, se saltea el paso de clivaje de caspasa-1 para activar la citoquina. Para lograr esto, se utilizó una estrategia en la que a partir de pnr-IL18sec se extrajo el fragmento deseado por PCR con cebadores diseñados para este fin (IL18mad F e IL18 R, Tabla 5.2) y luego este fragmento se digirió con Sall y Xbal y se insertó en el backbone de pnr-IL18sec. Esta nueva construcción se denominó pnr-IL18mad (Figura 5.3).

Para mejorar la producción y secreción de IL18, adicionalmente se generó un plásmido híbrido entre los dos anteriores conteniendo la secuencia codificante para IL18 activa y además la secuencia de secreción anteriormente descrita, y se lo designó pnir-IL18madsec (Figura 5.3). Finalmente se ensayó otra secuencia de secreción más relacionada con la bacteria destino, ya que consiste de una secuencia de exportación flagelar de *Salmonella* [101] (Tabla 5.3). Para insertarla se utilizó la misma estrategia descrita anteriormente, utilizando los cebadores IL18madflag F y R (Tabla 5.2). A este nuevo plásmido se lo llamó pnir-IL18madflag (Figura 5.3). Cabe destacar que también se cuenta con un constructo plasmídico denominado pnir-rel que consiste en el esqueleto religado sin gen de IL18.

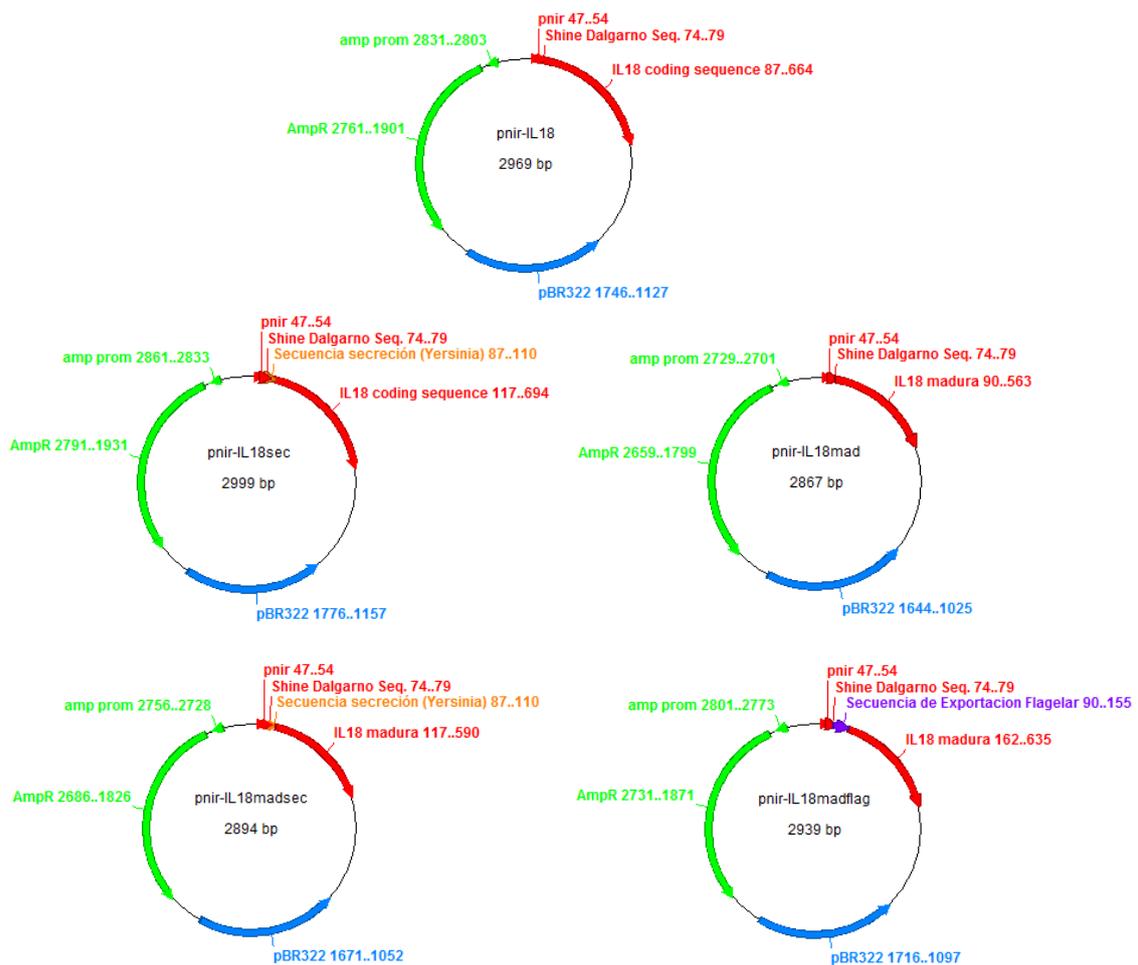


Figura 5.3. Constructos plasmídicos. Se esquematizan los plásmidos diseñados y utilizados en el contexto de este trabajo.

Tabla 5.3. Secuencias de secreción. Descripción a nivel aminoacídico (aa) y nucleotídico (nt) de las secuencias de secreción diseñadas y utilizadas en el contexto de este trabajo.

Secuencia		Referencia
1	Aa MISSSSIS	Lloyd <i>et al</i> 2002 [100, 102]
	Nt ATGATCAGCAGCAGCAGCATCAGC	Sharp <i>et al</i> 1988 [99]
2	Aa GTAIERLSSGLRINSAKDDAAG	Vondervistz <i>et al</i> 2012 [101]
	Nt GGCACCGCGATTGAACGCCTGAGCAGCGGCCTG CGCATTAACAGCGCGAAAGATGATGCGGCGGGC	Codon Usage Database, GenBank

Todos estos plásmidos fueron transformados a la cepa de *E. coli* Dh5 α (bacterias calciocompetentes) con un protocolo estandarizado de shock térmico, luego transferidos a una cepa de *S. Typhimurium* SL5338 (HsdR-/HsdM+) y finalmente a la cepa destino LVR01, siendo estos dos últimos pasos por electroporación estándar. El pasaje por la cepa intermedia SL5338 es necesario ya que el contexto genético la misma la instalación de plásmidos recombinantes con las modificaciones necesarias para funcionar y no ser eliminado en la cepa destino.

3. Curvas de crecimiento

Para estudiar la relación entre la expresión de IL18 y la cinética de crecimiento de LVR01 fue necesario realizar curvas de crecimiento en anaerobiosis, ya que en ésta condición se observa la mayor inducción de producción de IL18. Para ello se realizaron diluciones 1/50 en LB-ampicilina de cultivos O/N tanto de LVR01 sola como de la misma portando p_{nir}-IL18, que fueron divididas en tantos tubos eppendorf a su capacidad máxima como medidas se planificaba hacer y se pusieron a crecer en estufa a 37°C. Se midió la absorbancia a 600nm de un tubo de cada cepa a distintos tiempos durante un período de 7 horas aproximadamente y se graficó la densidad óptica en función del tiempo. Cabe destacar que para la cepa LVR01_{flag}- estos estudios ya fueron realizados previamente [86].

4. Ensayo de estabilidad segregacional plasmídica

Con la intención de evaluar la estabilidad de p_{nir}-IL18 en LVR01 se realizó el siguiente diseño experimental: Se crecieron cultivos O/N de 5ml con LB-ampicilina para al día siguiente realizar una dilución 1/40 en LB-ampicilina precalentado (volumen final de 2ml en tubo eppendorf de 2ml para crecer en anaerobiosis) y crecer hasta OD_{600nm}=0,5. En ese punto se congeló una alícuota para uso al día siguiente y otra para stock a -80°C (50 μ l cultivo fresco+100 μ l glicerol 50%→glicerolado 17%), correspondiendo a la generación 0. Asimismo, se plaquearon distintas diluciones de estos cultivos en placas de LBA y LBA-ampicilina, de manera de luego determinar

el porcentaje de bacterias que retuvieron el plásmido (comparando el recuento bacteriano en presencia y ausencia de ampicilina). Al día siguiente se descongeló en hielo la alícuota para uso, y luego de vortexear bien se hizo una dilución 1/32 (volumen final de 2ml LB sin ampicilina en tubo eppendorf de 2ml). Se dejó crecer nuevamente hasta OD_{600nm}=0,5 y se congeló y plaquéó tal como en el día anterior, siendo ésta la generación 4. Se repitió este procedimiento cuantas veces fue necesario hasta establecer una tendencia, en nuestro caso hasta la generación 24.

5. Determinación del número de copias

Para determinar el número de copias del plásmido de interés se extrajo mediante el kit QIAPREP Spin Miniprep (Qiagen, Limburg, Netherlands), se cuantificó utilizando NanoDrop1000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) y a su vez se determinó el número de bacterias de partida mediante plaqueo de diluciones seriadas. Con estos datos se calculó el número de copias de plásmido por bacteria con la fórmula que se indica a continuación, siendo el volumen de partida el volumen de cultivo empleado para la extracción del plásmido y volumen de elución el utilizado para su elución de la columna.

$$\text{Nº de copias de plásmido/bacteria} = \frac{\left(\frac{\text{Concentración de plásmido (ng/}\mu\text{l)} * \text{Volumen de elución (}\mu\text{l)} * 10^{-9} \text{ gr/ng}}{\text{Nº de pb del plásmido} * 660 \text{ (gr/mol de pb)}} \right) * \text{Nº de Avogadro}}{\text{UFC/ml} * \text{Volumen de partida(ml)}}$$

6. Western Blotting para detección de IL18

Con el objetivo de determinar cualitativamente la producción de IL18 por parte de las distintas cepas de *Salmonella* en distintas condiciones de oxigenación, se las creció de la siguiente manera: A partir del picado de colonias aisladas en placas de LBA-ampicilina se crecieron cultivos O/N con LB-ampicilina (de manera de mantener la presión por el plásmido). Posteriormente se realizaron diluciones 1/100 para la condición aeróbica con agitación en matraces de 100ml (para asegurar buena oxigenación) y 1/50 para la condición anaeróbica sin agitación, llegando a un volumen final de 50ml en tubos falcon de la misma capacidad (de esa manera se logra hipoxia). A continuación se dejó crecer todos los cultivos a 37°C hasta que llegaron a una OD_{600nm} aproximada de 0,7. Alternativamente se crecieron las mismas cepas a 26°C en medio BHI-EGTA, condiciones descritas anteriormente por Lloyd y colaboradores como inductoras de la secreción de IL18 [102] de manera de comparar ambas. Se realizó un control negativo sin EGTA ya que la presencia de calcio inhibe la secreción.

Una vez alcanzado ese punto de crecimiento (cabe destacar que es a diferentes tiempos ya que las bacterias crecen más lento en anaerobiosis) las muestras se centrifugaron a 5000rpm durante 15 minutos a 4°C, obteniéndose dos fracciones bien diferenciadas: por una parte el pellet y por otra parte el sobrenadante, que fue filtrado con filtro de 0,22 nm. Ambas fracciones se congelaron a -80°C hasta su procesamiento al día siguiente. El sobrenadante se concentró por precipitación clásica con ácido tricloroacético mientras que el pellet fue lavado con PBS con inhibidores de proteasa (DMSF 0,15mM y EDTA 0,5mM) para luego sonicar de la siguiente manera: 6 pulsos de 5 segundos con 1 minuto de separación entre cada uno. Ese producto de sonicado fue centrifugado a 13000rpm durante 15 minutos a 4°C y luego se cuantificó las proteínas totales de ambas fracciones procesadas por método de Bradford. Luego de esta determinación se cargó un gel de 10% de acrilamida con 50µg de proteínas totales por pocillo y se corrió a 25mA hasta entrar en el gel separador, en ese punto se aumentó el amperaje a 45mA. Las bandas resultantes se transfirieron O/N a 80mA a 4°C, con agitación y hielo (para disipar el calor) a una membrana de PVDF prehidratada con metanol. Se chequeó la transferencia con Rojo Ponceau y luego se destiñó la membrana con H₂O destilada para comenzar con el Western Blot propiamente dicho. Primeramente se bloqueó la membrana con PBS - 1% Tween/5% Leche Descremada (buffer de bloqueo) durante 1 h a temperatura ambiente (TA), con balanceo. Posteriormente se incubó durante 1 h, TA, con balanceo en una dilución 1/500 de anticuerpo α-IL18 (sc-6179, Santa Cruz Biotech, Dallas, Texas, USA) en PBS - 0,05% Tween (PBST)/ 5% Leche Descremada. Como control de extracción proteica del sobrenadante se reveló una fracción de la membrana sembrada para este propósito en una dilución 1/1000 de anticuerpo α-fliC (Salmonella H Antiserum i, Difco, New Jersey, USA) en PBST/ 5% LD. Luego de lavar con PBST 3 veces se incubó con un conjugado a peroxidasa en una dilución 1/1000 en PBST/ 5% LD durante 1h, TA, con balanceo. Nuevamente se lavó con PBST durante 15 min con agitación 4 veces para finalmente revelar con Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom) siguiendo el protocolo del fabricante.

Por su parte, también se utilizó esta misma técnica para examinar el estado de maduración de IL18 en lisados de tumores de ratones tratados con diferentes *Salmonellas*, como se explicará más adelante.

7. Ensayos de invasión

Se incubaron 5×10^5 células B16F1 en presencia de *Salmonella* LVR01 o LVR01flag- en una relación bacteria:célula 100:1 durante 1 hora a 37° C en placas de 24 pocillos. Los ensayos fueron realizados con o sin centrifugar las células para evaluar el efecto del flagelo en la movilidad de la *Salmonella* y por ende en su 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 con PBS y se lisaron con Tritón-X100 0,1%. Finalmente se plaquearon diluciones adecuadas en medio LBA para recuento.

8. Evaluación de la citotoxicidad inducida por *Salmonella in vitro*

Para evaluar el efecto de la invasión de las distintas cepas de *Salmonella* sobre la línea B16F1 las células fueron infectadas en una MOI de 100:1 tal como se describe en el ítem anterior hasta la incorporación de gentamicina. Luego de 24 horas de acción de la misma se lavaron, se marcaron con 5 µl de FITC-Annexin V (Becton Dickinson) y 5 µl de yoduro de propidio (300ng/ml) (Sigma-Aldrich) y se resuspendieron en Binding Buffer 1X (Becton Dickinson) a una concentración final de 1×10^6 células/ml. Las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad e inmediatamente fueron analizadas mediante citometría de flujo (FACS Canto II, Becton Dickinson).

9. Determinación de activación del inflammasoma mediada por *Salmonella in vitro*

Para evaluar si las células de melanoma B16F1 expresan los distintos componentes del inflammasoma y más aún si la invasión de *Salmonella* induce la activación del mismo, se realizó el ensayo de invasión explicitado en ese punto de esta sección y luego de 1 o 17 hs (tiempos correspondientes al inflammasoma temprano y tardío, respectivamente) las células se resuspendieron en TRIzol y se congelaron a -80°C para preservar el ARN hasta su extracción. Luego de la misma, su cantidad y calidad se evaluó usando medidas espectrofotométricas a 260nm/280nm mediante NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Previo a la síntesis de ADN copia se trató 1 µg de ARN total con DNAsa-I (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) según instrucciones del fabricante y luego se llevó a cabo la retrotranscripción en un volumen final de 20 µl en presencia de Random primers (200 ng), dNTPs (0,5 mM), DTT (0,01 M), RNaseOUT (40 U) y enzima retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen). Finalmente se realizó PCR cuantitativa (qPCR) para evaluar el nivel de expresión de los genes *Il1b*, *Il18*, *asc*, *procaspasa-1*, *nlrp3* y

nIrc4 utilizando el kit QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) en un termociclador Rotor-Gene 6000 (Corbett, Limburg, Netherlands). El gen *Actb* (codificante para beta-actina) fue elegido como gen house-keeping y los niveles relativos de ARNm en cada muestra fueron calculados usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ tal como se describió previamente [103] donde $\Delta Ct = Ct_{gen\ de\ interés} - Ct_{Actb}$. A su vez estos niveles fueron relativizados respecto al grupo control (células sin infectar). Se utilizó la línea de macrófagos murinos J774 como control positivo de presencia y activación del inflammasoma.

10. Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6 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).

11. Inducción de tumores y evaluación del efecto tumoricida de las distintas cepas de *Salmonella*

Para estudiar el efecto generado tanto por *Salmonella* portadora de los distintos constructos concebidos en este trabajo como *Salmonella* aflagelada en el crecimiento tumoral y la sobrevida de ratones se desarrollaron tres modelos diferentes de enfermedad.

El primero es un modelo clásico de melanoma subcutáneo, en el que se inocularon ratones a nivel del flanco derecho por punción subcutánea (s.c.) con una suspensión de $2,5 \times 10^5$ células B16F1. Luego de que los tumores se hicieron palpables (aproximadamente al décimo día) los ratones se dividieron en tres grupos cuyo volumen tumoral medio fuera lo más similar posible y se les inyectó intratumoralmente (i.t.) una dosis de suero fisiológico, LVR01 o la cepa en cuestión (a una concentración final de 1×10^6 ufc en 100µl de suero fisiológico estéril). Se monitoreó periódicamente el tamaño tumoral y la sobrevida de los ratones y se practicó eutanasia humanitaria en aquellos que alcanzaron volúmenes tumorales de 4000mm^3 . Por otra parte, se desarrollaron un modelo de enfermedad metastásica y otro más novedoso de enfermedad mínima residual (MRD). En ambos se inocularon ratones a nivel del flanco derecho por punción intradérmica (i.d.) con una suspensión de 1×10^5 células B16F10 y cuando los tumores se hicieron palpables se administraron i.t. los distintos tratamientos descritos previamente. En el modelo de enfermedad metastásica simplemente se monitoreó crecimiento tumoral y sobrevida como en el modelo clásico de melanoma subcutáneo, así como la aparición de metástasis lejanas, mientras que en el modelo MRD se practicó cirugía

para remover el tumor primario al día 18 (una semana luego del tratamiento con *Salmonella*) y se evaluó tanto la aparición de recidiva (debida al alto poder metastásico de la línea celular utilizada y al propio acto quirúrgico) y metástasis lejanas como la supervivencia. Durante las 24 horas siguientes a la cirugía se administró paracetamol a los ratones mediante agregado del mismo al agua de los bebederos como método de analgesia, de acuerdo con los procedimientos indicados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal.

Asimismo en este último modelo de MRD se realizaron ensayos de desafío con segundo tumor, en los cuales aproximadamente dos meses luego de la remoción del tumor primario, los animales fueron desafiados en el flanco opuesto con 1×10^5 células B16F10 i.d.. Se monitoreó la aparición de tumor secundario, tamaño del mismo y coloración del pelaje en busca de secciones vitiligoides.

12. Cuantificación de IL18 mediante ELISA

Para cuantificar la producción de IL18 por parte de las bacterias portadoras de plásmidos codificantes para esta citoquina, se realizó ELISA con las distintas fracciones bacterianas luego de cultivarlas como se explicitó anteriormente. Por otra parte, de manera de determinar la cinética de producción de IL18 luego de la administración i.t. de las diferentes cepas de *Salmonella* en los distintos modelos de enfermedad, se extrajeron muestras de sangre a distintos tiempos (pre y post tratamiento). Inmediatamente luego de cada toma se centrifugaron las muestras durante 2 minutos a 4°C y 12000 rpm de manera de extraer el sobrenadante (suero) y reservarlo a -80°C hasta su posterior uso. Asimismo, se conservaron tumores en PBS (manteniendo la relación $\text{masa}_{\text{tumor}}/\text{volumen}_{\text{PBS}}$) con este mismo fin, y antes de la determinación estos fueron procesados con TissueRuptor (Qiagen). Para la cuantificación de todas las muestras se utilizó el kit Platinum ELISA Mouse IL-18, Ready-To-Use Sandwich ELISA (eBioscience, San Diego, California, USA) según instrucciones del fabricante. Las placas fueron leídas con un lector de placas de ELISA (Dy nex Technologies, Chantilly, Virginia, USA) a 450nm.

13. Estudio de la expresión de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas en tumores tratados con *Salmonella*

Para establecer el perfil transcripcional en tumores tratados con *Salmonella*, se sacrificaron los ratones a los tres días del tratamiento y se extrajo material tumoral que se conservó en TRIzol previo a la extracción de ARN total. Las células se rompieron mediante el uso del TissueRuptor (Qiagen, Limburg, Netherlands) y luego se procedió tal como se explicitó más arriba hasta la obtención de ADNc (sección 5.9). En este caso se realizó qPCR para detectar niveles de expresión de *cxcl1*, *cxcl2*, *cxcl9*, *cxcl10*, *ccl2*, *ccl20*, *tnfa*, *ifng*, *il1b*, *il6*, *il12* e *il18*, los cebadores

utilizados se explicitan en la Tabla 5.4. Asimismo también se utilizaron estas muestras para buscar componentes del inflammasoma en el entorno tumoral, los genes de interés fueron *nlrp3*, *nlrp4*, *asc* y *procaspasa-1*.

Tabla 5.4. Secuencias de cebadores para qPCR. Descripción de las secuencias de los cebadores diseñados y utilizados para amplificar las citoquinas de interés.

<i>Actb</i>	F	5'-GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT-3'
	R	5'-CGTCATCCATGGCGAACTG-3'
<i>cxcl1</i>	F	5'-CTTGGTTTCAGAAAATTGTCCAAAA-3'
	R	5'-ACGGTGCCATCAGAGCAGTCT-3'
<i>cxcl2</i>	F	5'-CCCTCAACGGAAGAACCAAA-3'
	R	5'-CACATCAGGTACGATCCAGGC-3'
<i>cxcl9</i>	F	5'-TGGAGCAGTGTGGAGTTCGA -3'
	R	5'-CCTCGGCTGGTGCTGATG-3'
<i>cxcl10</i>	F	5'-GCCGTCATTTTCTGCCTCAT-3'
	R	5'-GCTTCCCTATGGCCCTCATT-3'
<i>ccl2</i>	F	5'-AGCTCTCTTCTCCACCAC-3'
	R	5'-CGTAACTGCATCTGGCTGA-3'
<i>ccl20</i>	F	5'-TTTTGGGATGGAATTGGACAC-3'
	R	5'-TGCAGGTGAAGCCTCAACC-3'
<i>Tnfa</i>	F	5'-CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA-3'
	R	5'-CCTCCAATTGGTGGTTTGCT-3'
<i>ifng</i>	F	5'-TCAGCAACAGCAAGGCGAAA-3'
	R	5'-CCGCTTCCTGAGGCTGGAT-3'
<i>il1b</i>	F	5'-CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG-3'
	R	5'-GATCCACACTCTCCAGCTGCA-3'
<i>il6</i>	F	5'-GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA-3'
	R	5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'
<i>il12</i>	F	5'-ATCACACGGGACCAAACCA-3'
	R	5'-CAGGCAACTCTCGTTCTTGTGTAGT-3'
<i>il18</i>	F	5'-CAGGCTGACATCTTCTGCAA-3'
	R	5'-TCTGACATGGCAGCCATTGT-3'
<i>nlrp3</i>	F	5'-TCCACAATTCTGACCCACAA-3'
	R	5'-ACCTCACAGAGGGTCACCAC-3'
<i>nlrp4</i>	F	5'-CTGGAAAAGGATGGGAATGA-3'
	R	5'-CCAAGGCAGCATCAATGTAG-3'
<i>Asc</i>	F	5'-CAGAGTACAGCCAGAACAGGACAC-3'
	R	5'-GTGGTCTCTGCACGAACTGCCTG-3'
<i>procaspasa-1</i>	F	5'-CGCCCTGTTGGAAAGGAACT-3'
	R	5'-CCCTCAGGATCTTGTCAGCC-3'

14. Análisis de células infiltrantes de tumor

Para estudiar el reclutamiento de células inmunes al sitio tumoral luego de la administración de *Salmonella*, tanto la cepa mutante en comparación con la cepa parental, se realizó citometría de flujo en material tumoral utilizando anticuerpos anti-Gr1 y anti-CD11b. Los tumores fueron homogeneizados en un buffer PBS+2%SFB+EDTA1mM mediante el uso de cell strainers de manera de obtener una suspensión de células separadas. Estas fueron marcadas durante 30 minutos en oscuridad a 4°C con el panel Gr1-FITC/CD11b-APC-Cy7 y posteriormente la información fue colectada con el citómetro FACS-Canto II y analizada mediante FACS Diva. Para ello se definieron dos subpoblaciones celulares, una con alta expresión de ambos marcadores (correspondientes a los neutrófilos) y otra menor expresión. Estas últimas fueron posteriormente analizadas de forma más exhaustiva mediante el marcado con diferentes paneles de anticuerpos, a saber: Gr1-FITC/I-A^b-PE/NK1.1-PerCP-Cy5.5/CD11c-APC/CD11b-APC-Cy7 y por otra parte Gr1-FITC/B220-PerCP-Cy5.5/IFN γ -APC/CD11b-APC-Cy7. Para el caso del IFN γ se requirió un paso extra de permeabilización, para lo que utilizamos el kit Cytofix/Cytoperm (Becton Dickinson) según instrucciones del fabricante.

15. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los diferentes ensayos fueron analizados en Excel y GraphPad Prism 5. Para el estudio de sobrevivencia de los ratones se construyeron curvas de sobrevivencia para cada uno de los grupos de ratones según el método descrito por Kaplan y Meier y la comparación de las curvas se evaluó por el Test Log-rank (Mantel-Cox). Para determinar las diferencias estadísticas de los ensayos in vitro (qPCR o ELISA) se utilizó el test de Student.

16. Análisis de Correspondencias

La técnica de Análisis de Correspondencias (ACo) es un método estadístico que reduce la dimensionalidad de un conjunto de datos y permite hallar y ordenar por importancia las causas de la variabilidad del mismo. El ACo construye una transformación lineal que toma un nuevo sistema de coordenadas para el conjunto original de datos en el cual la varianza de mayor tamaño del conjunto de datos es capturada en el primer eje (llamado primer componente principal), la segunda varianza más grande es capturada en el segundo eje y así sucesivamente. Para aplicar dicha técnica combinamos la globalidad de los datos obtenidos en el contexto de este trabajo (tamaño tumoral, % diferentes células infiltrantes de tumor, nivel de distintas citoquinas) y aplicamos a los mismos este análisis utilizando el software PAST.

6. RESULTADOS

1. Puesta a punto de modelos experimentales

Contar con modelos *in vivo* confiables es parte esencial de cualquier investigación que involucre sistemas biológicos. De hecho, la capacidad de los mismos de representar al sistema destino asegura en parte la calidad de los resultados y su posterior utilidad.

Por esa razón nuestro primer objetivo fue establecer un modelo experimental en el cual evaluar la eficacia de las distintas inmunoterapias de este trabajo. Así, comparamos dos modelos murinos de enfermedad mínima residual (MRD) en melanoma descritos anteriormente. El primero, descrito por Gabri y colaboradores en 2006 [104], se basa en la inoculación subcutánea de 5×10^4 células B16F10 seguida de la remoción quirúrgica del tumor cuando presenta un volumen de 250 mm^3 (entre los días 25 y 31). Para la puesta a punto de dicho modelo en nuestro laboratorio, se practicaron cirugías para la remoción del tumor primario a distintos tiempos post implantación de tumor (dpi), pero en todos los casos se observó un alto índice de recidivas con muy pocos eventos de metástasis en nódulos o pulmones, por lo que decidimos descartarlo. Por su parte, el segundo modelo descrito por Grinshtein y colaboradores en 2009 [105], se basa en la inoculación intradérmica de 1×10^5 células B16F10 seguida de la remoción quirúrgica del tumor al día 14. En este modelo encontramos que a los 28 dpi se obtiene un 100% de metástasis a nivel de nódulos, mientras que la remoción de los tumores a los 15 dpi (volumen tumoral $815 \pm 430 \text{ mm}^3$) resultó en 44% de metástasis a nivel de ganglios drenantes del tumor (entre los 46-56 dpi) y sólo un 11% de recidiva. Este modelo resultó ser viable ya que el tumor inoculado intradérmicamente queda encapsulado, facilitando su remoción mediante cirugía. Ensayos posteriores nos permitieron establecer el día 18 como recomendable para escindir el tumor primario, ya que representa el compromiso adecuado entre la posibilidad de adquirir metástasis (80% de metástasis a nivel de ganglios drenantes), y no comprometer demasiado el resultado de la cirugía debido al gran volumen tumoral que presentan los animales en ese momento ($1575 \pm 853 \text{ mm}^3$).

Cabe destacar que previo a los ensayos que involucraban cirugía, comprobamos que ambos modelos fueran comparables tanto en velocidad de crecimiento tumoral como en supervivencia de los animales (Figura 6.1.1).

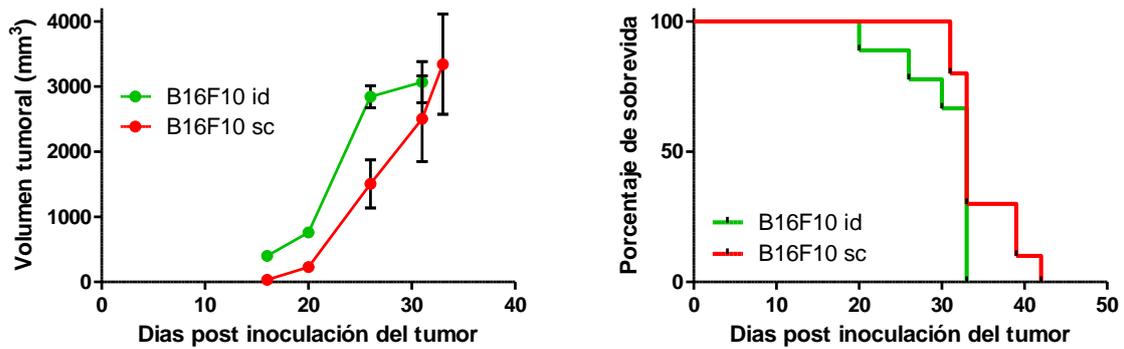


Figura 6.1.1. Comparación de la cinética de crecimiento y supervivencia de las formas de inoculación evaluadas para la puesta a punto del modelo de enfermedad mínima residual de melanoma usando la línea B16F10. Modelo B16F10 id: inoculación intradérmica de 1×10^5 células B16F10. Modelo B16F10 sc: inoculación subcutánea de 5×10^4 células B16F10.

Teniendo a punto el modelo de MRD buscado, nos propusimos evaluar el efecto antitumoral de *Salmonella* en este sistema. En ese sentido, inoculamos i.d. ratones C57BL6 con 1×10^5 células B16F10 en el flanco derecho, cuando el tumor se hizo palpable (día 11) inoculamos i.t. *Salmonella* LVR01 y finalmente practicamos cirugía para la remoción del tumor primario al día 18. Como se observa en la Figura 6.1.2, una única dosis de LVR01 en la semana previa a la exéresis quirúrgica reduce significativamente el tamaño tumoral promedio al día de la cirugía ($p=0,0037$) y esto repercute en una prolongación de la supervivencia global así como en un aumento del porcentaje de los ratones libres de enfermedad. Nos planteamos dos hipótesis que pueden explicar esto: por un lado, que *Salmonella* induce directamente una respuesta antitumoral que elimina las células metastásicas, o por otra parte, que como *Salmonella* retarda el crecimiento tumoral, evita la ocurrencia de metástasis.

Adicionalmente, cabe destacar que nuestros resultados de “libre de enfermedad” corresponden a hallazgos macroscópicos, ya sea cuando el animal presenta ganglios visiblemente agrandados o tiene los pulmones comprometidos y por lo tanto exhibe dificultad para respirar. Para minimizar la diferencia entre el tiempo en que aparece la enfermedad y cuando empezamos a sentir los síntomas asociados, en la puesta a punto del modelo sacrificamos animales a distintos tiempos para ser capaces de detectar lo más tempranamente posible lo que más tarde se evidencia externamente. De ahí la necesidad de buscar una herramienta que nos permita un mejor seguimiento del animal.

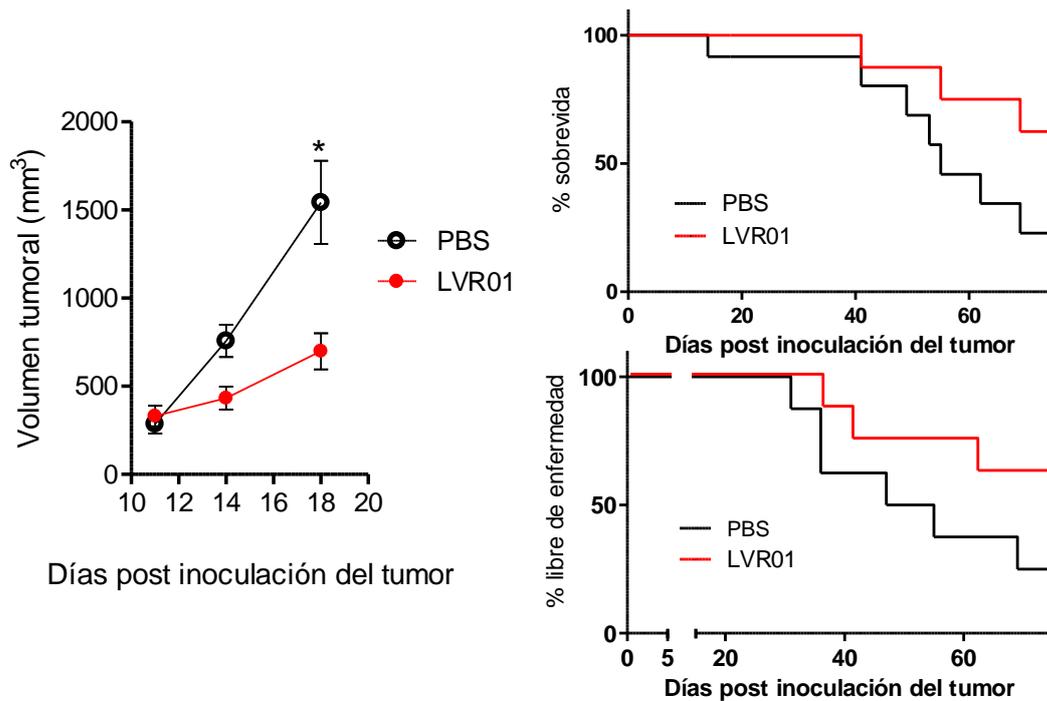


Figura 6.1.2. Efecto de una dosis de Salmonella LVR01 i.t. en el modelo de enfermedad mínima residual de melanoma usando la línea B16F10.

A su vez, con los ratones remanentes se practicó un pequeño ensayo de desafío en el que nuevamente se inoculó 1×10^5 células B16F10 (esta vez en el flanco izquierdo para asegurarnos que el tumor nuevo fuera primario y no recidiva del anterior) a los 51 días post remoción quirúrgica del tumor primario. Nuevamente logramos un retardo en la aparición de enfermedad (Figura 6.1.3), pero no su erradicación completa, y asimismo detectamos señales de respuesta inmune anti-melanocítica que se presentaron como sectores vitiligoides en el flanco derecho (pelaje blanco).

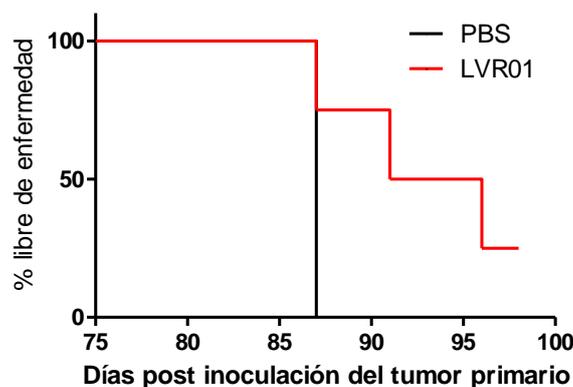


Figura 6.1.3. Curva libre de enfermedad en el ensayo de segundo desafío con B16F10 en el modelo MRD.

Para intentar mejorar el seguimiento de la evolución de la patología en los animales, nos planteamos la posibilidad de poner a punto una técnica imagenológica tanto para la detección temprana de tumores para su posterior tratamiento, como de metástasis regionales y a distancia para evitar el uso de necropsia, ya que no permite seguir en el tiempo el mismo animal.

Para ello utilizamos un plásmido pEGFP-N1 codificante para proteína verde fluorescente (GFP) y lo transfectamos a células B16F10, generando así una línea celular de melanoma que expresara GFP de forma estable. Luego de semanas en cultivo bajo presión de antibióticos de selección sorteamos mediante citometría de flujo el 0,1% más fluorescente (Figura 5.1) y posteriormente mediante Single Cell Deposition (SCD) obtuvimos 288 clonas en las cuales el vector se habría insertado en distintos sitios del genoma celular. Evaluamos la capacidad tumorigénica de 4 clonas seleccionadas en función a observación morfológica y de intensidad de fluorescencia en comparación con la línea sin transfectar, comprobando que la línea más adecuada es el clon 2 ya que no presenta diferencias en el establecimiento y tasa de crecimiento del tumor (Figura 6.1.4) así como la supervivencia global de los ratones portadores del mismo. Asimismo confirmamos que la capacidad de esta línea para establecer metástasis se mantuviera intacta, mediante necropsia y posterior inspección visual de pulmones de ratones portadores de estos tumores.

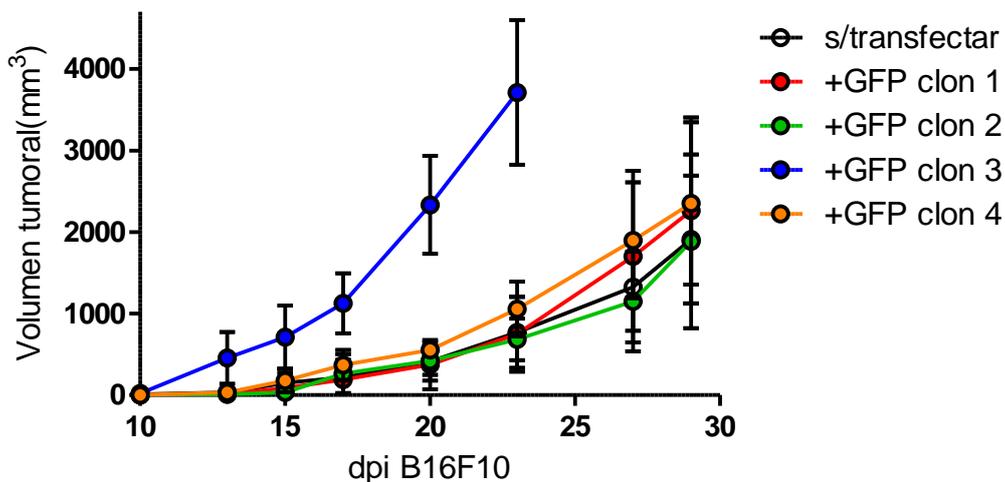


Figura 6.1.4. Tamaño tumoral y supervivencia de ratones portadores de tumores a células B16F10 transfectadas con 4 clonas que expresan GFP de manera estable (clon 1-4), en comparación con la línea celular sin transfectar. n=3

Sin embargo, hasta el momento no hemos podido avanzar en la observación de células tumorales fluorescentes en un contexto *in vivo* debido a dificultades con el equipo y la técnica en sí. La longitud de onda utilizada para detectar GFP presenta mucha interferencia con la piel y pelaje de los animales y, a pesar de haberlos depilado, no logramos la correcta visualización de órganos internos. Además el contenido de órganos como estómago e intestino genera "autofluorescencia" debido a presencia de clorofila como parte de una alimentación herbívora, hecho que no mejora con ayuno de los animales (Figura 6.1.5).

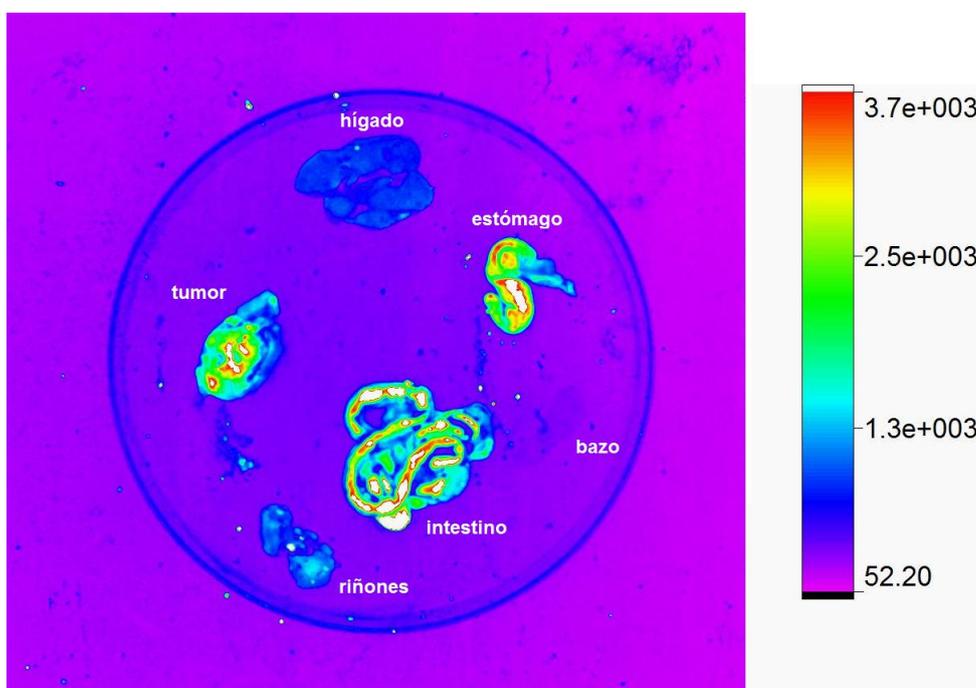


Figura 6.1.5. Autofluorescencia presentada por distintos órganos de ratón inoculado con línea tumoral expresando GFP. La escala de colores indica intensidad de fluorescencia de menor a mayor del violeta al rojo. Imagen gentilmente cedida por la MSc. Thais Bascuas.

Consideramos por todo lo anteriormente expuesto que la utilización de esta técnica para la detección de metástasis es impracticable en los tiempos de esta tesis por lo que no continuamos por esa vía.

Sumando el nuevo modelo de MRD que obtuvimos a los que ya tenemos puestos a punto previamente en nuestro laboratorio [42] nos encontramos en condiciones de proceder a los siguientes objetivos, cuyos resultados se describen en las siguientes secciones.

2. Evaluación del rol de la flagelina en el efecto antitumoral de *Salmonella*

Con el fin de optimizar las terapias basadas en *Salmonella* nos propusimos evaluar el rol de la flagelina en el efecto antitumoral exhibido por *Salmonella* en el modelo de melanoma subcutáneo a células B16F1.

Dado que está reportado que la flagelina es el PAMP con mayor capacidad proinflamatoria de *Salmonella* [85] y además activa al inflamasoma vía NLRC4 [75] generando en última instancia IL18 entre otras citoquinas proinflamatorias, utilizamos una cepa mutante carente de flagelina (LVR01flag-) construida previamente en nuestro laboratorio [86] de manera de valorar el papel de este determinante molecular en nuestro sistema de estudio.

1) Análisis de capacidad invasiva y citotóxica

Primeramente determinamos la capacidad de *Salmonella* para invadir células B16F1 en cultivo y evaluamos el rol de la flagelina en ese sentido. Los resultados obtenidos muestran que si bien la ausencia de flagelina disminuye la capacidad invasiva de la bacteria, en general la invasividad de *Salmonella* en esta línea celular es baja. Además, cuando la carencia de movilidad debida a la falta de flagelo se compensa mediante centrifugación, la invasividad solo se recupera parcialmente, siendo la invasividad de la cepa parental aproximadamente 50 veces mayor en ambos casos, ya sea sin o con centrifugación (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Porcentajes de invasión de *Salmonella* en B16F1 luego de 1 hora de co-cultivo, sin o con centrifugación previa a la incubación.

		LVR01	LVR01flag-	Relación LVR01/LVR01flag-
B16F1	Sin centrifugado	0.045%	0.00076%	60
	Con centrifugado	0.045%	0.0011%	40

Posteriormente determinamos si la baja invasividad de la bacteria repercutía en su capacidad citotóxica y qué papel cumplía la flagelina. En ese sentido observamos que *Salmonella* no induce muerte celular en la línea B16F1, independientemente de la presencia o no de flagelina (Figura 6.2.1). Cabe destacar que los niveles de muerte celular basal ya son relativamente altos, existiendo la posibilidad de que enmascaren pequeños niveles de muerte inducida por *Salmonella*. Sin embargo, a pesar de modificar la cantidad de células por pocillo y tiempos de incubación no fue posible disminuirla.

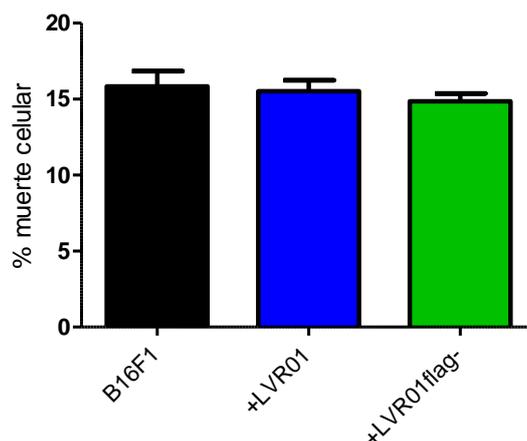


Figura 6.2.1. Porcentajes de muerte celular de B16F1 luego de 18 horas debido al tratamiento con *Salmonella* con o sin flagelina durante 1 hora.

Sorprendentemente, a pesar de que no se observó inducción de muerte celular *in vitro*, cuando evaluamos la capacidad citotóxica de *Salmonella* en un contexto tumoral observamos que una única dosis i.t. retarda significativamente el crecimiento tumoral y prolonga la supervivencia respecto al grupo sin tratar ($p=0,0298$ y $p=0,0121$ para LVR01 y LVR01flag-, respectivamente). Cabe notar que siempre se aprecia una tendencia a un mejor resultado con la cepa carente de flagelina (Figura 6.2.2).

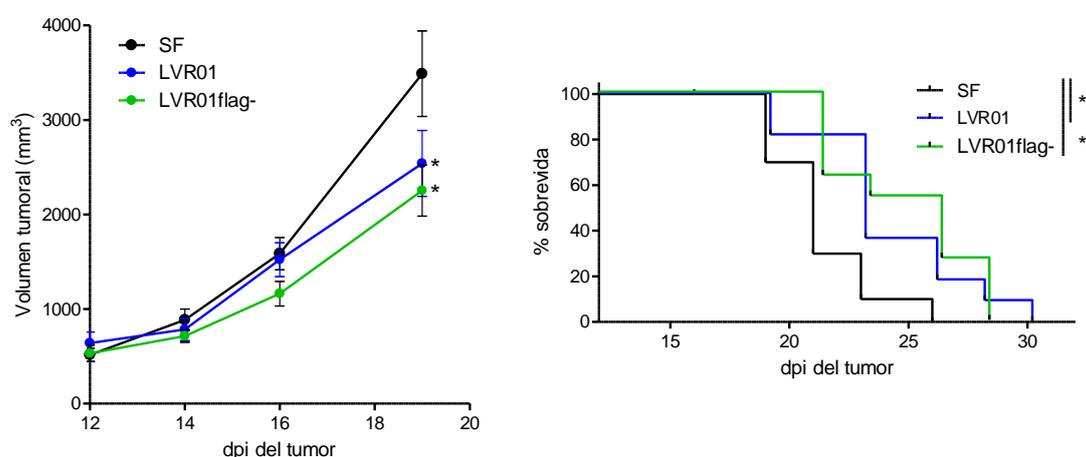


Figura 6.2.2. Efecto de una dosis intratumoral de *Salmonella* LVR01 y LVR01flag- en modelo de melanoma subcutáneo. a) Tamaño tumoral b) Supervivencia. * respecto al control sin *Salmonella*, $p<0,05$

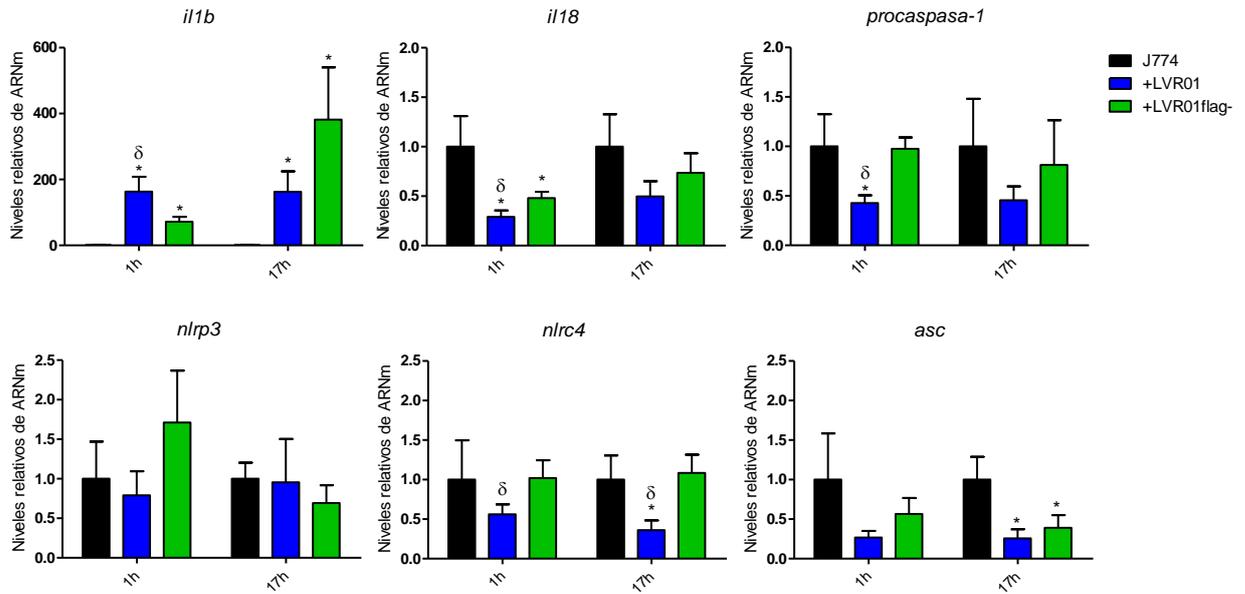
2) Evaluación de la participación de flagelina en la activación del inflamasoma

Con el fin de determinar si las células B16F1 tienen capacidad de formar inflamasoma y en caso positivo, estudiar cómo se activa luego de la invasión por *Salmonella*, se infectaron durante diferentes tiempos cultivos de estas células con una MOI 100:1 de *Salmonella* LVR01 o LVR01flag-. Luego se extrajo ARN total y se lo utilizó para detectar ARNm de distintos componentes del inflamasoma como *asc*, *procaspasa-1*, *nlrp3* y *nlr4* así como otras citoquinas involucradas como *il1b* e *il18* mediante PCR en tiempo real tomando un valor de 30 ciclos de amplificación (Ct) como *cut off*. Como control de presencia y activación del inflamasoma se utilizó la línea de macrófagos murinos J774.

En primer lugar, evaluamos los niveles basales de expresión de estos genes en ambas líneas celulares observando que si bien las células control J774 transcriben todos los genes de interés, en B16F1 solo se obtienen niveles confiables de ARNm para *procaspasa-1*, *asc* e *il18*. Es interesante que no fueron detectados niveles de ARN mensajero (nuevamente evidenciado como valores de Ct mayores a 30) de los receptores de iniciación del inflamasoma descritos para *Salmonella* (tanto *nlrp3* como *nlr4*) por lo que consideramos que no estarían expresándose en las muestras analizadas. Esto sugeriría que la producción de IL18 estaría promovida por otros mecanismos, como señalización a través de TLR4 inducida por LPS.

Por otra parte, y de forma inesperada, encontramos que el tratamiento con *Salmonella* reduce los niveles de transcritos en ambos tipos celulares en lugar de aumentarlos como es de esperar para bacterias que exhiben capacidad proinflamatoria a través de sus diferentes PAMPs (Figura 6.2.3). Sorprendentemente, los niveles de ARNm de *il18* no parecen disminuir cuando la bacteria infectante es LVR01flag- (Figura 6.2.3b), por lo que la flagelina parecería ser directamente responsable de la disminución de la expresión de ARNm.

a. Células J774



b. Células B16F1

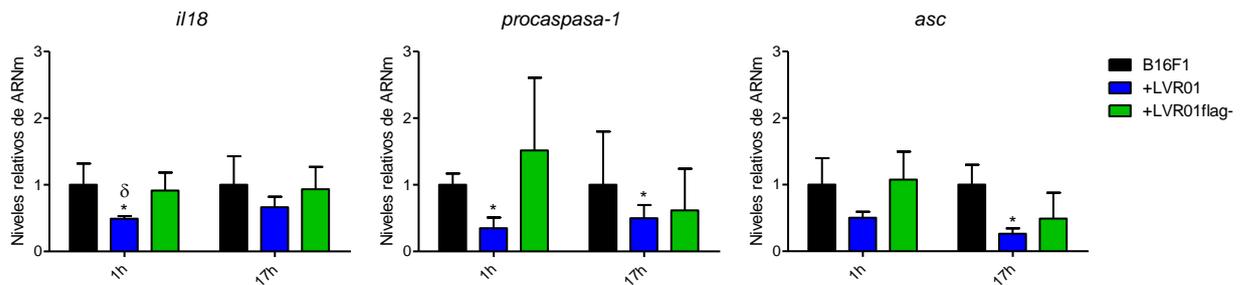


Figura 6.2.3. Aumento relativo de los niveles de ARNm de diferentes componentes del inflammasoma en cultivos celulares (a. J774, b. B16F1) infectados con *Salmonella* LVR01 o LVR01flag-. Cada condición se ensayó por triplicado. * contra el control sin infectar, δ entre *Salmonellas*. p < 0,05

Para conocer cuántas veces más ARNm expresan las células control (J774) en comparación con las células B16F1 calculamos la relación J774/B16F1 entre los niveles de ARNm de la condición sin infectar para cada gen, normalizados frente al housekeeping *Actb*. Así, elaboramos la siguiente tabla:

Tabla 6.2. Promedio de la relación $2^{-\Delta Ct_{J774}}/2^{-\Delta Ct_{B16F1}}$ para la condición sin infectar para cada gen. Cada condición se ensayó por triplicado.

$2^{-\Delta Ct_{J774}}/2^{-\Delta Ct_{B16F1}}$	1h	17hs
<i>il1b</i>	13	13
<i>il18</i>	0,4	0,7
<i>nlrp3</i>	2405	1718
<i>nlr4</i>	43	268
<i>Asc</i>	2,6	1,6
<i>procaspasa-1</i>	1,0	1,4

Cabe destacar que para todos los casos a excepción de *il18*, los valores son mayores o iguales a 1, indicando que en general las células control expresan niveles mayores de ARNm que las B16F1. En el caso particular de *il18* la relación se ve invertida, indicando que las células B16F1 expresan niveles de mensajero mayores que las J774. Esto sigue la línea de lo reportado por diferentes grupos de investigación que encontraron que una gran cantidad de líneas celulares tumorales (incluido el melanoma murino B16) producen IL18 funcional e incluso determinaron una correlación positiva entre la malignidad de la línea y su capacidad de producir y secretar IL18 [58, 106].

3) Flagelina en la respuesta inmune inducida por *Salmonella* en un contexto tumoral

Se comparó el perfil de citoquinas en el microambiente tumoral luego de tratar a los ratones portadores de melanoma subcutáneo con las diferentes cepas de *Salmonella*. Encontramos que *Salmonella* induce un aumento en los niveles de ARNm de quimioquinas ampliamente descritas como reclutadoras de neutrófilos como CXCL1 y CXCL2, y citoquinas proinflamatorias como IL6, IL12 e IL1 β (Figura 6.2.4). Sin embargo, en ningún caso la ausencia de flagelina determinó expresión diferencial de alguna citoquina respecto a la cepa flagelada.

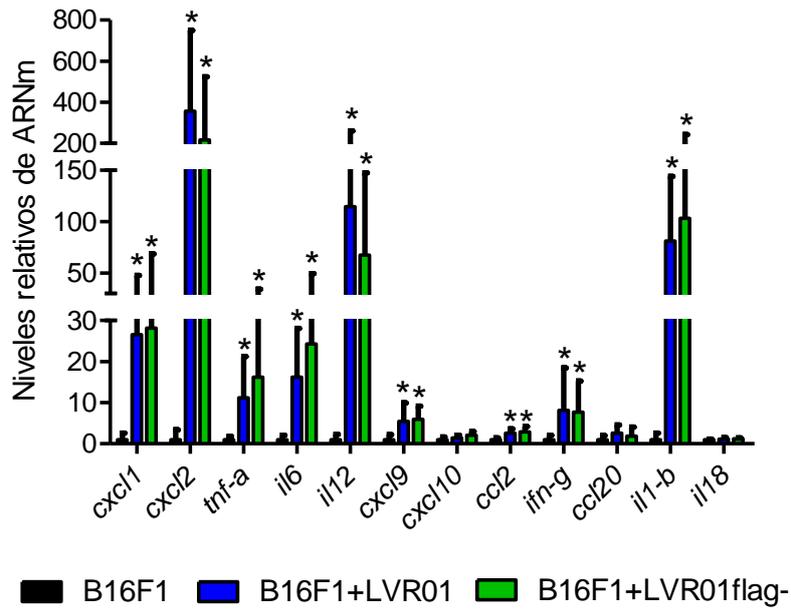


Figura 6.2.4. Aumento relativo de los niveles de ARNm de quimioquinas y citoquinas en muestras de tumor de ratones obtenidos 72 horas luego de tratados con *Salmonella* LVR01 o LVR01flag-. n=12 por grupo. * p<0,05

Asimismo analizamos los niveles de ARNm de distintos componentes del inflamasoma en estas muestras de tumor, determinando que tanto los niveles de *nlrp3* como *nlr4* se ven incrementados significativamente por el tratamiento con *Salmonella* (Figura 6.2.5).

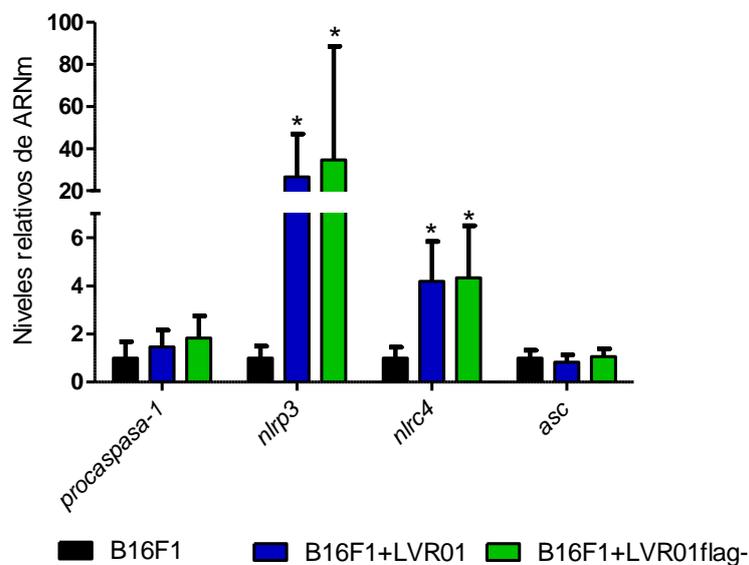


Figura 6.2.5. Aumento relativo de los niveles de ARNm de componentes del inflamasoma en muestras de tumor de ratones obtenidos 72 horas luego de tratados con *Salmonella* LVR01 o LVR01flag-. n=12 por grupo. * p<0,05

No obstante, dado que la acción de caspasa-1 clivando su propio precursor así como los zimógenos de IL1 β e IL18 ocurre a nivel proteico, evaluamos los niveles de esta última citoquina a mediante ELISA en homogenizados de tumor. Nuestros resultados indican que los tumores presentan una concentración promedio de IL18 de aproximadamente 8 ng/g (Figura 6.2.6) sin encontrar variaciones entre grupos tal como ocurrió con los niveles de ARNm (Figura 6.2.4).

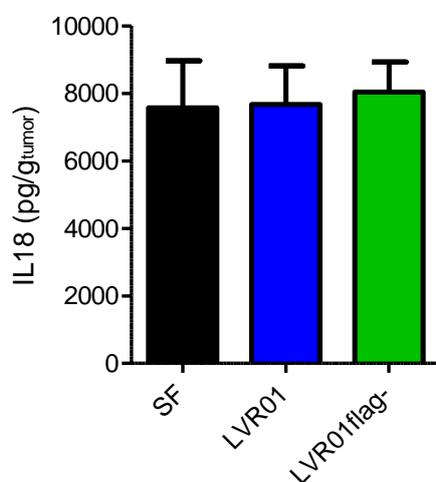


Figura 6.2.6. Niveles de IL18 en homogenizados de tumor de ratones tratados con *Salmonella* LVR01 o LVR01flag- luego de 72 hs. n=7 por grupo.

Sin embargo, existe la posibilidad de que el tratamiento con las diferentes cepas de *Salmonella* induzca diferencias en el grado de maduración de la citoquina en lugar de en su cantidad absoluta, hecho que no se reflejaría mediante nuestro ensayo de ELISA (que no diferencia entre ambos estados de la proteína). Por esta razón, evaluamos mediante Western Blot las cantidades de pro-IL18 (24KDa) e IL18 activa (18KDa) en los lisados de tumor. Lamentablemente, dada la naturaleza de las muestras de lisado tumoral no fuimos capaces de obtener resultados de WB que permitan definir diferencias entre las mismas.

4) Estudio de las poblaciones celulares infiltrantes de tumor

Como mencionáramos anteriormente, la flagelina aparece como un PAMP muy importante en la respuesta proinflamatoria generada por *Salmonella*, en particular induciendo el reclutamiento de neutrófilos. Por esa razón, decidimos estudiar las poblaciones infiltrantes del tumor utilizando anticuerpos anti-Gr1 y anti-CD11b con el fin de comparar el reclutamiento de neutrófilos al sitio del tumor causado por *Salmonella* con o sin flagelina. Al evaluar la población $Gr1^{high}/CD11b^{high}$ encontramos que, en coincidencia con resultados previamente descritos para otros modelos tumorales en nuestro laboratorio [107], *Salmonella* induce un claro reclutamiento de neutrófilos al tumor, y que no hay diferencias significativas en los porcentajes inducidos por *Salmonella* con o sin flagelina aunque sí respecto al control ($p=0,0139$ y $p=0,0010$ para LVR01 y LVR01flag-, respectivamente) (Figura 6.2.7a). Sin embargo, encontramos otra subpoblación $Gr1^{int}/CD11b^{int}$ con expresión significativamente aumentada frente al tratamiento con LVR01flag- en comparación con su cepa parental ($p=0,0006$) (Figura 6.2.7b) y que además representa un porcentaje mucho mayor de las células infiltrantes totales.

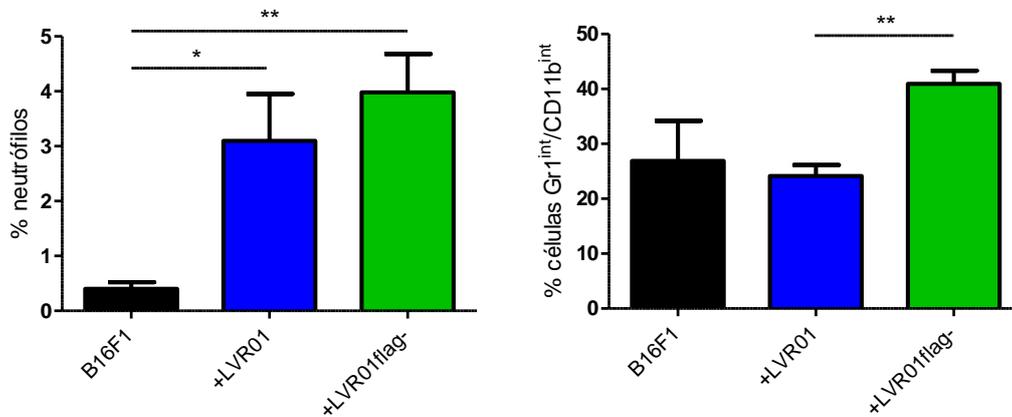


Figura 6.2.7. Porcentajes de (a) neutrófilos y (b) células $Gr1^{int}/CD11b^{int}$ infiltrantes del tumor. Los animales fueron sacrificados 72 horas luego del tratamiento y los tumores removidos y preparados para analizar mediante citometría de flujo. n=5 por grupo. * $p<0,05$ ** $p<0,01$

Luego de intensa búsqueda bibliográfica en conjunción con análisis multivariado de correspondencias (ver siguiente sección), todo indicaba que estas células podrían ser un subgrupo particular de células dendríticas citolíticas productoras de interferón inicialmente conocidas como IKDCs, actualmente redefinidas como pre-mNKs [108]. Estas células parecerían estar involucradas en inmunovigilancia tumoral [109] y presentan características de células dendríticas convencionales y plasmacitoides así como de células natural killer y linfocitos B plasmacitoides. Por esa razón utilizamos paneles de anticuerpos que detectaran estos tipos celulares, así como marcadores para otros posibles candidatos, como eosinófilos [110] y también marcamos interferón gama intracelular. La Figura 6.2.8 esquematiza cómo se definieron las diferentes poblaciones celulares P2 y P3, y los resultados obtenidos para cada una de ellas. Se observa que P3, la población a caracterizar, no expresa en su superficie Siglec-F (marcador de eosinófilos) pero en cambio sí expresa CD11c, B220 (ambos marcan células dendríticas, el segundo también células B plasmacitoides) y NK1.1 (marcador de células NK), y también produce IFN γ . Por esa razón, las definimos como pre-mNKs.

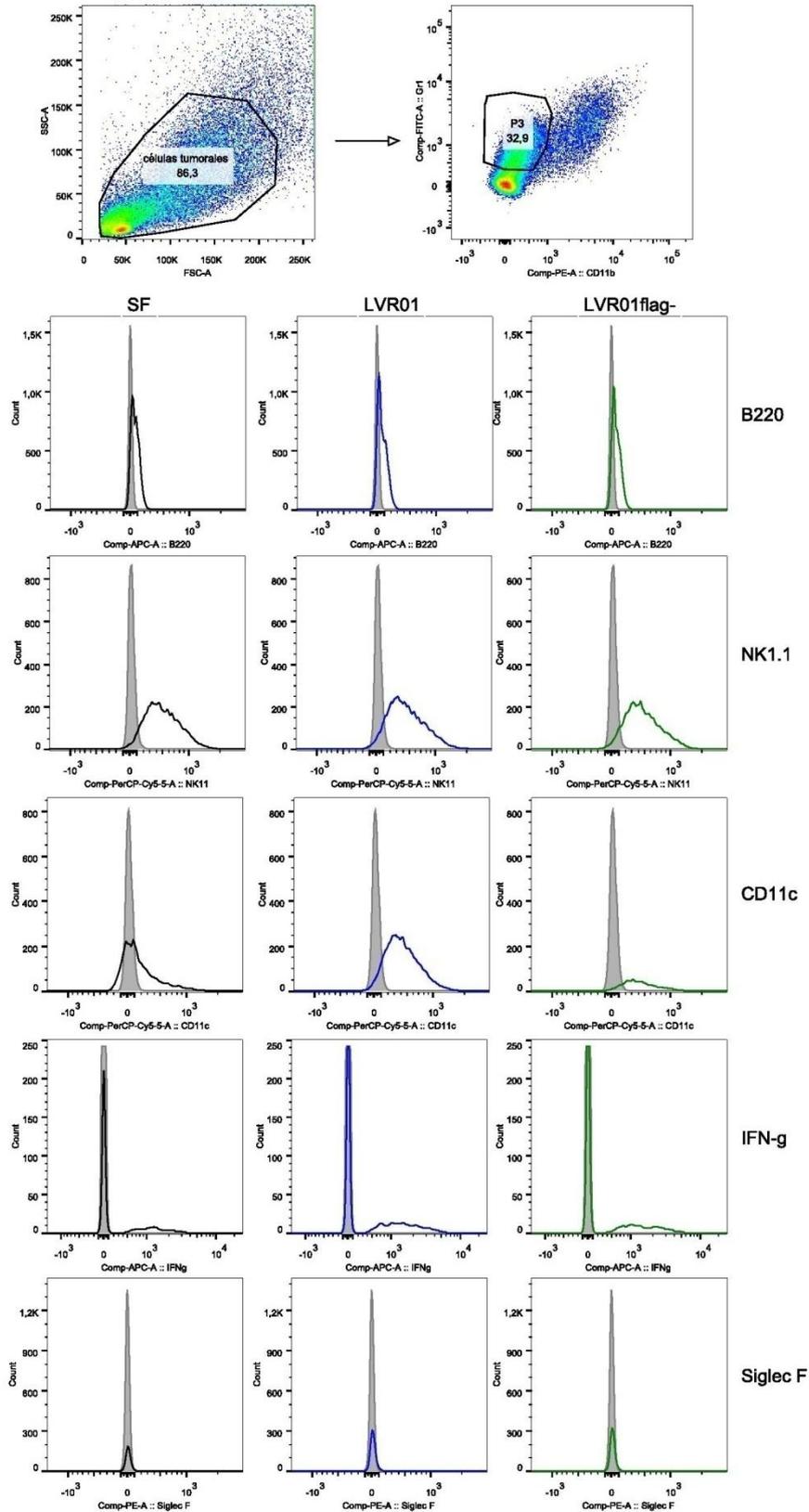


Figura 6.2.8. Dot plot que muestra como se definió la población Gr1^{int}/CD11b^{int} a analizar. En negro, azul y verde se muestran los histogramas para SF, LVR01 y LVR01flag-, respectivamente, correspondientes a los siguientes marcadores celulares: B220, NK1.1, CD11c, IFN-g y Siglec F.

5) Análisis de correspondencias

Dado el perfil multifactorial de la respuesta inmune inducida por *Salmonella* realizamos un análisis multivariado de correspondencias para intentar esclarecer cuáles de los factores celulares y moleculares inducidos por el tratamiento aportan más en la respuesta antitumoral efectiva (definida por el tamaño tumoral) contra melanoma. Resultados surgidos de dicho análisis demuestran que el volumen tumoral y la expresión de IFN γ a nivel tumoral (*ifng*) discriminan independientemente los ratones tratados con *Salmonella* de los ratones control (Figura 6.2.9). Dichos resultados validan nuestros experimentos, confirmando el efecto antitumoral de *Salmonella* y la relevancia ya conocida de IFN γ como factor antitumoral.

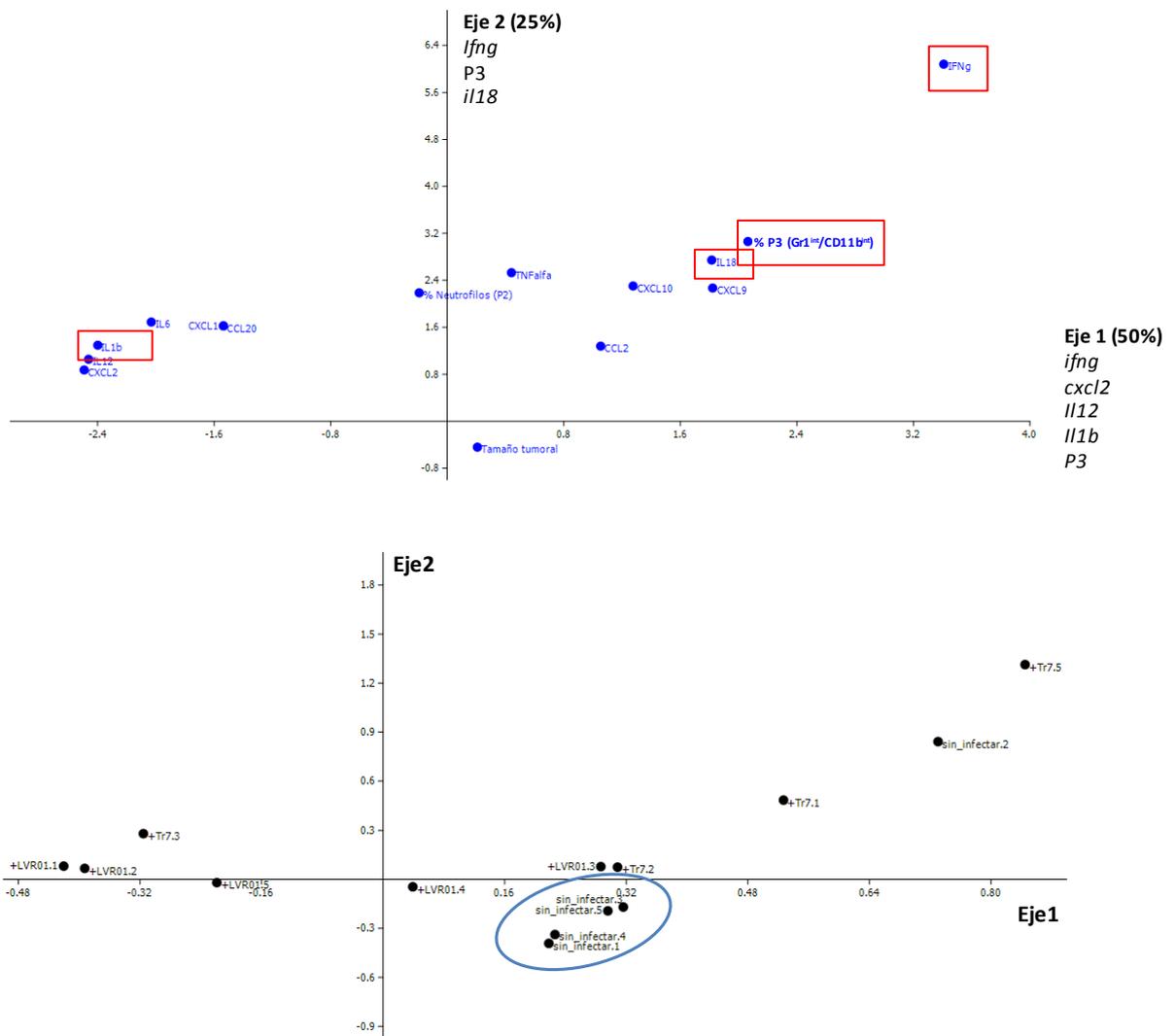


Figura 6.2.9. Estudio de correlaciones mediante análisis multivariado de correspondencia en modelo de melanoma B16F1 para ver la distribución de a) variables y b) muestras. En ambos casos el eje 1 es responsable del 50% de la variabilidad observada mientras que el eje 2 explica un 25% más de la misma.

Además, el análisis resalta a las células Gr1^{int}/CD11b^{int} infiltrantes de tumor como una de las principales variables responsables del agrupamiento debido al tratamiento, que como se observa claramente en la Figura 6.2.9b separa por un lado a los ratones control (que se agrupan de forma muy consistente) y por otro lado a los tratados con *Salmonella* (que están distribuidos de forma más heterogénea, sugiriendo que de alguna manera el tratamiento con *Salmonella* aumenta la variabilidad). Dichas células son reclutadas al melanoma en respuesta al tratamiento con *Salmonella* (Figura 6.2.7b), existiendo una correlación negativa entre el porcentaje de esta población y el tamaño tumoral (Figura 6.2.10). Como se mencionara anteriormente, las células Gr1^{int}/CD11b^{int} presentan características de células pre-mNK ya que también expresan CD11c, NK1.1 y B220, pero no Siglec F (Figura 6.2.8). Además, producen grandes cantidades de IFN- γ en respuesta a IL12 e IL18 (parámetros con gran aporte a los ejes principales). Por último, cabe destacar que IL18 e IL1 β también aparecieron como moléculas relevantes en la respuesta antitumoral inducida por *Salmonella*.

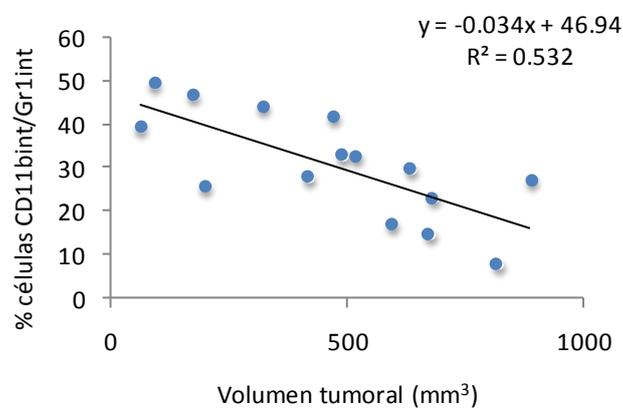


Figura 6.2.10. Correlación entre % de células Gr1^{int}/CD11b^{int} en tumor B16F1 y volumen tumoral.

3. Evaluación de constructos plasmídicos codificantes para IL18 en LVR01

Con la finalidad de inducir en *Salmonella* LVR01 la expresión de IL18 se diseñaron y generaron distintos plásmidos, tal como se describe en la sección *Materiales y Métodos*.

Primeramente se desarrolló pnir-IL18, un constructo que permite en *Salmonella* la expresión de IL18 inmadura (24kDa) bajo un promotor inducible por anaerobiosis. Se comprobó mediante la realización de curvas de crecimiento en paralelo que la introducción de este plásmido no impone una carga metabólica significativa sobre las bacterias (Figura 6.3.1) y también se confirmó que es estable durante las subsecuentes replicaciones bacterianas (Figura 6.3.2), tal como se observara anteriormente en plásmidos similares [111]. Asimismo se determinó que el número de copias del plásmido en LVR01 en fase estacionaria es intermedio (41 copias), asegurando así que cada célula hija adquirirá por segregación al azar varias copias del mismo luego de la división de la célula madre.

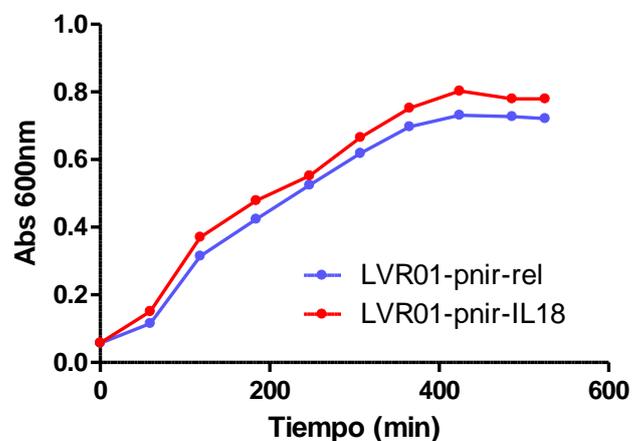


Figura 6.3.1. Curva de crecimiento de LVR01 portando el plásmido portador del gen de IL18 (pnir-IL18) en comparación con el plásmido vacío (pnir-rel). Las medidas se realizaron cada 60 minutos hasta que se alcanzó la fase estacionaria.

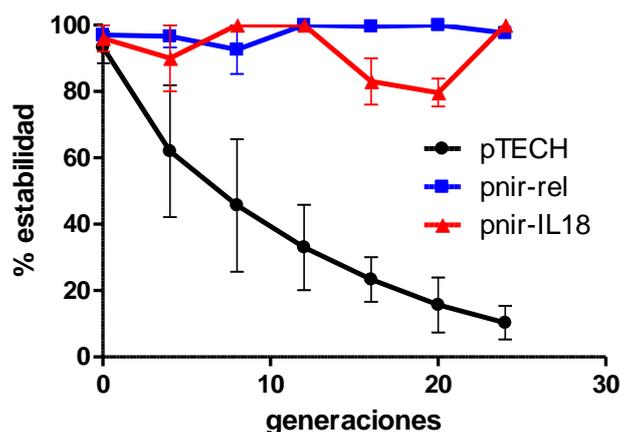


Figura 6.3.2. Estabilidad segregacional en LVR01 del plásmido pnir-IL18 en comparación con el plásmido vacío (pnir-rel) o el plásmido de partida (pTECH), durante 24 generaciones de crecimiento en condiciones de hipoxia.

Luego, para evaluar el nivel de producción de IL18 y el grado de inducción mediado por la hipoxia, se crecieron cultivos en distintas condiciones de oxigenación y se procesaron los extractos bacterianos (pellet y sobrenadante). Con los mismos se realizaron ensayos de Western Blot, comprobando así que la bacteria efectivamente produce IL18 inmadura y que la inducción del promotor pnir mediada por hipoxia aumenta significativamente esta producción. Posterior cuantificación de IL18 mediante ELISA revela que la síntesis de esta citoquina se ve incrementada 50 veces en condiciones de hipoxia, siendo las concentraciones 23 ng vs 1126 ng por cada 50µg de proteína total (previa cuantificación por método de Bradford) (Figura 6.3.3).

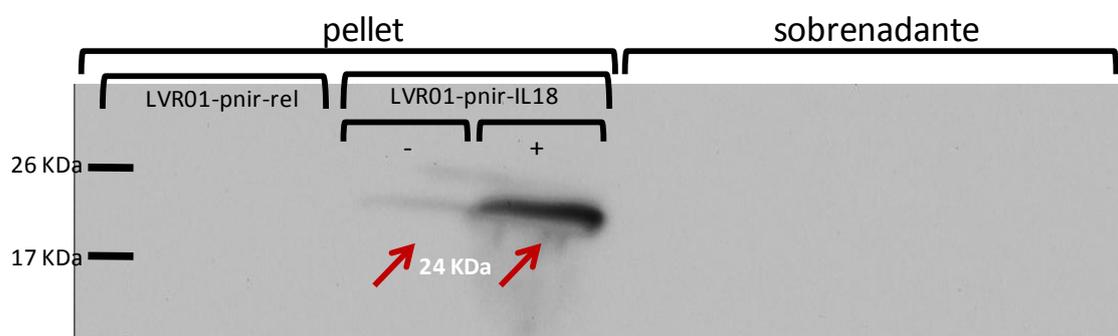


Figura 6.3.3. Gel de acrilamida 10%, 50µg de proteínas totales de diferentes extractos bacterianos/pocillo. Flechas rojas indican las bandas esperadas. -: condición sin inducción, +: condición de inducción.

Posteriormente evaluamos esta construcción *in vivo* en distintos modelos de enfermedad: melanoma subcutáneo a células B16F1, melanoma metastásico y MRD, ambos inducidos con células B16F10.

En el modelo subcutáneo clásico, luego de una dosis de *Salmonella* 13 dpi, observamos un retraso del crecimiento tumoral por acción de la bacteria sola (Figura 6.3.4a), situación que no se modifica por uso de la bacteria expresando IL18. De igual manera, la prolongación significativa de la supervivencia inducida por LVR01 no se modifica por uso de *Salmonella* expresando IL18, aumentando de 23 a 27 y 29 días ($p=0,0149$ y $0,0008$ para LVR01 y LVR01-pnir-IL18, respectivamente) (Figura 6.3.4b).

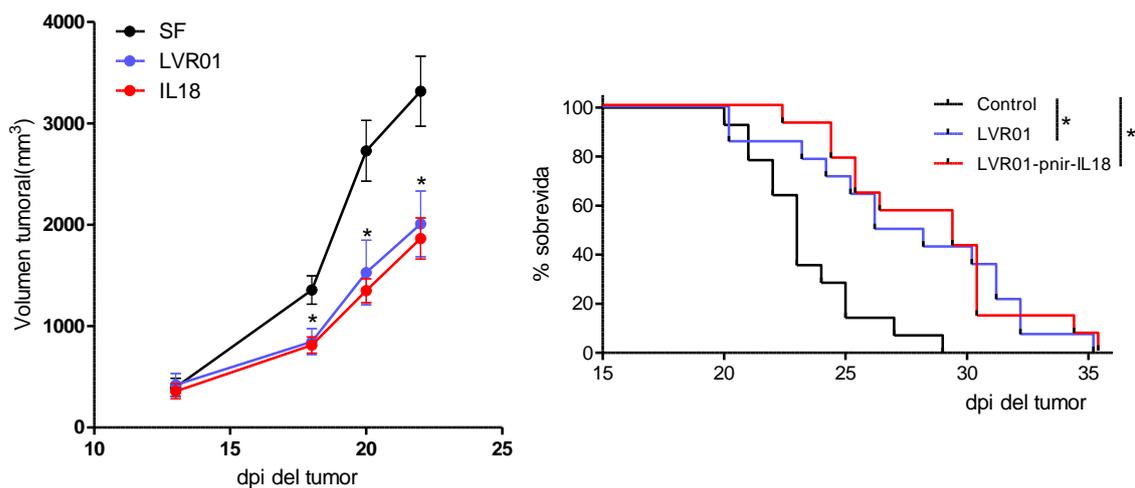


Figura 6.3.4. Efecto de una dosis intratumoral de *Salmonella* LVR01-pnir-rel y LVR01-pnir-IL18 en modelo de melanoma subcutáneo. a) Tamaño tumoral, b) Supervivencia * $p \leq 0,05$

En el caso de melanoma metastásico a células B16F10 también evaluamos la acción de una dosis intratumoral de *Salmonella*. No observamos retardo del crecimiento tumoral ni prolongación de la supervivencia significativos entre las distintas *Salmonellas* (sí en comparación con el grupo sin tratar), aunque las medias de supervivencia fueron 27 y 34 días para LVR01-pnir-rel y LVR01-pnir-IL18, respectivamente (Figura 6.3.5 a y b).

Cuando analizamos los niveles intratumorales de IL18 no encontramos grandes diferencias entre grupos (Figura 6.3.5c). Dado que está reportado que distintas líneas de melanoma, entre ellas B16F10, producen IL18 *per se*, la producción basal de la citoquina podría explicarse por ese lado y enmascarar los pequeños aumentos generados por la bacteria tratamiento. Además vale la pena resaltar que estos tumores fueron extraídos a tiempo final (cuando el animal ya tenía el tamaño tumoral que demanda eutanasia humanitaria) y quizá a esos tiempos ya no nos encontraríamos en el pico de IL18.

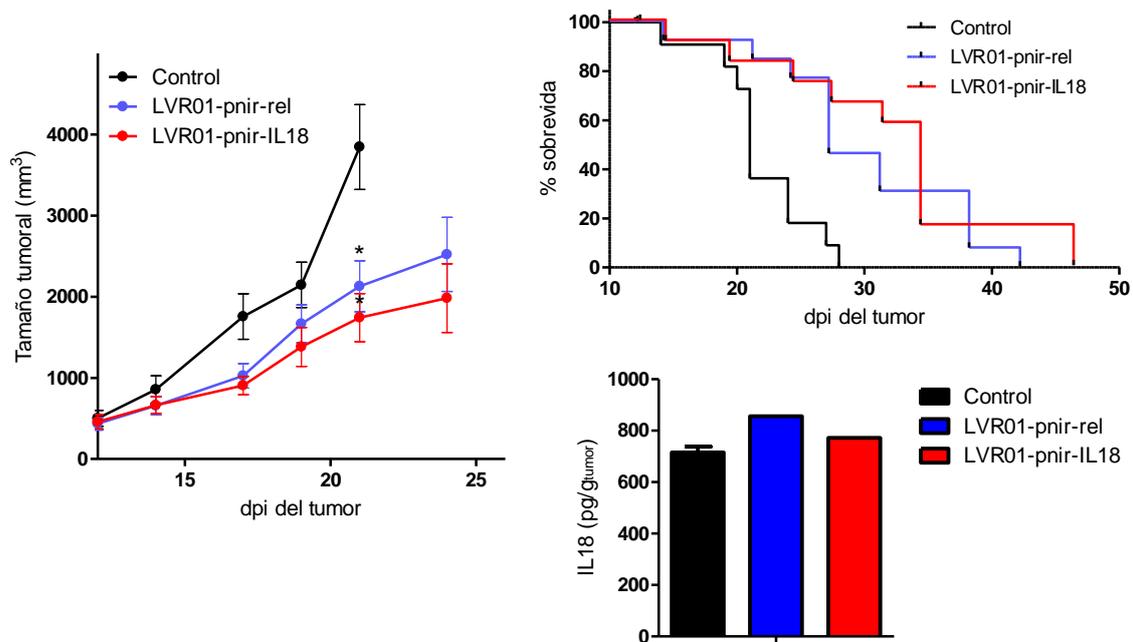


Figura 6.3.5. Efecto de una dosis intratumoral de *Salmonella* LVR01-pnir-rel y LVR01-pnir-IL18 en modelo de melanoma metastásico. a) Tamaño tumoral, b) Sobrevida, c) Niveles intratumorales de IL18.

Cabe destacar que en ambos modelos de enfermedad también se evaluaron niveles séricos de IL18 a distintos tiempos, siendo los mismos menores al límite de detección de la técnica.

Luego, evaluamos la efectividad del tratamiento en el modelo de enfermedad mínima residual puesto a punto en el contexto de este trabajo. Al día 12 dpi se administró una dosis de *Salmonella* y al día 18 dpi se llevó a cabo la escisión de los tumores primarios. Registramos la aparición de recidivas y metástasis a nivel de los nódulos, y además seguimos la sobrevida de los animales cada 2-3 días. Previo a la cirugía observamos que una única dosis intratumoral de *Salmonella*, ya sea LVR01-pnir-rel o LVR01-pnir-IL18, retarda significativamente el crecimiento tumoral ($p=0,0144$ y $0,0045$ con respecto al grupo control, respectivamente) (Figura 6.3.6a). A modo de ejemplo, los volúmenes tumorales observados al día de la cirugía fueron de $1575 \pm 853 \text{ mm}^3$, $689 \pm 645 \text{ mm}^3$ y $614 \pm 422 \text{ mm}^3$ para los grupos control, LVR01-pnir-rel y LVR01-pnir-IL18, respectivamente. El retardo en el crecimiento tumoral y, por ende, menor tamaño tumoral de los ratones tratados con *Salmonella* al momento de la cirugía se reflejó en una menor incidencia de metástasis y, por tanto, un mayor porcentaje de animales libres de enfermedad (Figura 6.3.6b). Es importante resaltar que en ningún momento se observaron diferencias entre los dos grupos que recibieron *Salmonella* por lo que podemos afirmar que el efecto antitumoral observado en este modelo estaría mediado exclusivamente por *Salmonella*, y no por la presencia de interleuquina 18.

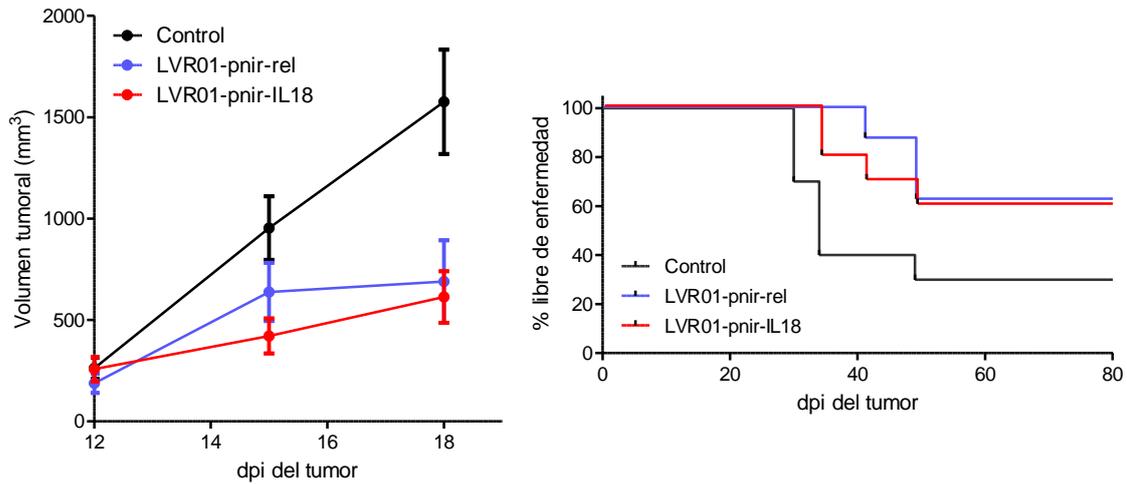


Figura 6.3.6. Efecto de una dosis intratumoral de *Salmonella* LVR01-pnir-rel y LVR01-pnir-IL18 en modelo de enfermedad mínima residual. a) Tamaño tumoral, b) Curva de libre de enfermedad.

1) Optimización de la expresión de IL18

Dada la ausencia de efecto antitumoral observada luego de la terapia con LVR01-pnir-IL18 nos propusimos optimizarla mediante la modificación del constructo inicial, de distintas maneras. Primeramente, favoreciendo la secreción de IL18 fuera de la bacteria y no solo la producción de la citoquina, mediante el agregado de una secuencia de secreción previamente utilizada por Loeffler y colaboradores [34, 112, 113]. En ese sentido, construimos el plásmido pnir-IL18sec y transformamos LVR01 para obtener la nueva cepa tratamiento. Para evaluar su capacidad de secretar IL18 crecimos cultivos bacterianos en condiciones estándar de nuestro laboratorio (medio LB, 37°C) y en condiciones que esta reportado favorecen la secreción (medio BHI, 26°, con o sin EGTA, siendo la condición sin EGTA un control negativo porque el calcio inhibe la secreción) [100]. Luego procesamos los distintos extractos bacterianos (pellet y sobrenadante) y los analizamos mediante Western Blot. Para nuestra sorpresa, la inserción de la secuencia de secreción no solo no induce la secreción esperada sino que disminuye la cantidad de proteína sintetizada (Figura 6.3.7).

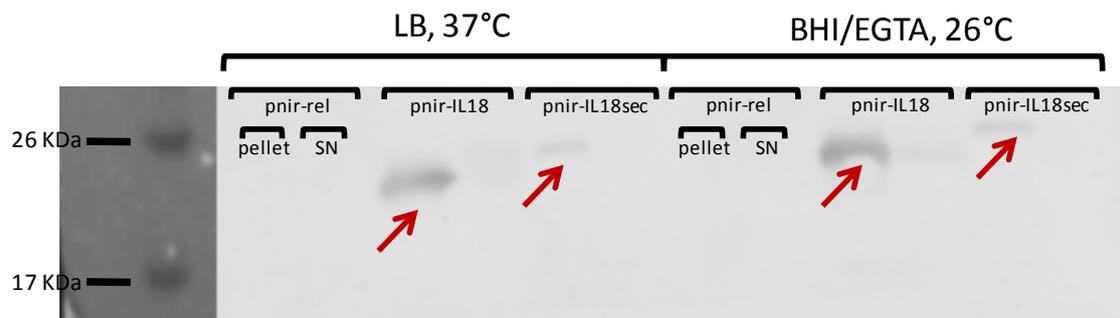


Figura 6.3.7. Gel de acrilamida 12%, 50µg de proteínas totales de diferentes extractos bacterianos en anaerobiosis/pocillo. SN: sobrenadante. Flechas rojas indican las bandas esperadas.

Por esa razón, nuestra siguiente estrategia de abordaje del problema fue facilitar el accionar de IL18 al usar la secuencia codificante para la proteína activa directamente en lugar de la secuencia completa, que genera un zimógeno que debe ser clivado por capasa-1 para ser activo. En ese sentido generamos varias cepas, todas con la secuencia codificante para la proteína madura y además con o sin el agregado de distintas secuencias de secreción. Estas nuevas construcciones fueron transformadas en LVR01 para ser evaluadas y las denominamos LVR01-pnr-IL18mad (sin secuencia de secreción), LVR01-pnr-IL18madsec (con la secuencia de secreción utilizada anteriormente) y LVR01-pnr-madflag (con secuencia de secreción más efectiva ya que provenía de la misma especie y serotipo bacterianos (*S. Typhimurium*) [101]). Nuevamente evaluamos la capacidad de síntesis y secreción proteica de estas cepas mediante Western Blot de los distintos extractos bacterianos. Lamentablemente, en ningún caso nos fue posible detectar IL18 en sobrenadantes, sin importar cuán concentrados estuviesen. Asimismo, observamos que la cepa más productora de IL18 es LVR01-pnr-IL18madsec, y detectamos la proteína principalmente en la fracción de proteínas insolubles del pellet (Figura 6.3.8), por lo que estaría en cuerpos de inclusión.

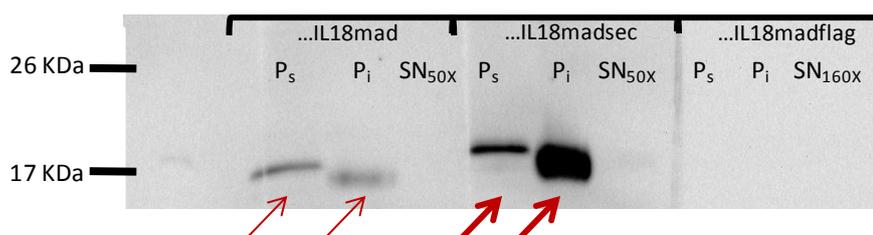


Figura 6.3.8. Gel de acrilamida 12%, diferentes extractos bacterianos en anaerobiosis. Flechas rojas indican las bandas esperadas. Ps: proteínas solubles del pellet, Pi: proteínas insolubles del pellet, SNnx: sobrenadante concentrado n veces.

Por lo anteriormente expuesto, decidimos evaluar *in vivo* sólo esta cepa, eligiendo un abordaje sencillo de una única dosis intratumoral 10 dpi de melanoma subcutáneo. Observamos que esta cepa no solo no fue capaz de mejorar el efecto antitumoral intrínseco de *Salmonella* sino que ni siquiera logró retardar significativamente el crecimiento tumoral (Figura 6.3.9a). De igual manera, no se observaron cambios a nivel de sobrevida media en el grupo tratado con *Salmonella* expresando IL18 con respecto al grupo control.

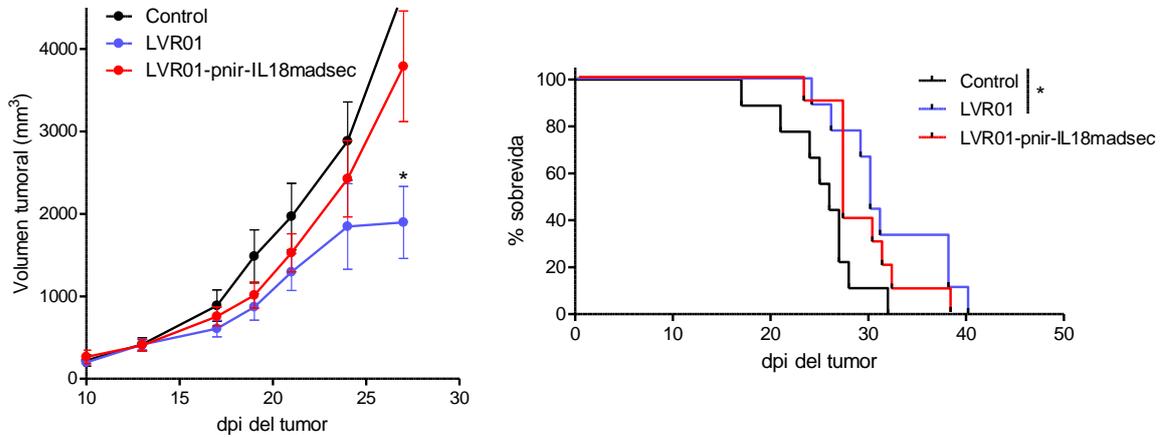


Figura 6.3.9. Efecto de una dosis intratumoral de *Salmonella* LVR01-pnir-IL18madsec en modelo de melanoma subcutáneo. a) Tamaño tumoral, b) Sobrevida. * $p < 0,05$.

A modo de conclusión de esta sección, el conjunto de nuestros resultados indican que no logramos generar una cepa productora de IL18 con potencial antitumoral superior a LVR01 que amerite continuar con estos estudios.

7. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Hasta hace pocos años, las terapias contra cáncer y en particular melanoma no presentaban grandes avances desde hacía varias décadas. Sin embargo, en estos últimos años ha ocurrido una expansión exponencial en cuanto a posibilidad de tratamientos, de la mano del conocimiento de que el sistema inmune puede manipularse para conseguir una respuesta antitumoral apropiada, mejorando así las perspectivas y el pronóstico para los pacientes [3]. Sin embargo, a pesar de estos avances sustanciales existen infinidad de dificultades como la baja tasa de respondedores, el bajo índice de respuesta o la duración de la misma, el poco aumento en la sobrevida global o la alta tasa de recaída post-interrupción de tratamiento, la toxicidad y los elevadísimos costos, por lo que la búsqueda de nuevas y mejores terapias continúa siendo imperiosa.

En ese sentido, en este trabajo nos propusimos avanzar en el estudio del uso de *Salmonella* como inmunoterapia para melanoma, evaluando el rol que desempeña flagelina en la respuesta antitumoral inducida por la bacteria, y analizando la posibilidad de optimizar su efecto a través de la expresión de IL18. A continuación se describen y discuten distintos aspectos de los resultados obtenidos en el contexto de este trabajo, contrastándolos con lo reportado por otros autores al respecto.

La expresión de IL18 no mejora el efecto antitumoral de *Salmonella*

La hipoxia es una condición atractiva para tratamientos contra el cáncer dado que provee de un entorno selectivo para terapias inducidas en este contexto, que es exclusivo de tumores sólidos. Asimismo, como las células en regiones hipóxicas/necróticas son resistentes tanto a radioterapia como a quimioterapia (en parte porque al encontrarse alejadas de los vasos sanguíneos no están expuestas adecuadamente a algunos tipos de drogas antitumorales [114]) se vuelve imperativo encontrar nuevas estrategias para atacarlas selectivamente [115]. Una de las principales ventajas del uso de *Salmonella* como terapia antitumoral es la posibilidad de replicarse en ambiente anaerobio. Además, en este trabajo se decidió trabajar con un plásmido cuyo gen de IL18 estuviera bajo control de un promotor *pnir* inducible en condiciones de hipoxia [116] de manera de que la producción de la citoquina se restringiera únicamente al tumor, evitando así efectos secundarios en tejido circundante.

A pesar de esto, los efectos observados con las distintas construcciones evaluadas fueron mínimos. Hay reportes que indican que la hipoxia no es una condición deseable, aumentando la expresión de genes involucrados en resistencia a drogas, por ejemplo el codificante para la glicoproteína P que bombea activamente drogas hacia afuera de las células en cuestión [117]. Asimismo, distintos equipos de investigación han observado que la hipoxia también sería capaz de promover la generación de adenosina, inhibiendo la función efectora de las células T [118], así como de CCL28, un quimioatrayente de células T reguladoras [119]. Esto podría explicar en parte el acotado efecto observado *in vivo*. En línea con esta observación, cabe destacar que no pudimos detectar un aumento de los niveles de IL18 en el microambiente tumoral de los animales tratados con las distintas construcciones de *Salmonella*. Dado que encontramos que los melanomas presentaban niveles basales de IL18 elevados, los mismos podrían estar enmascarando la producción de esta citoquina por parte de *Salmonella* y su efecto. Asimismo cultivos *in vitro* de las distintas cepas bacterianas productoras de IL18 mostraron niveles variables de concentración de la misma, y además desconocemos si ésta era biológicamente activa.

Por otro lado, encontramos que la cepa LVR01-pnir-IL18madsec (productora de IL18 madura y con secuencia de secreción) muestra iguales resultados que el grupo control en lo que respecta a retardo del crecimiento tumoral y prolongación de la supervivencia, inhibiendo el efecto antitumoral de *Salmonella*, lo que nos hace replantearnos el rol controversial de IL18. En ese sentido, el grupo de Park y colaboradores ha descrito extensamente el efecto dual de esta citoquina en cuanto a la progresión tumoral por su habilidad de inducir angiogénesis, migración/metástasis, proliferación y escape inmune (revisado en [120]), en comparación con sus funciones más clásicas como inductor de la producción de IFN γ , estimulador de NK y LT y potenciador de respuestas tipo Th1. Sin embargo, no podemos descartar otra posibilidad que explicaría el peor desempeño de esta cepa. Nuestros resultados mostraron que, pese a que la construcción llevaba una secuencia de secreción, la expresión de IL18 se da mayoritariamente en cuerpos de inclusión (Figura 6.3.9). Esto podría significar que esta cepa tiene capacidades disminuidas de crecimiento *in vivo*, dada la carga metabólica impuesta por la sobreexpresión de proteínas en cuerpos de inclusión.

En cuanto al rol controversial de citoquinas mencionado para IL18, algo similar ocurre con CXCL1. En el contexto de nuestro trabajo encontramos esta citoquina aumentada por el tratamiento con *Salmonella in vivo*, resultado esperado ya que desde hace décadas se la describe como reclutadora de neutrófilos y por ende, generadora de una respuesta antitumoral. Sin embargo, también se sabe que es secretada por células de melanoma

humano, presenta propiedades mitogénicas y está implicada en la patogénesis del melanoma [121-123].

A pesar de que utilizamos el tamaño tumoral como medida de la capacidad antitumoral de las distintas inmunoterapias evaluadas, este parámetro no parecería ser el único a tener en cuenta al momento de evaluar su efectividad. A diferencia de las terapias convencionales como quimioterapia o radioterapia donde el indicador tradicional de su efectividad es a través de la medida del volumen tumoral ya que inducen muerte directa de células tumorales, las inmunoterapias presentan una cinética completamente distinta, mucho más lenta [124]. En ese sentido, ensayos clínicos en los que pacientes con melanoma metastásico fueron tratados con ipilimumab (anticuerpo anti-CTLA4) muestran que entre un 10 y 20% de los mismos lograron un prolongado control tumoral o incluso regresión a pesar de que en los primeros tres meses post tratamiento exhibieron aumento del mismo [18]. Los mecanismos que subyacen el retardo de la respuesta no están completamente definidos aún pero puede deberse a que la estimulación de la respuesta a células T a través del bloqueo de CTLA4 demora varios meses, quizá en alcanzar un número suficiente de células T para llevar a cabo la eliminación del tumor. Por ello, dada la agresividad del melanoma, entendemos necesario contar con nuevos modelos que nos permitan evaluar los distintos tratamientos en una ventana mayor de tiempo. Así, trabajamos en el desarrollo de diferentes alternativas. Primeramente pusimos a punto el modelo MRD (con células B16F10), donde *Salmonella* demostró ser muy efectiva. Sumado a esto, actualmente nos encontramos desarrollando un modelo de melanoma no metastásico con exéresis de tumor primario y posterior desafío con segundo tumor para evaluar respuesta de memoria (similar a lo que hicimos en B16F10, pero al ser no metastásico nos permitiría trabajar con un mayor número de animales y manejar mejor los tiempos al poder retrasar el desafío tumoral).

PAMPs... ¿los buenos o malos de la película?

Otra parte del presente trabajo se centró en evaluar el rol de la flagelina en el efecto antitumoral de *Salmonella* bajo la premisa de que como PAMP podría ser esencial para la detección de la bacteria, posterior activación general del sistema inmune y por ende, generación de una respuesta inmune efectiva. Históricamente los PAMPs han sido conceptualizados como factores de virulencia bacterianos, productos procariotas que contribuyen a la patogenicidad. Si bien la flagelina ha sido señalada como el principal determinante proinflamatorio de *Salmonella* [85], otros autores han revelado un rol diferente de éste y otros ligandos de TLR, como citoprotectores frente a estrés inflamatorio [84]. Ellos

demonstraron que una cepa aflagelada de *Salmonella* Typhimurium lograba activación de caspasas más potente, generando apoptosis y aumentando la severidad de la enfermedad.

En el marco de este proyecto también hemos generado una cepa aflagelada de *S. Typhimurium* a partir de inactivación de los genes codificantes para las distintas flagelinas, logrando así cepas isogénicas que permitieran la evaluación de pérdida de funcionalidad, imposible para otros PAMPs como LPS o ADN que son necesarios para la viabilidad bacteriana. Sin embargo, en líneas generales no observamos diferencias en el efecto antitumoral inducido por ambas cepas, aunque sí pequeñas variaciones en los mecanismos inmunes activados que no influyeron en el resultado final de la terapia, determinado como crecimiento tumoral y sobrevida.

Llama la atención la cinética con la cual la cepa aflagelada se vuelve virulenta. Vijay-Kumar y colaboradores observaron que si bien a tiempos tempranos (24 hs o menos) la cepa carente de flagelina (de aquí en adelante, *flag-*) inducía niveles menores de inflamación, luego de 48 hs de administración era sustancialmente más virulenta, presentando síntomas más severos. Específicamente, cerca del 50% de los ratones infectados con esta cepa mostraron peritonitis aguda e intususcepción en segmentos intestinales, en contraposición con la cepa parental (SL3201) que no generó estas complicaciones en ningún caso. Además se observaron otras características macroscópicas de salmonelosis, incluyendo contracción cecal, reducción de peso y palidez en el 87% de los casos, versus sólo 13% de los ratones infectados con la cepa salvaje. Finalmente, a nivel molecular *flag-* estimuló marcadores sistémicos de inflamación: KC, IL-6 y lipocalina-2/NGAL. Cabe destacar que todos estos efectos pudieron ser atenuados mediante la inoculación sistémica de flagelina purificada 2 hs antes de la inoculación de la cepa aflagelada [84].

Respecto a la activación de caspasas, los autores del trabajo encontraron un número sustancialmente mayor de cuerpos apoptóticos en cortes de epitelio ileal infectado con *flag-*. Esta observación fue comprobada en co-cultivos de células epiteliales y *Salmonella flag-* durante 12 o 18 hs, que exhibieron acelerada inducción de apoptosis. Por esa razón se postula que NF-κB inducido por flagelina funciona como una importante vía de sobrevida anti-apoptosis (Figura 7.1). De manera interesante, Kagnoff y colaboradores afirman que la apoptosis epitelial retardada provee del tiempo suficiente para que el epitelio genere respuestas de sobrevida/defensa y a la vez la bacteria regule positivamente genes necesarios para su sobrevida en ambientes intracelulares (ej. SPI-2), resultando en un equilibrio hospedero-patógeno altamente calibrado.

En suma, lejos de ser un típico factor de virulencia cuya ausencia disminuye la habilidad bacteriana de causar enfermedad, la flagelina actuaría como lo que se ha denominado "factor

de avirulencia" [125], que al faltar resulta en un incremento de la severidad de la patogenicidad. Posiblemente la falla al estimular tempranamente la expresión de genes proinflamatorios o antibacterianos permite que la bacteria demore la detección mediante el sistema inmune innato, estableciendo así un punto de apoyo dentro de la mucosa intestinal para luego acceder a la lámina propia y células inmunes residentes o reclutadas. En paralelo, la incapacidad de las células epiteliales para responder ante la bacteria aflagelada con señales anti-apoptóticas acelera la activación de caspasas/apoptosis que compromete la respuesta anti-microbiana y facilita la liberación de la misma a tejidos subepiteliales. Sin embargo, nuestro modelo dista mucho de la ruta de entrada natural de *Salmonella*. Al ser inyectada directamente a nivel intratumoral, la flagelina no sería tan necesaria como en el tracto gastrointestinal, donde la bacteria usa la movilidad provista por el flagelo para acercarse al epitelio en presencia de mucus y movimientos peristálticos. Asimismo, podría estar sucediendo que el rol proinflamatorio de flagelina queda enmascarado por la respuesta inflamatoria inducida por otros PAMPs presentes en *Salmonella*, en particular LPS.

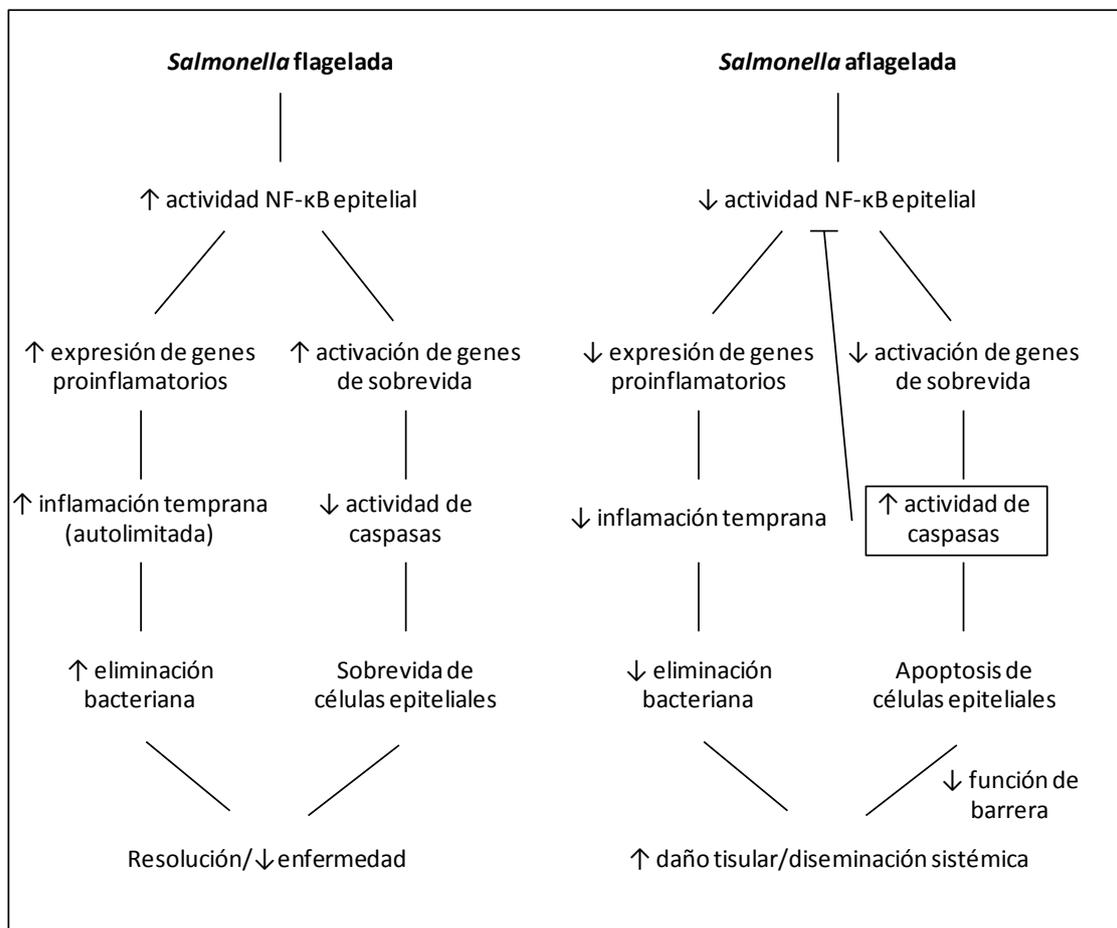


Figura 7.1. Representación esquemática del modelo propuesto por Vijay-Kumar y colaboradores (2006) para explicar el efecto de *Salmonella* en el tejido epitelial en relación con la presencia de flagelo [84].

Además, en este trabajo evaluamos la relación de *Salmonella* con la activación del inflamasoma en células tumorales *in vitro*. Para ello, primeramente analizamos la expresión de componentes del inflamasoma por parte de las células B16F1, encontrando que ésta línea produce solo algunos componentes del inflamasoma o derivados directos del mismo (ASC e IL18). Esto concuerda con lo reportado recientemente por Gehrke y colaboradores, que hicieron un extensivo análisis de expresión de componentes del inflamasoma (ASC, NLRP3 y caspasa-1) y transcritos de pro-IL1 β y pro-IL18 en más de 25 líneas celulares derivadas de melanomas primarios y metastásicos [126], sin incluir ninguna clona de la línea B16. Ellos encontraron que todos estos transcritos se encuentran en mayor proporción en las líneas primarias que en las metastásicas, y adicionalmente correlacionaron inversamente la expresión de ASC con el perfil de metilación de su región promotora (eligieron ese gen porque era el que presentaba mayores diferencias, 100% de las líneas primarias lo expresaban contra un 19% de las líneas metastásicas).

Es llamativo que en nuestro modelo *in vitro* la estimulación con *Salmonella*, lejos de inducir un aumento en la expresión de componentes del inflamasoma, la inhibe, aunque estos cambios no son de gran entidad. Sin embargo, varios grupos de investigación han reportado estos mismos hallazgos en diferentes tipos celulares, relacionando la disminución de la expresión de NLRC4 [127] y NLRP3 [128] mediada por *Salmonella* con su capacidad de evadir mecanismos inmunes para promover su sobrevivencia intracelular.

En el caso de NLRC4, Perez-Lopez y colaboradores demostraron recientemente que *Salmonella* induce la regulación negativa de este inflamasoma en células B mediante la secreción de una proteína a través de su SST3 (aún no identificada) que induce la fosforilación de Yap, su interacción con Hck y por lo tanto, se evita la translocación de Yap al núcleo donde interactuaría con el promotor de NLRC4, resultando en su regulación negativa y por ende, la deficiencia en el procesamiento de pro-IL1 β y pro-IL18 (ver Figura 7.2).

Asimismo, trabajos de diferentes autores han mostrado que por un lado *Salmonella* puede evitar la activación del inflamasoma NLRC4 para promover su sobrevivencia [128] y por otra parte que *in vivo* regula negativamente la expresión de flagelina para evitar la activación del sistema inmune [129]. Los resultados obtenidos en el contexto de nuestro trabajo podrían estar indicando que ambos efectos están relacionados.

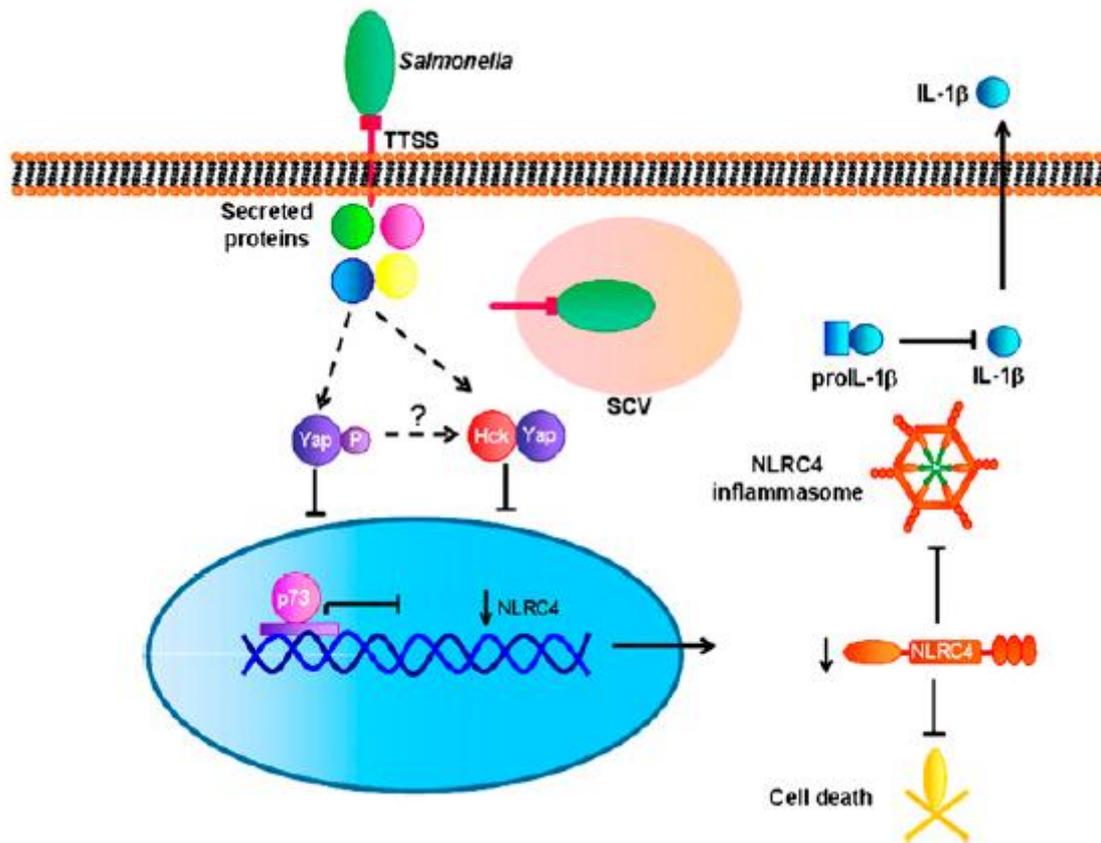


Figura 7.2. Representación esquemática del mecanismo utilizado por *Salmonella* para disminuir la expresión de NLR4 en células B. Imagen extraída de Perez-Lopez *et al*, 2013 [127].

Por su parte, en el caso de NLRP3 actualmente se está llevando a cabo en la Universidad de Pensilvania un proyecto de determinación de los mecanismos génicos involucrados en la evasión de *Salmonella* de este inflammasoma y su rol en la persistencia de la infección [130]. Resultados preliminares de este grupo aseguran que *Salmonella* menoscaba la activación de NLRP3 vía las enzimas aconitasa e isocitrato deshidrogenasa (ambas participantes del ciclo de Krebs (cdK)), dado que bacterias deficientes en esta vía (mediante silenciamiento de los genes *acnB* e *icdA*, respectivamente) son defectivas para establecer virulencia aguda y persistir a nivel sistémico [128]. La hipótesis planteada implica la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) como señalizadores para la activación del inflammasoma NLRP3, ya que las cepas mutantes en *acnB* o *icdA* inducen niveles elevados de ROS mitocondriales en comparación con su cepa parental (carente de flagelina para evaluar únicamente NLRP3 y no NLRP4). Además, la carencia de estas enzimas induce la acumulación de citrato (ya que este no es procesado para continuar el cdK, y éste también demostró ser un estímulo para la activación de NLRP3 por *Salmonella* intracelular, indicando que el sistema inmune innato detecta bacterias

intracelulares no solo a través del sensado de proteínas estructurales o factores de virulencia sino que también a mediante la detección de metabolitos bacterianos.

Finalmente, Iyer y colaboradores reportaron que la cardiolipina, fosfolípido constituyente de la membrana bacteriana, es un ligando de NLRP3 [131]. El metabolismo de esta molécula se ve alterado por desregulación del cdK, sugiriendo que la acumulación de citrato también puede señalar de forma indirecta la activación del inflamasoma, vía otros metabolitos bacterianos. Esta forma de señalización recientemente descrita se denomina vita-PAMPs, y refiere a señales moleculares asociadas a la viabilidad de las bacterias más que a su mera presencia estructural.

En cuanto a nuestras observaciones *in vivo* respecto a la activación del inflamasoma en el ambiente tumoral, encontramos que tanto los niveles de *nlrp3* como *nlr4* se ven incrementados significativamente por el tratamiento con *Salmonella*, no así los niveles del adaptador *asc*. Sobre ese tema el grupo de De Jong, luego de realizar experimentos con ratones *Asc*^{-/-} y *Nlrp3*^{-/-} afirma que, sorprendentemente, ninguno de los dos componentes del inflamasoma juega un papel significativo en la respuesta inmune contra *Salmonella*, aunque sí la falta de *asc* obstaculiza la maduración y liberación de IL18 [132].

En cuanto a nuestros resultados, si bien evaluamos la expresión de componentes del inflamasoma y sus derivados a nivel génico, la determinación de la expresión y funcionalidad de IL1 β e IL18 en sus formas activas, últimos efectores de la activación del inflamasoma y lo que en definitiva afirma con seguridad si se activó toda la cascada en forma correcta, no se realizó.

En suma nuestros resultados, que tienen clara divergencia *in vitro* e *in vivo*, confirman la complejidad de la relación entre *Salmonella* y la activación de inflamasoma. Sumado a ello, los resultados también sugieren que la flagelina no jugaría un rol central en la activación de inflamasoma por *Salmonella* en el ambiente tumoral.

Caracterización de la respuesta inmune inducida por las diferentes cepas de *Salmonella*

A pesar de no encontrar diferencias en el efecto antitumoral ejercido por ambas cepas, y debido a las pequeñas variaciones en los mecanismos inmunes activados que entendíamos eran interesantes de estudiar, realizamos un estudio globalizador en el que pudiéramos ponderar al mismo tiempo el aporte de todas las variables medidas en el resultado final. En este análisis de correspondencias evaluamos parámetros tan dispares como tamaño tumoral, porcentaje de distintas células infiltrantes de tumor y aumento relativo de la expresión de diferentes citoquinas. En ese sentido, encontramos varios resultados dignos de notar.

Primeramente, respecto a la variabilidad intra-grupo, los animales tratados con el placebo aparecen agrupados muy estrechamente, indicando que hay poca variabilidad entre los mismos. Interesantemente, una vez tratados, ya sea con *Salmonella* flagelada o aflagelada, la variabilidad aumenta significativamente, quedando distribuidos heterogéneamente a lo largo de todo el eje 1. Esto podría indicar que pequeñas variaciones en el inóculo (inherentes al método de inyección) y en el “estado inmunológico” del tumor se repercuten en grandes cambios a nivel fisiológico, teniendo individuos con distinto patrón de respuesta inmunológica dentro del mismo grupo. Esto estaría en concordancia con la variabilidad encontrada en la respuesta a inmunoterapias observada en ensayos clínicos.

Por otra parte, si bien los individuos tratados con las distintas *Salmonellas* se distribuyen heterogéneamente, se ve cierta tendencia a agruparse según subgrupos (LVR01 y LVR01flag-), con patrón de distribución definido mayoritariamente por *ifng*, *cxcl2*, *il12*, *il1b*, *il6* y P3 (Figura 6.2.9).

En segundo lugar, de este estudio se desprende que a pesar de que la flagelina se ha descrito como el factor de *Salmonella* más influyente en el reclutamiento de neutrófilos (y de hecho, esto fue lo que nos motivó en primera instancia a buscar células Gr1⁺/CD11b⁺ en tumores) a través de CCL20 e IL18, no se detectan diferencias en el porcentaje de neutrófilos infiltrantes al tumor entre los grupos tratados con las diferentes cepas bacterianas. Esto contrasta con lo reportado por el grupo de Salamone, que observó que la flagelina retarda la apoptosis espontánea de neutrófilos por varias vías [133], en cuyo caso sería de esperar que tumores inyectados con la cepa aflagelada presentaran menos neutrófilos (no por menor reclutamiento sino por mayor muerte celular). Además, no puede descartarse que el accionar de estas células esté relacionado a su localización subcelular y no a su cantidad absoluta [23, 134].

Sumado a esto nuestros resultados mostraron que existe una población Gr1^{int}/CD11b^{int} aumentada significativamente en los individuos tratados con LVR01flag- en comparación con su cepa parental. El análisis de correspondencias muestra que esta población y los niveles intratumorales de IFN γ son las variables que más aportan a los ejes principales y por ende, a la agrupación de individuos en los distintos grupos; asimismo existe una relación inversa entre ambas. Es justamente eso lo que nos sugirió la identidad de éstas células, que dadas sus características iniciales podrían ser células tan distintas como MDSC o eosinófilos.

Clásicamente se reconoce a los linfocitos T citotóxicos y a las células NK como las células efectoras antitumorales por excelencia. Sin embargo, existen otras poblaciones celulares que podrían estar involucradas en la eliminación de células malignas. Tal es el caso de las recientemente redefinidas células pre-mNK (del inglés, pre-mature Natural Killer cell) [135], inicialmente conocidas como IKDC (del inglés, IFN-producing Killer Dendritic Cells) [108]. Esta

población, pobremente estudiada, se caracteriza por expresar simultáneamente marcadores de células dendríticas y de células NK, incluyendo CD11b, CD11c, MHC de clase II, B220, CD49b, NK1.1, NKG2D, DX5 y Gr1 [109, 110, 136, 137], algunos de los cuales encontramos mediante citometría de flujo. Las células pre-mNK pueden diferenciarse a células NK maduras, pero aún en este estadio previo tienen capacidad de secretar grandes cantidades de IFN γ [137-139] y función citotóxica dependiente de TRAIL y NKG2D [109, 140]. De hecho, se ha demostrado su rol en la inmunovigilancia de metástasis pulmonares en el modelo de melanoma [109]. Aún no se ha descrito la conexión entre las células pre-mNK y *Salmonella*, pero considerando que estas células pueden ser inducidas a secretar IFN γ por algunos agonistas de los TLR como CpG y poly I:C [138, 139], resulta razonable pensar que el tratamiento por *Salmonella* podría conllevar a la activación de esta población celular.

Finalmente, se sabe que las células pre-mNK secretan IFN γ en respuesta a IL12 e IL18, y justamente estas tres citoquinas aparecen como grandes contribuyentes para el agrupamiento de muestras que se desprende del análisis de correspondencias. Claramente estudios posteriores deberán analizar en profundidad la contribución de este tipo celular al efecto antitumoral mediado por *Salmonella*.

En suma, fuimos capaces de poner a punto un modelo de enfermedad mínima residual en el que estudiar la acción antitumoral de *Salmonella* en un marco de tiempo interesante, aunque la generación de nuevos modelos de estudio ameritaría un trabajo de investigación aparte por todas las implicancias que tiene y los parámetros a tener en cuenta.

Asimismo encontramos una población celular infiltrante de tumor que se ve aumentada luego del tratamiento con *Salmonella* aflagelada, que a pesar de haberla caracterizado primariamente, creemos que abre una nueva línea de pensamiento que claramente amerita profundizar.

Cabe destacar que encontramos en el análisis de correspondencias una herramienta valiosísima para el estudio global de la respuesta inmune, ya que los mecanismos responsables del efecto antitumoral de *Salmonella* son múltiples y complejos como para abordarlos independientemente.

De esta manera, creemos que hemos contribuido significativamente al conocimiento básico que permita usar *Salmonella* atenuada como base para distintas inmunoterapias contra melanoma, sabiendo que sin duda quedan muchas preguntas a responder y otras tantas que formularnos a futuro.

8. Perspectivas a futuro

Dados entonces los resultados obtenidos en el contexto de esta tesis de maestría, muchas nuevas líneas de trabajo se abren para continuar investigando.

Primeramente, para seguir avanzando en el desarrollo de nuevas inmunoterapias para el tratamiento de melanoma es necesario mejorar los modelos experimentales con los que contamos, principalmente en lo que refiere a técnicas de valoración de nuestros modelos de enfermedad que nos permitan una detección y por lo tanto tratamiento más temprano. En ese sentido, entendemos que generar nuevos plásmidos que permitan hacer el seguimiento de los tumores *in vivo* mediante imagenología, utilizando otro tipo de proteínas bioluminiscentes como luciferasa (que no presenta interferencia con pelaje, piel y órganos como GFP) sería de gran valor. Por otra parte, podríamos utilizar técnicas de alta sensibilidad como imagenología molecular micro-PET con diferentes compuestos que permitan medir la actividad metabólica celular, tanto para el seguimiento de enfermedad mínima residual como de metástasis lejanas al tumor. Actualmente otro grupo de investigación en este laboratorio está poniendo a punto el uso del radiotrazador 18F-FDG (18F-2-Fluoro-2-desoxiglucosa) para el seguimiento de MRD con células A20 (datos no publicados). Asimismo, estudios previos de otros autores han demostrado la factibilidad de utilizar este y otros trazadores moleculares como péptidos de α -MSH (hormona estimulante de melanocitos) marcados con ^{99m}Tc e ^{111}In para el seguimiento de melanoma cutáneo maligno [141] y metastásico [142, 143].

En el contexto de las inmunoterapias a base de *Salmonella* viva atenuada, muchas interrogantes surgen en cuanto al rol del inflammasoma. Se sabe que *Salmonella* tiene la capacidad de inducir la activación del sistema inmune innato a través de varios receptores tanto de superficie como citosólicos, induciendo en última instancia la activación del inflammasoma, entre otros efectos. En particular en células tumorales, la misma puede converger en resultados opuestos: la eliminación de la célula maligna por muerte celular programada o la estimulación de la proliferación de las células cancerígenas mediada por IL1 β . En ese sentido, en este trabajo hemos encontrado resultados controversiales al respecto. Por un lado, encontramos que la infección *in vitro* de células de melanoma con *Salmonella* es capaz de disminuir sistemáticamente la expresión de los componentes del inflammasoma detectados mediante PCR en tiempo real (*procaspasa-1* y *asc*). Por otro lado, análisis *in vivo* revela que una dosis intratumoral de *Salmonella* aumenta significativamente la expresión de *nlrp3* y *nlr4* aunque no de *procaspasa-1* ni *asc*. Se desprende de esto entonces que sería clave

esclarecer la relación *Salmonella*-inflammasoma en el contexto de células de melanoma B16F1. Más aún, se vuelve imperativo analizar los efectos finales de la activación del inflammasoma, IL18 e IL1 β , ya que aunque detectamos IL18 intratumoral (mediante ELISA), no pudimos dilucidar si era inactiva o madura ni si era biológicamente funcional.

Es de particular utilidad para profundizar el estudio de la activación del inflammasoma el uso de ratones *ko* para distintos componentes del mismo como caspasa-1 o nlrp3. En ese sentido, recientemente hemos establecido una colaboración a nivel nacional para contar con dichas cepas lo que nos permite comenzar estudios preliminares en cultivos primarios de diferentes órganos de ratones con este contexto genético. Sumado a esto, la posibilidad de eliminar diferentes poblaciones celulares mediante el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a las mismas abre aún más el abanico de análisis comparativos entre *Salmonella* flagelada y aflagelada que pueden realizarse.

En lo que respecta al hallazgo que indica que las células pre-mNK estarían involucradas en la acción antitumoral de *Salmonella*, aún resta caracterizar en mayor profundidad estas células Gr1^{int}/CD11b^{int} que son reclutadas al tumor por la inmunoterapia, así como también comprender los mecanismos inmunes que subyacen este efecto antitumoral. El paso lógico a seguir es la separación mediante sorting celular y luego la evaluación de la funcionalidad de las mismas.

En cuanto a la utilización de *Salmonella* como vector de expresión de citoquinas, exploramos a fondo la factibilidad del uso de IL18 para reforzar la respuesta antitumoral intrínseca de *Salmonella*. A pesar de todos los esfuerzos, no logramos en ningún caso mejorar significativamente esta inmunoterapia, por lo que diferentes acercamientos surgen como posibles modificaciones a la misma. Primeramente, una posibilidad sería utilizarla en combinación con otros agentes terapéuticos, como dacarbazina que ya ha demostrado su utilidad como terapia combinada con *Salmonella*. Por otra parte, proponemos elegir otra citoquina con acción antitumoral reportada, como IL15, que ha demostrado potenciar la inmunidad antitumoral de células T CD8+ en modelos pre-clínicos [144, 145], activa células NK y pre-mNK y de hecho, actualmente está siendo evaluada en ensayos clínicos fase I en pacientes con melanoma metastásico [146].

Por último, en un intento por acercarnos a la aplicación clínica, sería interesante evaluar el efecto antitumoral de *Salmonella* LVR01 en células de melanoma humano obtenidas de pacientes dermatológicos con lesiones metastásicas, mediante cultivo primario de las mismas

y posteriores ensayos de invasividad y citotoxicidad para evaluar el potencial de esa línea de investigación.

9. Referencias bibliográficas

1. Ministerio de Salud Pública, D.E., Uruguay, *Causas de muerte en Uruguay*. 2008.
2. *American Cancer Society*. [cited; Available from: <http://www.cancer.org/cancer/skincancer-melanoma/index>].
3. Lesterhuis, W.J., J.B. Haanen, and C.J. Punt, *Cancer immunotherapy--revisited*. *Nat Rev Drug Discov*. **10**(8): p. 591-600.
4. 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.
5. Leschner, S. and S. Weiss, *Salmonella-allies in the fight against cancer*. *J Mol Med (Berl)*, 2010. **88**(8): p. 763-73.
6. Jerant, A.F., et al., *Early detection and treatment of skin cancer*. *Am Fam Physician*, 2000. **62**(2): p. 357-68, 375-6, 381-2.
7. *Surveillance Epidemiology and End Results: Estimated New Cancer Cases and Deaths for 2012*. [cited; Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/results_single/sect_01_table.01.pdf].
8. *Melanoma: Tratamiento (PDQ)*. [cited; Available from: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/melanoma/Patient/page2#top>].
9. Mellman, I., G. Coukos, and G. Dranoff, *Cancer immunotherapy comes of age*. *Nature*. **480**(7378): p. 480-9.
10. *FDA Approved Drugs for Oncology*. [cited; Available from: <https://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/therapeutic-area/12/oncology>].
11. Lewis Phillips, G.D., et al., *Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate*. *Cancer Res*, 2008. **68**(22): p. 9280-90.
12. Rini, B.I., et al., *Combination immunotherapy with prostatic acid phosphatase pulsed antigen-presenting cells (provenge) plus bevacizumab in patients with serologic progression of prostate cancer after definitive local therapy*. *Cancer*, 2006. **107**(1): p. 67-74.
13. Shah, D.J. and R.S. Dronca, *Latest advances in chemotherapeutic, targeted, and immune approaches in the treatment of metastatic melanoma*. *Mayo Clin Proc*, 2014. **89**(4): p. 504-19.
14. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(8): p. 711-23.

15. Chapman, P.B., et al., *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. N Engl J Med, 2013. **364**(26): p. 2507-16.
16. Hauschild, A., et al., *Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial*. Lancet, 2012. **380**(9839): p. 358-65.
17. Flaherty, K.T., et al., *Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma*. N Engl J Med, 2012. **367**(2): p. 107-14.
18. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med. **363**(8): p. 711-23.
19. Burdine, L., K. Lai, and J.A. Laryea, *Ipilimumab-induced colonic perforation*. J Surg Case Rep. **2014**(3).
20. Fellner, C., *Ipilimumab (yervoy) prolongs survival in advanced melanoma: serious side effects and a hefty price tag may limit its use*. P T. **37**(9): p. 503-30.
21. Menzies, A.M. and G.V. Long, *New combinations and immunotherapies for melanoma: latest evidence and clinical utility*. Ther Adv Med Oncol. **5**(5): p. 278-85.
22. Bouwhuis, M.G., et al., *Phase III trial comparing adjuvant treatment with pegylated interferon Alfa-2b versus observation: prognostic significance of autoantibodies--EORTC 18991*. J Clin Oncol. **28**(14): p. 2460-6.
23. Westphal, K., et al., *Containment of tumor-colonizing bacteria by host neutrophils*. Cancer Res, 2008. **68**(8): p. 2952-60.
24. 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.
25. Coley, W.B., *The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus)*. Proc R Soc Med, 1910. **3**(Surg Sect): p. 1-48.
26. Coley, W.B., *The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893*. Clin Orthop Relat Res, 1991(262): p. 3-11.
27. Coley, W.B. and J.P. Hoguet, *Melanotic Cancer: With a Report of 91 Cases*. Ann Surg, 1916. **64**(2): p. 206-41.
28. Lamm, D.L., et al., *Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of superficial bladder cancer*. J Urol, 1980. **124**(1): p. 38-40.
29. 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.
30. Mordoh, J. *Phase II/III Clinical Study CSF470 Plus BCG Plus GM-CSF vs IFN Alpha 2b in Stage IIB, IIC and III Melanoma Patients*. 12/12/14 [cited; Available from:

- <http://www.centerwatch.com/clinical-trials/listings/external-studydetails.aspx?StudyID=NCT01729663&City=Buenos%20Aires&Country=Argentina>.
31. Pan, L. *A Phase I Study of Intralesional Bacillus Calmette-Guerin (BCG) and Followed by Ipilimumab Therapy in Patients With Advanced Metastatic Melanoma*. 28/05/13
[cited; Available from: <http://www.centerwatch.com/clinical-trials/listings/external-studydetails.aspx?StudyID=NCT01838200&City=Heidelberg&Country=Australia#Contact>.
 32. Gill, G.V. and A. Holden, *A malignant pleural effusion infected with Salmonella enteritidis*. *Thorax*, 1996. **51**(1): p. 104-5.
 33. Clairmont, C., et al., *Biodistribution and genetic stability of the novel antitumor agent VNP20009, a genetically modified strain of Salmonella typhimurium*. *J Infect Dis*, 2000. **181**(6): p. 1996-2002.
 34. Loeffler, M., et al., *IL-18-producing Salmonella inhibit tumor growth*. *Cancer Gene Ther*, 2008. **15**(12): p. 787-94.
 35. 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.
 36. 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.
 37. Eisenstein, T.K., et al., *Immunotherapy of a plasmacytoma with attenuated salmonella*. *Med Oncol*, 1995. **12**(2): p. 103-8.
 38. 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.
 39. 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.
 40. 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.
 41. Pawelek, J.M., K.B. Low, and D. Bermudes, *Bacteria as tumour-targeting vectors*. *Lancet Oncol*, 2003. **4**(9): p. 548-56.
 42. 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.
 43. 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.

44. 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.
45. 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.
46. Sznol, M., et al., *Use of preferentially replicating bacteria for the treatment of cancer.* J Clin Invest, 2000. **105**(8): p. 1027-30.
47. Luo, X., et al., *Antitumor effect of VNP20009, an attenuated Salmonella, in murine tumor models.* Oncol Res, 2001. **12**(11-12): p. 501-8.
48. Chabalgoity, J.A., et al., *Live bacteria as the basis for immunotherapies against cancer.* Expert Rev Vaccines, 2002. **1**(4): p. 495-505.
49. 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.
50. Okamura, H., et al., *Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells.* Nature, 1995. **378**(6552): p. 88-91.
51. Fantuzzi, G., et al., *Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice.* Blood, 1998. **91**(6): p. 2118-25.
52. Nakanishi, K., et al., *Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu.* Cytokine Growth Factor Rev, 2001. **12**(1): p. 53-72.
53. Nakanishi, K., et al., *Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses.* Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 423-74.
54. Hashimoto, W., et al., *Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively.* J Immunol, 1999. **163**(2): p. 583-9.
55. Micallef, M.J., et al., *In vivo antitumor effects of murine interferon-gamma-inducing factor/interleukin-18 in mice bearing syngeneic Meth A sarcoma malignant ascites.* Cancer Immunol Immunother, 1997. **43**(6): p. 361-7.
56. Chung, S.W., E.P. Cohen, and T.S. Kim, *Generation of tumor-specific cytotoxic T lymphocyte and prolongation of the survival of tumor-bearing mice using interleukin-18-secreting fibroblasts loaded with an epitope peptide.* Vaccine, 2004. **22**(20): p. 2547-57.

57. Chirathaworn, C., *IL-18 in Regulation of Antitumor Immune Response and Clinical Application*. Targeted Cancer Immune Therapy, 2009: p. 19-41.
58. Park, H., et al., *Enhanced IL-18 expression in common skin tumors*. Immunol Lett, 2001. **79**(3): p. 215-9.
59. Jung, M.K., et al., *IL-18 enhances the migration ability of murine melanoma cells through the generation of ROI and the MAPK pathway*. Immunol Lett, 2006. **107**(2): p. 125-30.
60. Robertson, M.J., et al., *Clinical and biological effects of recombinant human interleukin-18 administered by intravenous infusion to patients with advanced cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(14 Pt 1): p. 4265-73.
61. Grille, S., et al., *Salmonella Enterica serovar Typhimurium immunotherapy for B-Cell Lymphoma induces broad antitumor immunity with therapeutic effect*. Immunology.
62. Avogadri, F., et al., *Cancer immunotherapy based on killing of Salmonella-infected tumor cells*. Cancer Res, 2005. **65**(9): p. 3920-7.
63. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. Mol Cell, 2002. **10**(2): p. 417-26.
64. Fink, S.L. and B.T. Cookson, *Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells*. Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 1907-16.
65. Khare, S., et al., *Inflammasomes and their activation*. Crit Rev Immunol. **30**(5): p. 463-87.
66. Kawai, T. and S. Akira, *The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition*. Int Immunol, 2009. **21**(4): p. 317-37.
67. Lamkanfi, M., et al., *Caspase-1 inflammasomes in infection and inflammation*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(2): p. 220-5.
68. Mariathasan, S. and D.M. Monack, *Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 31-40.
69. Broz, P. and D.M. Monack, *Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections*. Immunol Rev. **243**(1): p. 174-90.
70. Boatright, K.M., et al., *A unified model for apical caspase activation*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 529-41.
71. Dunn, J.H., L.Z. Ellis, and M. Fujita, *Inflammasomes as molecular mediators of inflammation and cancer: potential role in melanoma*. Cancer Lett. **314**(1): p. 24-33.
72. Broz, P., et al., *Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella*. J Exp Med. **207**(8): p. 1745-55.

73. Lara-Tejero, M., et al., *Role of the caspase-1 inflammasome in Salmonella typhimurium pathogenesis*. J Exp Med, 2006. **203**(6): p. 1407-12.
74. Muller, A.J., et al., *The S. Typhimurium effector SopE induces caspase-1 activation in stromal cells to initiate gut inflammation*. Cell Host Microbe, 2009. **6**(2): p. 125-36.
75. Franchi, L., *Role of inflammasomes in salmonella infection*. Front Microbiol. **2**: p. 8.
76. 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.
77. Smith, K.D. and A. Ozinsky, *Toll-like receptor-5 and the innate immune response to bacterial flagellin*. Curr Top Microbiol Immunol, 2002. **270**: p. 93-108.
78. Franchi, L., et al., *Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages*. Nat Immunol, 2006. **7**(6): p. 576-82.
79. 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.
80. Yamamoto, S. and K. Kutsukake, *FliA-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.
81. 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.
82. 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.
83. McGovern, V.J. and L.J. Slavutin, *Pathology of salmonella colitis*. Am J Surg Pathol, 1979. **3**(6): p. 483-90.
84. Vijay-Kumar, M., et al., *Flagellin suppresses epithelial apoptosis and limits disease during enteric infection*. Am J Pathol, 2006. **169**(5): p. 1686-700.
85. Zeng, H., et al., *Flagellin is the major proinflammatory determinant of enteropathogenic Salmonella*. J Immunol, 2003. **171**(7): p. 3668-74.
86. Mónaco, A., *Rol de la flagelina en el efecto antitumoral de Salmonella*. Tesina de Grado, in Departamento de Desarrollo Biotecnológico. 2011, Universidad de la República.
87. 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.*
88. Stecher, B., et al., *Flagella and chemotaxis are required for efficient induction of Salmonella enterica serovar Typhimurium colitis in streptomycin-pretreated mice. Infect Immun, 2004. 72(7): p. 4138-50.*
 89. Chabalgoity, J.A., et al., *Expression and immunogenicity of an Echinococcus granulosus fatty acid-binding protein in live attenuated Salmonella vaccine strains. Infect Immun, 1997. 65(6): p. 2402-12.*
 90. 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.*
 91. Boutajangout, A., et al., *Diminished amyloid-beta burden in Tg2576 mice following a prophylactic oral immunization with a salmonella-based amyloid-beta derivative vaccine. J Alzheimers Dis, 2009. 18(4): p. 961-72.*
 92. Goni, F., et al., *Mucosal vaccination delays or prevents prion infection via an oral route. Neuroscience, 2005. 133(2): p. 413-21.*
 93. Goni, F., et al., *High titers of mucosal and systemic anti-PrP antibodies abrogate oral prion infection in mucosal-vaccinated mice. Neuroscience, 2008. 153(3): p. 679-86.*
 94. 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, 2013. 37(3): p. 341-8.*
 95. Rosenkranz, C.D., et al., *Towards new immunotherapies: targeting recombinant cytokines to the immune system using live attenuated Salmonella. Vaccine, 2003. 21(7-8): p. 798-801.*
 96. Grille, S., et al., *Salmonella Enterica serovar Typhimurium immunotherapy for B-Cell Lymphoma induces broad antitumor immunity with therapeutic effect. Immunology, 2014.*
 97. Kalil, R.A., et al., *Experimental model of gene transfection in healthy canine myocardium: perspectives of gene therapy for ischemic heart disease. Arq Bras Cardiol, 2002. 79(3): p. 223-32.*
 98. Khan, C.M., et al., *Construction, expression, and immunogenicity of multiple tandem copies of the Schistosoma mansoni peptide 115-131 of the P28 glutathione S-transferase expressed as C-terminal fusions to tetanus toxin fragment C in a live aro-attenuated vaccine strain of Salmonella. J Immunol, 1994. 153(12): p. 5634-42.*
 99. Sharp, P.M., et al., *Codon usage patterns in Escherichia coli, Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Drosophila melanogaster and*

- Homo sapiens; a review of the considerable within-species diversity.* Nucleic Acids Res, 1988. **16**(17): p. 8207-11.
100. Lloyd, S.A., et al., *Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences.* Mol Microbiol, 2002. **43**(1): p. 51-9.
 101. Vonderviszt, F., et al., *The use of a flagellar export signal for the secretion of recombinant proteins in Salmonella.* Methods Mol Biol. **824**: p. 131-43.
 102. Lloyd, S.A., et al., *Yersinia YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals.* Mol Microbiol, 2001. **39**(2): p. 520-31.
 103. 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.
 104. Gabri, M.R., et al., *Complete antitumor protection by perioperative immunization with GM3/VSSP vaccine in a preclinical mouse melanoma model.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(23): p. 7092-8.
 105. Grinshtein, N., et al., *Neoadjuvant vaccination provides superior protection against tumor relapse following surgery compared with adjuvant vaccination.* Cancer Res, 2009. **69**(9): p. 3979-85.
 106. Cho, D., et al., *Endogenous interleukin-18 modulates immune escape of murine melanoma cells by regulating the expression of Fas ligand and reactive oxygen intermediates.* Cancer Res, 2000. **60**(10): p. 2703-9.
 107. 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.
 108. Shortman, K. and J.A. Villadangos, *Is it a DC, is it an NK? No, it's an IKDC.* Nat Med, 2006. **12**(2): p. 167-8.
 109. Taieb, J., et al., *A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance.* Nat Med, 2006. **12**(2): p. 214-9.
 110. Greifengberg, V., et al., *Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN-gamma treatment impairs DC development.* Eur J Immunol, 2009. **39**(10): p. 2865-76.
 111. González, R., *Impacto de la estabilidad plasmídica en el diseño de vectores bacterianos basados en Salmonella. Tesina de Grado, in Departamento de Desarrollo Biotecnológico.* 2012, Universidad de la República.
 112. Loeffler, M., et al., *Attenuated Salmonella engineered to produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(31): p. 12879-83.

113. Loeffler, M., et al., *Inhibition of tumor growth using salmonella expressing Fas ligand*. J Natl Cancer Inst, 2008. **100**(15): p. 1113-6.
114. Durand, R.E., *The influence of microenvironmental factors during cancer therapy*. In Vivo, 1994. **8**(5): p. 691-702.
115. Brown, J.M. and W.R. Wilson, *Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(6): p. 437-47.
116. Jayaraman, P.S., et al., *Location and sequence of the promoter of the gene for the NADH-dependent nitrite reductase of Escherichia coli and its regulation by oxygen, the Fnr protein and nitrite*. J Mol Biol, 1987. **196**(4): p. 781-8.
117. Wartenberg, M., et al., *Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species*. FASEB J, 2003. **17**(3): p. 503-5.
118. Ohta, A., et al., *A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(35): p. 13132-7.
119. Facciabene, A., et al., *Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells*. Nature. **475**(7355): p. 226-30.
120. Park, S., S. Cheon, and D. Cho, *The dual effects of interleukin-18 in tumor progression*. Cell Mol Immunol, 2007. **4**(5): p. 329-35.
121. Richmond, A. and H.G. Thomas, *Melanoma growth stimulatory activity: isolation from human melanoma tumors and characterization of tissue distribution*. J Cell Biochem, 1988. **36**(2): p. 185-98.
122. Payne, A.S. and L.A. Cornelius, *The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis*. J Invest Dermatol, 2002. **118**(6): p. 915-22.
123. Dhawan, P. and A. Richmond, *Role of CXCL1 in tumorigenesis of melanoma*. J Leukoc Biol, 2002. **72**(1): p. 9-18.
124. Hoos, A., et al., *Improved endpoints for cancer immunotherapy trials*. J Natl Cancer Inst. **102**(18): p. 1388-97.
125. Galan, J.E., *'Avirulence genes' in animal pathogens?* Trends Microbiol, 1998. **6**(1): p. 3-6.
126. Gehrke, S., et al., *Metastatic melanoma cell lines do not secrete IL-1beta but promote IL-1beta production from macrophages*. J Dermatol Sci. **74**(2): p. 167-9.
127. Perez-Lopez, A., et al., *Salmonella downregulates Nod-like receptor family CARD domain containing protein 4 expression to promote its survival in B cells by preventing inflammasome activation and cell death*. J Immunol. **190**(3): p. 1201-9.

128. Wynosky-Dolfi, M.A., et al., *Oxidative metabolism enables Salmonella evasion of the NLRP3 inflammasome*. J Exp Med. **211**(4): p. 653-68.
129. Cummings, L.A., et al., *In vivo, fliC expression by Salmonella enterica serovar Typhimurium is heterogeneous, regulated by ClpX, and anatomically restricted*. Mol Microbiol, 2006. **61**(3): p. 795-809.
130. Brodsky, I.E. *Mechanisms of Inflammasome Inhibition by Salmonella*. [cited; Available from: http://fsrio.nal.usda.gov/nal_web/fsrio/printresults.php?ID=9459].
131. Iyer, S.S., et al., *Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation*. Immunity. **39**(2): p. 311-23.
132. De Jong, H.K., et al., *Limited role for ASC and NLRP3 during in vivo Salmonella Typhimurium infection*. BMC Immunol. **15**: p. 30.
133. Salamone, G.V., et al., *Flagellin delays spontaneous human neutrophil apoptosis*. Lab Invest. **90**(7): p. 1049-59.
134. de Melo, F.M., et al., *Anti-metastatic immunotherapy based on mucosal administration of flagellin and immunomodulatory P10*. Immunol Cell Biol. **93**(1): p. 86-98.
135. Guimont-Desrochers, F. and S. Lesage, *Revisiting the Prominent Antitumoral Potential of Pre-mNK Cells*. Front Immunol. **4**: p. 446.
136. Guimont-Desrochers, F., et al., *Cutting edge: genetic characterization of IFN-producing killer dendritic cells*. J Immunol, 2009. **182**(9): p. 5193-7.
137. Chan, C.W., et al., *Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity*. Nat Med, 2006. **12**(2): p. 207-13.
138. Jiang, Q., H. Wei, and Z. Tian, *IFN-producing killer dendritic cells contribute to the inhibitory effect of poly I:C on the progression of murine melanoma*. J Immunother, 2008. **31**(6): p. 555-62.
139. Vremec, D., et al., *Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells*. Blood, 2007. **109**(3): p. 1165-73.
140. Ullrich, E., et al., *Trans-presentation of IL-15 dictates IFN-producing killer dendritic cells effector functions*. J Immunol, 2008. **180**(12): p. 7887-97.
141. Krug, B., et al., *The diagnostic accuracy of 18F-FDG PET in cutaneous malignant melanoma*. Eur J Nucl Med Mol Imaging. **37**(7): p. 1434-5; author reply 1436-7.
142. Froidevaux, S., et al., *A gallium-labeled DOTA-alpha-melanocyte-stimulating hormone analog for PET imaging of melanoma metastases*. J Nucl Med, 2004. **45**(1): p. 116-23.

143. Miao, Y., K. Benwell, and T.P. Quinn, *99mTc- and 111In-labeled alpha-melanocyte-stimulating hormone peptides as imaging probes for primary and pulmonary metastatic melanoma detection*. J Nucl Med, 2007. **48**(1): p. 73-80.
144. Klebanoff, C.A., et al., *IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(7): p. 1969-74.
145. Teague, R.M., et al., *Interleukin-15 rescues tolerant CD8+ T cells for use in adoptive immunotherapy of established tumors*. Nat Med, 2006. **12**(3): p. 335-41.
146. *A Phase I Study of Intravenous Recombinant Human IL-15 in Adults With Refractory Metastatic Malignant Melanoma and Metastatic Renal Cell Cancer*. [cited; Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01021059>].

10. Trabajos derivados de esta Tesis

Publicaciones

The absence of flagellin modifies tumor-infiltrating immune cell populations induced by Salmonella treatment without altering antitumor outcome. Amy Mónaco, Lucía Yim, Thais Bascuas, Andrés Iriarte, Aracé Martínez, José A. Chabalgoity, María Moreno (manuscrito en preparación).

Presentaciones orales dictadas

Evaluación del rol de la flagelina en el efecto antitumoral de Salmonella enterica serotipo Typhimurium LVR01. XV Jornadas de la SUB; Piriápolis, Uruguay, año 2014.

Development of new immunotherapies against melanoma based on the use of Salmonella carrying plasmids encoding for IL18. XLII Reunião Anual da SBBq - Simpósio Jovem Cientista SBBq-Conesul; Foz do Iguaçu, Brasil, año 2013.

Desarrollo de nuevas inmunoterapias contra melanoma basadas en el uso de Salmonella atenuada portando diferentes plásmidos codificantes para IL18. I Jornadas de Biología Humana; Montevideo, Uruguay, año 2012.

Presentaciones de poster en congresos

TOWARDS NOVEL IMMUNOTHERAPIES AGAINST MELANOMA: assessment of the antitumoral activity of live attenuated Salmonella carrying plasmids encoding for IL18. First Argentinean Spring Course in Advanced Immunology; Los Cocos, Córdoba, Argentina, año 2013.

TERAPIA GÉNICA EN MELANOMA: Una vacuna a Salmonella atenuada portando un gen codificante para IL18. Resultados preliminares. Vola M, Mónaco A, Yim, L, Kramer, G, González, R, Agorio, C, Moreno, M, Chabalgoity, JA. XXXI Reunión Anual de Dermatólogos Latinoamericanos (RADLA), Punta del Este, Uruguay, año 2013.

Desarrollo de nuevas inmunoterapias contra melanoma basadas en el uso de Salmonella atenuada portando diferentes plásmidos codificantes para IL18. XIV Jornadas de la SUB; Piriápolis, Uruguay, año 2012.

Desarrollo y evaluación de nuevas inmunoterapias basadas en Salmonella viva atenuada para el tratamiento de melanoma. Moreno M, Mónaco A, Vola M, Kramer MG, Agorio C, Chabalgoity JA. XIV Jornadas de la SUB; Piriápolis, Uruguay, año 2012