



Facultad de Ciencias – PEDECIBA Biología

Universidad de la República

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Mayo 2021

Estudio de los mecanismos celulares y moleculares anti-melanoma inducidos por *Salmonella*

M.Sc. Amy Mónaco Patiño

Orientador: Dra. María Moreno

Coorientador: Prof. Dr. José Alejandro Chabalgoity

Tribunal Evaluador:

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



"Sólo porque algo no haga lo que era previsto
no quiere decir que sea inútil el esfuerzo"

Thomas Alva Edison

Agradecimientos

A las agencias que me financiaron (ANII, CSIC y PEDECIBA), tanto por la beca como por otros proyectos y asistencia a distintas instancias relacionadas con este doctorado. El dinero no es todo... pero ¡cómo ayuda!

A los evaluadores, ya que además de tener ese rol todos me dieron una mano con algún ensayo en particular que necesitaba orientación con una técnica, reactivos o algún equipo.

A María y Alejandro, por seguir eligiendo ser mis tutores, ¡por tercera vez! Por todas esas reuniones tortita de por medio para planificar y discutir mis ensayos y resultados. Ya está, les prometo que no les pido más ser mis orientadores...

A Paola Scavone, primero por su invaluable ayuda en el microscopio confocal y abrirme las puertas de su laboratorio del IIBCE pero también por tener ese entusiasmo que contagia y devolverme la emoción por la ciencia en esos momentos de frustración que creo que todos pasamos que que están “tan de menos”.

A Lucía Yim, por ser mi eterna gurú de biología molecular. Me diste tremenda mano, ¡mis mutantes son tus bebés también!

A Gabriel Lassabe y Triana Delfín por su ayuda y respuesta a infinitas preguntas sobre ese equipo tan raro y un tanto caprichoso que es el ÅKTA.

A Sofi y María Clara por animarse a ser mis primeras estudiantes, por todas esas tardes entre ratones, células y medios que tanto aportaron a esta tesis!

A las Matecitas, esas amigas científicas con las que “matecito va, matecito viene” se puede hablar tanto de los últimos avances de la ciencia como de cualquier chusmerío del espectáculo. ¡Son-lo-más! En este grupo particularmente un “aplauzo, medalla y beso” a Vicky, mi bioinfo de cabecera!

A mis padres, que desde chiquita me plantaron la semillita del estudio y la curiosidad y me hicieron creer que era lo más normal del mundo tener una carrera universitaria. Gracias por siempre apoyarme y creer en mí.

En especial a Marcos y Iarita -que me acompañó en los primeros pasos de este doctorado desde la pancita- por bancar feriados, fineses y horarios raros que a veces nos tocan, llantos ocasionales y las frustraciones que indefectiblemente vienen con esta carrera. ¡Los amo!

No quiero olvidar a nadie, asique a todos ¡gracias y más gracias!

Índice de contenidos

1. ABREVIATURAS	6
2. RESUMEN	8
3. INTRODUCCIÓN	9
Melanoma	9
Terapéutica	9
Uso de bacterias como inmunoterapia	10
Sistema inmune: PRRs y PAMPs	11
Inflamasomas	13
Inflamasomas y <i>Salmonella</i>	17
La Tríada: Cáncer, Inflamasomas y <i>Salmonella</i>	21
4. OBJETIVOS	26
4.1. Objetivo general	26
4.2. Objetivos específicos	26
5. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1. Líneas celulares	27
5.2. Obtención de macrófagos derivados de médula ósea	27
5.3. Generación de cepas bacterianas de trabajo	28
5.4. Curvas de crecimiento	31
5.5. Ensayos de invasión y replicación	31
5.6. Evaluación de la capacidad de formación de biofilms	31
5.7. Evaluación de la citotoxicidad inducida por <i>Salmonella in vitro</i>	32
5.8. Evaluación de muerte celular inmunogénica	33
5.9. Inmunofluorescencia y microscopía confocal	33
5.10. Cuantificación del proceso de METosis	34
5.11. Evaluación de la citotoxicidad de METs sobre <i>Salmonella</i>	34

5.12.	Evaluación de la activación de caspasa-1	34
5.13.	Animales	35
5.14.	Inducción de tumores y evaluación del efecto tumoricida de las cepas de <i>Salmonella</i>	35
5.15.	Depleción de macrófagos y células NK	35
5.5.	Estudio de la expresión génica	36
5.6.	Análisis de células infiltrantes de tumor o ganglio	39
5.7.	Cuantificación de citoquinas mediante ELISA	40
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
6.1.	Capítulo 1 – Células y moléculas involucradas en la actividad anti-tumoral de <i>Salmonella</i>	41
	Perfil de citoquinas	44
	Células involucradas	46
6.2.	Capítulo 2 – Liberación de METs inducida por <i>Salmonella</i>	60
6.3.	Capítulo 3 – Rol del inflamasoma en la respuesta anti-tumoral de <i>Salmonella</i>	67
6.4.	Capítulo 4 – Evaluación de la contribución individual de distintas moléculas activadoras del inflamasoma al efecto antitumoral de <i>Salmonella</i>	76
7.	DISCUSIÓN GENERAL, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	87
8.	BIBLIOGRAFÍA	100
	ANEXO 1. TRABAJOS DERIVADOS DE ESTA TESIS	110
	Publicaciones directamente asociadas a esta Tesis	110
	Publicaciones asociadas al área de trabajo de esta Tesis	110
	Presentaciones orales dictadas	110
	Presentaciones de poster en congresos	111
	ANEXO 2. PROYECTOS RELACIONADOS CON ESTA TESIS	112
	ANEXO 3. PREMIOS ASOCIADOS A ESTA TESIS	113

1.Abreviaturas

AIM-2 Absent in Melanoma-2

ASC Adaptor Protein Apoptosis-Associated Speck

BCG Bacilo Calmette Guerin

BMDM Bone marrow derived macrophages/Macrófagos derivados de medula ósea

CASP-1 Caspasa-1

CLR C-type Lectin Receptor/Receptor de lectina tipo C

CTLA-4 Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

DAMPs Damage Associated Molecular Patterns/Patrones moleculares asociados al daño

DC Dendritic Cells/Células Dendríticas

DX Doxorubicina

FDA Food and Drug Administration

GFP Green Fluorescent Protein/Proteína verde fluorescente

GM-CSF Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

GSDM-D Gasdermina D

HMGB-1 High Mobility Group Box 1

ICD Immunogenic Cell Death/Muerte Celular Inmunogénica

IDO Indoleamine 2,3-dioxygenase

IFN γ Interferón gamma

ILx Interleuquina x

KO knock out

LPS Lipopolisácarido

MET Macrophage Extracellular Traps/Trampas Extracelulares de Macrófagos

MOI Multiplicity of Infection/Multiplicidad de infección

MRD Minimal Residual Disease/Enfermedad Mínima Residual

NAIP NLR family, apoptosis inhibitory proteins

NET Neutrophil Extracellular Traps/Trampas Extracelulares de Neutrófilos

NK Natural killer cells

NLR Nod-like Receptor/Receptor del tipo Nod

PAMPs Pathogen Associated Molecular Patterns/Patrones moleculares asociados a patógenos

PCR Polymerase Chain Reaction/Reacción en cadena de la polimerasa

PRR Pattern Recognition Receptor/Receptor de Reconocimiento de Patrón

PYHIN Pyrin and HIN domain-containing protein

qPCR PCR cuantitativa

rhIL18 Interleuquina 18 recombinante humana

RLR RIG-I Like Receptor/Receptor del tipo RIG-I

ROS Reactive Oxygen Species/Especies reactivas del oxígeno

SCV *Salmonella* containing vacuole/Vacuola contenedora de *Salmonella*

SPI-1/2 Salmonella Pathogenicity Island/Isla de patogenicidad de *Salmonella* 1/2

SST3 Sistema de secreción de tipo 3

TAA Tumor Associated Antigens/Antígenos asociados a tumor

TGF-β Transforming Growth Factor beta

TI Trained Immunity /Inmunidad Entrenada

TLR Toll-like Receptor/Receptor del tipo Toll

Tregs Células T reguladoras

ufc unidades formadoras de colonia

2. Resumen

Dentro de la gran variedad de tipos de cáncer, cuya mortalidad ajustada por cambios demográficos en general ha disminuido con el paso de los años, el melanoma resalta por el gran aumento en su incidencia a nivel mundial, particularmente en personas jóvenes. Dada su inmunogenicidad, es un buen candidato para inmunoterapias y en particular aquellas basadas en el uso de bacterias como *Salmonella* se vuelven atractivas por su naturaleza antitumoral intrínseca. La misma está mediada en parte por la cantidad de moléculas que posee que pueden ser sensadas por el sistema inmune desencadenando el inicio de una respuesta inmune efectiva.

En el presente trabajo nos propusimos avanzar hacia la comprensión de las bases celulares y moleculares por las que *Salmonella* Typhimurium LVR01 (una cepa mutante metabólica atenuada) ejerce su efecto anti tumoral en melanoma, en un intento por generar conocimiento que permita mejorar las estrategias terapéuticas actuales.

Observamos que el tratamiento de melanoma con LVR01 rápidamente induce un programa de expresión génica proinflamatorio en el microambiente tumoral. El mismo promueve el reclutamiento neutrófilos, macrófagos y células NK, siendo estas dos últimas células relevantes en el efecto antitumoral. LVR01 también demostró ser capaz de inducir muerte celular inmunogénica en células tumorales, y particularmente piroptosis, contribuyendo al ambiente proinflamatorio mencionado más arriba. Asimismo, determinamos que la caspasa-1 es indispensable para el efecto antitumoral de LVR01. Por su parte, evaluamos la relevancia de otras moléculas de LVR01 que podrían contribuir a la activación del inflamasoma como PrgJ, SipB e InvG, determinando que la contribución individual de las mismas es limitada y la falta de una se ve aunque sea parcialmente compensada por las otras. Finalmente, hemos descrito por primera vez un nuevo mecanismo inmune inducido por *Salmonella* que actuaría efectivamente eliminándola, que es la liberación de trampas extracelulares de macrófagos. Si bien el análisis de su relevancia en el contexto del cáncer excede los límites de este trabajo, entendemos que es un primer paso de suma importancia que cabe profundizar en el futuro cercano.

En suma, entendemos que hemos abordado distintos aspectos que hacen al efecto antitumoral de *Salmonella* LVR01 y que estos conocimientos permitirán avanzar hacia el uso racional de estas inmunoterapias como complemento de las terapias actuales en un futuro próximo.

3.Introducción

Melanoma

Dentro de todos los tipos de cáncer de piel, el melanoma es el tipo de tumor más agresivo y aunque no tiene tanta incidencia como otras variantes (ej. carcinomas), es el más mortal, dada su habilidad de diseminarse rápidamente a otros órganos [1, 2]. En términos generales, el perfil epidemiológico del cáncer en Uruguay se parece al exhibido por países desarrollados, con algunas excepciones, y de hecho Uruguay integra un conjunto de 48 países en los cuales esta enfermedad ya es la primera causa de muerte prematura (Figura 3.1) [3]. Particularmente el melanoma ha mostrado en Uruguay y el mundo ascensos significativos tanto en su incidencia como en su tasa de mortalidad [4].

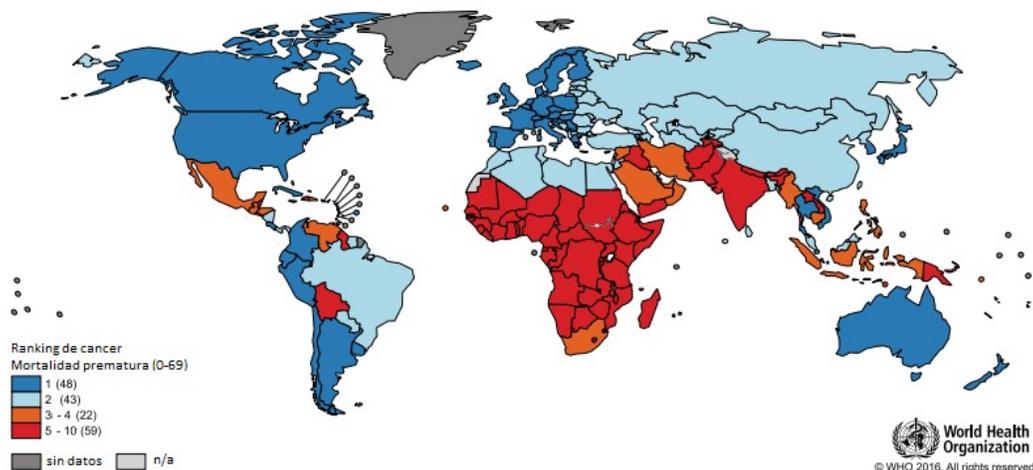


Figura 3.1. Mapa global que presenta la clasificación nacional del cáncer como causa de muerte en edades inferiores a 70 años en el año 2015. El número de países dentro de cada grupo de clasificación están incluidos en la leyenda. Fuente: Organización Mundial de la Salud.

Imagen extraída y modificada de Bray *et al.* 2018 [3].

Terapéutica

El tratamiento estándar consiste desde hace mucho tiempo en la remoción del tumor localizado mediante cirugía, siendo este acercamiento inefectivo cuando la enfermedad ya ha diseminado. Asimismo, las células metastásicas remanentes (en caso de que se escinda el tumor primario) exhiben extrema resistencia a otros tipos de tratamiento [1]. Cuando la cirugía está contraindicada para el melanoma *in situ*, abordajes “convencionales” no

quirúrgicos como el uso de quimioterapia o radioterapia, o imiquimod son aceptados [5]. Históricamente se asumió que el mecanismo de acción de estas terapias convencionales era a través de la generación de efectos citotóxicos directos sobre las células tumorales, pero actualmente se sabe que tienen otros efectos, como la inducción de muerte celular inmunogénica (ICD). La ICD impulsa la inmunidad adaptativa y el establecimiento de la memoria inmunológica a largo plazo, inclinando el equilibrio cáncer-inmunidad hacia la inmunidad antitumoral. Esto se logra a través de la liberación de patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) que actúan como señales adyuvantes para impulsar y potenciar la presentación de antígenos tumorales en un contexto activo de la inmunidad [6].

Las pautas para el tratamiento de enfermedad diseminada han experimentado muchísimos avances en los últimos tiempos y son actualizadas periódicamente, e involucran tanto el uso de inhibidores de BRAF (vemurafenib, dabrafenib) y MEK (trametinib, cobimetinib) así como bloqueo de puntos de control (anticuerpos monoclonales anti CTLA4 -ipilimumab-, PD1 -pembrolizumab, nivolumab-, PDL1 -atezolizumab, avelumab, durvalumab-). A pesar de su efectividad, estas terapias presentan un alto costo y muchas veces vienen acompañadas de toxicidad y reacciones autoinmunes (revisado en [7]). Hace menos tiempo aún, la FDA aprobó el uso del primer agente vivo contra melanoma, un herpesvirus oncolítico genéticamente modificado (talimogene laherparepvec). Las inyecciones periódicas de este agente mostraron ser efectivas en la reducción del tamaño de las lesiones sin inducir grandes efectos secundarios.

Uso de bacterias como inmunoterapia

Otras alternativas aún en fase de investigación involucran el uso de bacterias para el tratamiento de melanoma, solas o en combinación con otras terapias. A mediados del siglo XIX algunas bacterias y sus productos fueron utilizados como agentes terapéuticos para tratar tumores sólidos. El cirujano William Coley observó la regresión de tumores en pacientes que cursaban infecciones bacterianas y como consecuencia desarrolló una modalidad de tratamiento basada en extractos bacterianos. La denominada "toxina de Coley", un preparado de *S. pyogenes* y *S. marcescens* inducía estados febriles que estimularían la eliminación de las células tumorales por el propio sistema inmune del paciente [8, 9]. Si bien esta modalidad terapéutica luego cayó en desuso, más de un siglo más tarde, en 2012, se concluyó un fase 1 en el que se evaluó la administración subcutánea de la toxina de Coley y su consecuente inducción de fiebre. La misma vino acompañada del aumento de citoquinas proinflamatorias en suero (IL-6, TNF- α , IFN- γ e IL1- β) e incluso se registró un caso de remisión parcial de cáncer de vejiga metastásico [10]. Actualmente el

único tratamiento contra el cáncer basado en el uso de bacterias fue aprobado por la FDA hace casi 50 años para el tratamiento del cáncer de vejiga invasivo superficial, y consiste en instilaciones intravesicales de un preparado concentrado de la cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* que se utiliza regularmente para inmunizaciones contra tuberculosis (BCG), mostrando una efectividad de más del 70% [11, 12]. Respecto a melanoma, se ha evaluado en ensayos clínicos el uso de BCG en combinación con inmunoterapias u otros tratamientos. En el caso particular de ipilimumab el ensayo fue terminado prematuramente debido al desarrollo de reacciones adversas de alto grado asociadas al uso de ipilimumab como monoterapia (puntualmente, desarrollo de auto-anticuerpos) (ClinicalTrials.gov identifier: NCT01838200). Sin embargo, debido al número pequeño de participantes reclutados, los resultados carecen de significancia estadística y por lo que aún son necesarios ensayos más esclarecedores. De todas formas, se ha revisado los resultados de distintos ensayos clínicos que utilizan tratamiento con BCG en diferentes estadios de melanoma con resultados un tanto alentadores [13]. Los mecanismos de acción propuestos para su uso como terapia adyuvante son la liberación de citoquinas, activación y reclutamiento de células inmunes, regulación de moléculas de adhesión y polarización del microambiente tumoral (revisado en [14]).

Otra aproximación diferente pero que también involucra el uso de bacterias es el trasplante de microbiota fecal (FMT). El mismo se ha evaluado en combinación con el tratamiento estándar para melanoma avanzado (ClinicalTrials.gov identifier: NCT03772899) o FMT de donantes respondedores a receptores no respondedores frente a inmunoterapia (ClinicalTrials.gov identifier: NCT03353402) pero ambos ensayos aún se encuentran en etapa de reclutamiento para un fase 1.

Respecto a *Salmonella* puntualmente, el único ensayo clínico en el que se evaluó su uso en el contexto de melanoma fue realizado por Toso y colaboradores en 2002 [15]. En el mismo se evaluó la toxicidad, replicación selectiva en tumores y efecto antitumoral de la cepa de *Salmonella* Typhimurium atenuada VNP20009. Si bien se alcanzó niveles elevados de IL-6, IL-12, TNF- α e IL1- β en suero e incluso colonización tumoral en algunos casos, ningún paciente experimentó regresión tumoral objetiva.

Sistema inmune: PRRs y PAMPs

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa ante células infectadas o transformadas, iniciando el proceso de eliminación de las mismas -así como los agentes causantes en el primer caso- y reparación de tejidos. Para esto, cuenta con un amplio repertorio de receptores de reconocimiento (PRRs) que detectan diferentes patrones moleculares asociados a patógenos o a daño (PAMPs y DAMPs, respectivamente) e inician

Bacterias como *Salmonella* pueden estimular la activación de distintos receptores TLR de la membrana de células del hospedero a través de sus distintos PAMPs, siendo los más relevantes en el contexto de la infección el LPS constituyente de la membrana y la flagelina, proteína estructural del flagelo [19, 20]. Estos son reconocidos por los TLR4 y 5, respectivamente, llevando a una cascada de activación mediada por la transducción de señales del adaptador Myd88 [21]. Esto culminará en la producción de distintas citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y otras moléculas co-estimuladoras a través de la vía del factor nuclear NF- κ B cuya finalidad será controlar la infección del patógeno en particular que desencadenó la respuesta en primera instancia [22].

Inflamasomas

A diferencia de los TLR, que son transmembrana, los NLR son receptores citosólicos que desencadenan una cascada de señalización que se superpone parcialmente con la de los TLR pero adicionalmente terminará en la activación del complejo del inflamasoma, descrito por primera vez hace dos décadas por Martinon y colaboradores [23]. Si bien su estructura es variable, el andamiaje básico de los mismos consiste en un dominio que actúa como sensor y que en general es del tipo NLR o PYHIN, una proteína adaptadora ASC, que puede o no estar presente, y caspasa-1, que actúa como proteasa efectora [24]. La activación de estos complejos macromoleculares, inducida por una gran variedad de estímulos (revisado en [25]), desencadena el autoclivaje de procaspasa-1 inducido por proximidad, que lleva al clivaje de los precursores pro-IL1 β y pro-IL18 a sus formas maduras, así como el de gasdermina D (GSDMD), que forma poros en la membrana celular llevando un tipo de muerte celular programada inflamatoria llamada piroptosis (Figura 3.3) [26-28]. Recientemente se le han atribuido funciones adicionales a la GSDMD. Una de ellas es formar los poros que facilitan la rápida secreción de citoquinas inflamatorias de la familia de la IL1, ya que las mismas carecen de señal de secreción para su liberación [29]. De hecho, se ha planteado que la abundancia de estos poros, que a su vez depende de la naturaleza del estímulo [30], puede determinar que las células viables secreten citoquinas y luego la membrana se autorepare o si se sobrepasa determinado umbral, se entre en piroptosis y la célula muera [31, 32]. Por su parte GSDMD también tiene funciones antibacterianas, tanto directa como indirectamente. Por un lado, puede disrumpir la envoltura nuclear en etapas tempranas de la NETosis para que la cromatina se asocie con los gránulos citoplasmáticos y posteriormente en etapas más tardías generar los poros necesarios para que se liberen las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) que atrapen y maten patógenos extracelulares [33]. Por otro lado, incluso puede formar poros directamente sobre la membrana bacteriana al unirse con fosfolípidos de la misma [34].

Nueva evidencia también expande las funciones del complejo del inflamasoma. Luego de la activación y la subsecuente muerte de macrófagos por piroptosis, inflamasomas funcionales (evidenciados por la presencia de "ASC specks") se acumulan en el ambiente extracelular, ejerciendo sus funciones habituales de clivaje de pro-IL1 β fuera de las células. Asimismo, macrófagos viables fagocitan estos complejos, lo que lleva a daño lisosomal y activación del inflamasoma de estos fagocitos, resultando en la amplificación de la respuesta inflamatoria. Adicionalmente, otra forma de propagación de la respuesta está causada directamente por la acumulación de ASC, que presentaría características prionoides en medida que los ASC specks extracelulares, altamente resistentes a proteasas, inducirían la oligomerización de ASC dentro de las células [35, 36]. Por todo lo anteriormente expuesto, las nociones más actuales al respecto indican que la activación de caspasa-1 tiene una variedad de resultados posibles, que se esquematizan en la Figura 3.4. Esto es particularmente importante en el entendido en que la piroptosis no es necesariamente beneficiosa, por ejemplo, matar las células prematuramente interrumpiría la producción de citoquinas necesaria para atraer células inmunes que pudieran contener una infección. Esta dualidad ha sido ampliamente revisada por otros autores [37] y abordarla no es el objetivo de este trabajo por lo que para nuestros fines, nos enfocaremos con los efectos beneficiosos de la piroptosis inducida por *Salmonella* en el contexto de las inmunoterapias contra el cáncer.

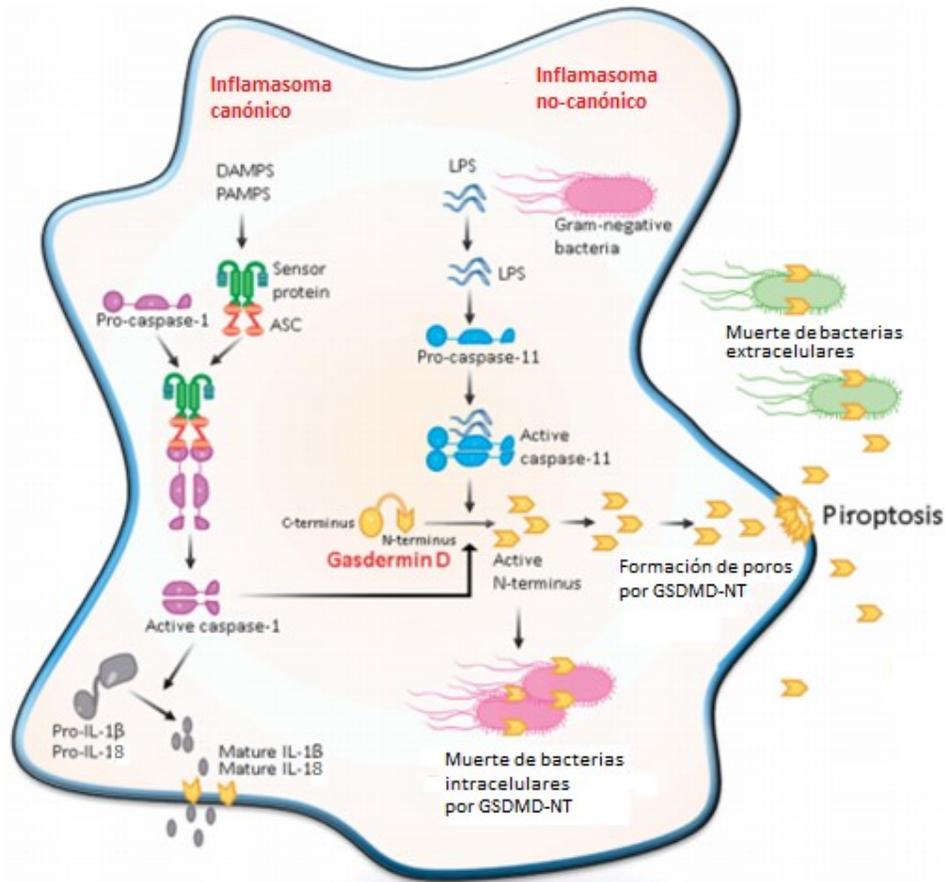


Figura 3.3. Vías canónica y no-canónica de activación del inflamasoma. La vía canónica del inflamasoma es activada por diferentes receptores citosólicos que reconocen múltiples patógenos y agentes inflamatorios. De esta forma se reclutan monómeros de procaspasa-1 a través de la proteína adaptadora ASC y activan la caspasa-1 por dimerización. La vía no-canónica es desencadenada por moléculas de lipopolisacárido bacteriano (LPS) en el citoplasma de las células infectadas. La unión directa de LPS a la procaspasa-11 causa su dimerización y subsecuente activación. Esta a su vez recluta procaspasa-1 de la forma descrita anteriormente. Activada por cualquiera de las dos vías, finalmente la caspasa-1 procesa las citoquinas proinflamatorias pro-IL1 β y pro-IL18 para generar IL1 β e IL18 maduras, respectivamente. La caspasa-1 también puede iniciar la piroptosis al escindir la gasdermina D, cuyo fragmento N-terminal formará poros en la membrana. Asimismo estos fragmentos, a través de su afinidad por la cardiolipina y la fosfatidilserina, también pueden atacar y matar las bacterias intracelulares. Imagen extraída y modificada de Qiu *et al* 2017 [38].

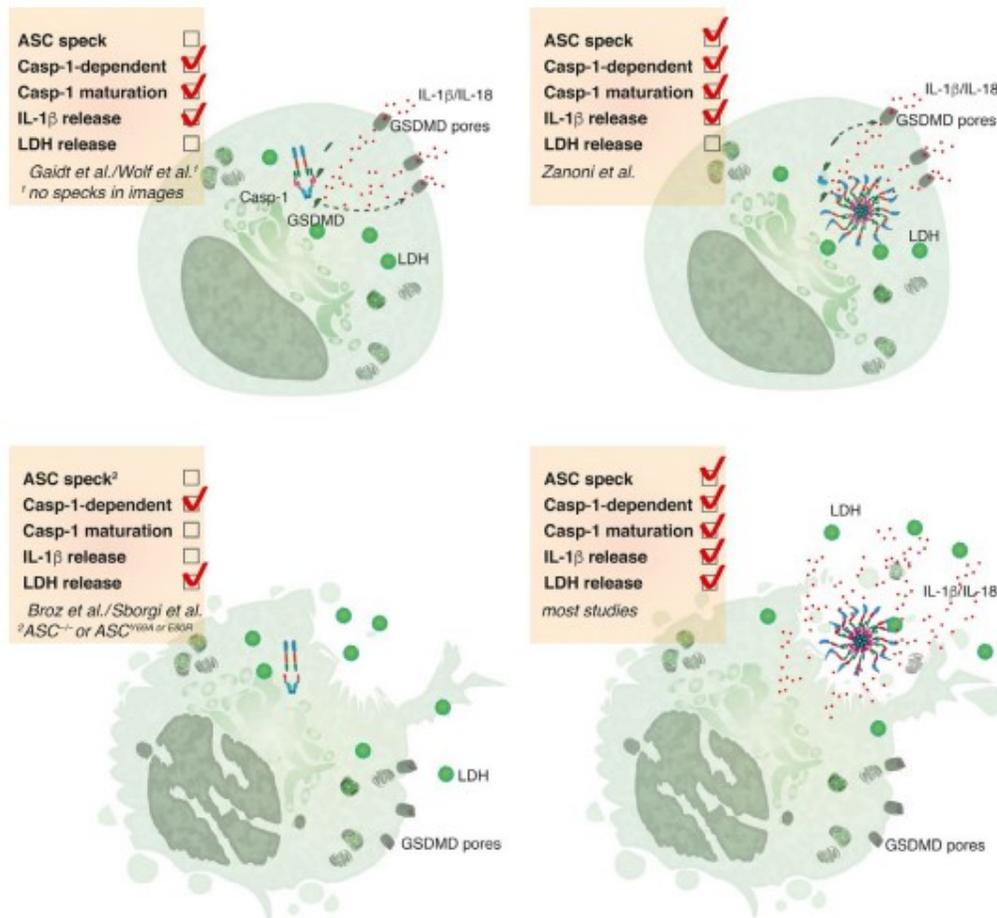


Figura 3.4. Diferentes resultados de la activación de caspasa-1. La activación del inflammasoma en respuesta a varios estímulos nuclea ASC e induce la maduración de caspasa-1 que puede causar piroptosis dependiente de GSDM-D así como la maduración y liberación de IL1β e IL18 (abajo, derecha). Sin embargo, en algunos tipos celulares y fondos genéticos se puede desencadenar solo piroptosis en ausencia de ASC specks (abajo, izquierda), o solo liberación de citoquinas en ausencia (arriba, izquierda) o presencia (arriba, derecha) de ASC specks. Extraído de Franklin *et al*, 2017 [39].

Como se mencionó más arriba, dentro de la amplia variedad de estímulos activadores del inflamasoma, se encuentra la bacteria patógena *Salmonella*, que posee varios PAMPs capaces de unir a distintos receptores [40]. De esta manera, ella sola es capaz de proveer los dos estímulos necesarios: el de priming, provisto por LPS u otros PAMPs sentidos extracelularmente por los TLR, y luego el de activación, sentido a nivel intracelular por NLRP3 como se describirá a continuación (Figura 3.5).

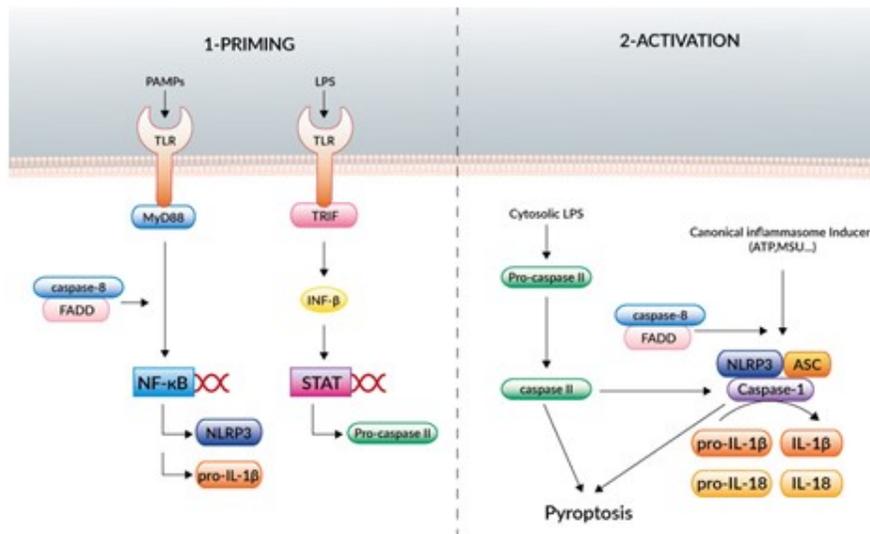


Figura 3.5. Secuencia de dos señales necesaria para la activación del inflamasoma. Para evitar una respuesta inflamatoria excesiva, la activación del inflamasoma NLRP3 está estrictamente regulada y requiere un proceso de dos pasos. El primer paso es la regulación al alza de NLRP3 y pro-IL-1β, que es inducida por la detección de PAMP extracelulares por receptores de reconocimiento de patrones (PRR), como LPS por receptor tipo Toll (TLR) 4. El segundo paso es el ensamblaje del inflamasoma provocado por la detección de PAMPs/DAMPs intracelulares. Imagen extraída y modificada de <https://www.invivogen.com/review-inflammasome-inducers>.

Inflamasomas y *Salmonella*

El inflamasoma NLRC4 presenta algunas particularidades respecto a otros inflamasomas, y una de ellas es que el oligómero central del mismo está formado por dos miembros de la familia NLR: NLRC4 propiamente dicho y NAIP. La especificidad del complejo está dada por este último, que interactúa directamente con el ligando bacteriano inyectado en la célula hospedera mediante el sistema de secreción del tipo 3 (SST3, se describirá más adelante). Este inflamasoma responde a flagelina, sensada por NAIP5 y NAIP6, mientras

que otros componentes del inyectosoma como PrgJ o la proteína de la aguja son reconocidos por NAIP2 y NAIP1, respectivamente. Una vez que NAIP se une a su ligando específico, se une a NLRC4 y comienza la formación del complejo [41, 42]. Cabe destacar que lo anterior se ha descrito para ratones, ya que en humanos ha sido caracterizado un único NAIP que es capaz de reconocer todos estos patrones [43].

Por su parte NLRP3 responde a *Salmonella* mediante una señal aún no identificada, independiente del SST3 (Figura 3.6a y 3.6b). Dada la amplia diversidad en la naturaleza de los activadores de este receptor es poco probable que NLRP3 los reconozca directamente, por lo que el consenso es que se sienten señales celulares inducidas por estos activadores [44], como por ejemplo el flujo de iones [45]. El sistema de doble señal mencionado anteriormente facilita la rápida respuesta ya que NLRP3 se expresa en cantidades limitadas en condiciones basales pero solo frente a la segunda señal se ensambla y activa el complejo, lo que evita inflamación desmedida que podría generar consecuencias fatales para el huésped [24, 25]. Además de la vía canónica de activación, NLRP3 también puede ser activado de forma no canónica, mediante la unión directa entre LPS citosólico y caspasa-11 a nivel intracelular que lleva al clivaje de GSDMD (Figura 3.3) [32].

Aunque ambos inflamasomas presentan algunas diferencias, recientemente se ha reportado la formación mixta de un único inflamasoma que contiene ambos receptores, inducida en macrófagos por infección con *S. Typhimurium* [46]. Por otra parte, 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 [47]. Una tercera vía de activación por *Salmonella* fue posteriormente descrita en células epiteliales, en la cual el factor de virulencia SopE sería el inductor de la activación de caspasa-1 (Figura 3.6c) 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 [48]. 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 cualquiera de las mutaciones eran tan susceptibles a la infección como los salvajes, mientras que los ratones doble mutantes demostraron ser más susceptibles, al mismo nivel que los deficientes en caspasa-1 [49].

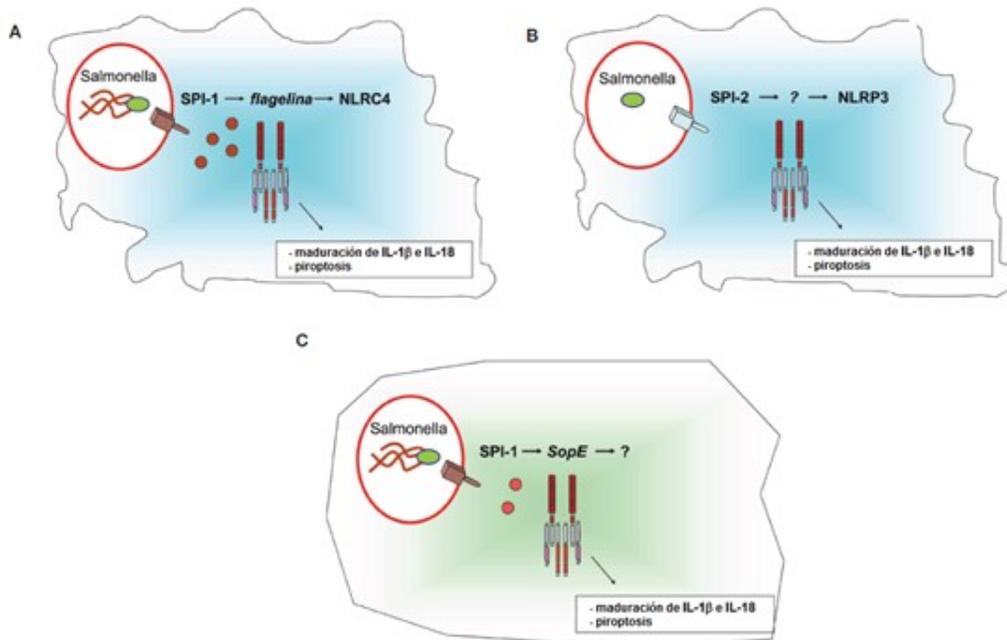


Figura 3.6. Representación esquemática de las vías de activación de caspasa-1 en células infectadas por *Salmonella*. A y B son macrófagos, C células de origen no hematopoyético. Imagen extraída y modificada de Franchi *et al* 2011 [50].

Además de las vías anteriormente descritas, una extensiva búsqueda bibliográfica reveló que distintas moléculas presentes en bacterias del género *Salmonella* podrían tener la capacidad de activar el inflamasoma y sorprendentemente, todas están relacionadas con los sistemas de secreción de tipo SST3. Estos complejos multiproteicos son empleados por muchas bacterias Gram negativas para inyectar proteínas efectoras dentro de células eucariotas, modulando las funciones celulares y promoviendo así su propia supervivencia y colonización [51, 52]. Particularmente las bacterias del género *Salmonella* poseen dos SST3 diferentes, codificados en dos islas de patogenicidad (SPIs por su sigla en inglés) que actúan secuencialmente en diferentes momentos de la infección [53]. El SST3 codificado en SPI-1 funciona durante el contacto inicial entre la bacteria y la célula eucariota, translocando efectores que generarán modificaciones en el citoesqueleto celular y llevarán a su internalización (por células no fagocíticas). El SST3 codificado en SPI-2, en cambio, actúa una vez que la bacteria se encuentra dentro del fagosoma, y es esencial para la supervivencia y replicación bacteriana dentro de la célula. Respecto a su papel en la activación del inflamasoma, se ha determinado la esencialidad de un SST3 funcional para la activación de caspasa-1 mediada por *Salmonella* [54]. De todas las proteínas que conforman el SST3, algunas estructurales y otras efectoras han sido descritas por

diferentes investigadores como posibles activadoras del inflammasoma y se reseñarán brevemente a continuación (ver Figura 3.7).

PrgJ es una proteína estructural que forma parte del aparato de secreción del SST3 y es homóloga a la flagelina en el extremo C-terminal, por lo que también es reconocida por NLRC4. Por su parte, InvG también es una proteína estructural, y debido a que forma el complejo de aguja también se la denomina “secretina”. Si bien hasta la fecha no se sabe cómo desencadena la activación de caspasa-1, se postula que al ser estructural podría favorecer el ingreso de efectores como SipB [55]. SipB y SopE son proteínas efectoras secretadas por el SST3-SPI-1. Particularmente, SipB es inyectada durante la fase de invasión celular e induce apoptosis de macrófagos cuando se une y activa caspasa-1, resultando en la liberación de IL1beta activa [56]. A pesar de ello, el grupo de Hoffmann no logró activar caspasa-1 mediante transfección con SipB [48]. Por otra parte SipB también es capaz de generar muerte celular de forma independiente de caspasa-1, conllevando a la disrupción de la mitocondria y la inducción de autofagia [57]. Ambos procesos se dan a diferentes tiempos, ocurriendo el primero en menos de una hora mientras que el segundo llevaría aproximadamente 5 horas [47]. Además de su función efectora directa, SipB también es requerida para la translocación de otros efectores. Finalmente, SopE es un activador de Rho GTPasas que induce rearrreglos en el citoesqueleto de actina y estimula el “ruffling” de la membrana, promoviendo el ingreso de la bacteria a células no fagocíticas [58]. En su conjunto, se encontró que la disrupción de SipB o de InvG suprime completamente la activación de caspasa-1, incluso en presencia de FliC y SopE, postulándose así que estas proteínas pueden ser responsables del estímulo inicial de activación de caspasa-1, mientras que FliC y SopE son responsables de potenciar esta activación [55].

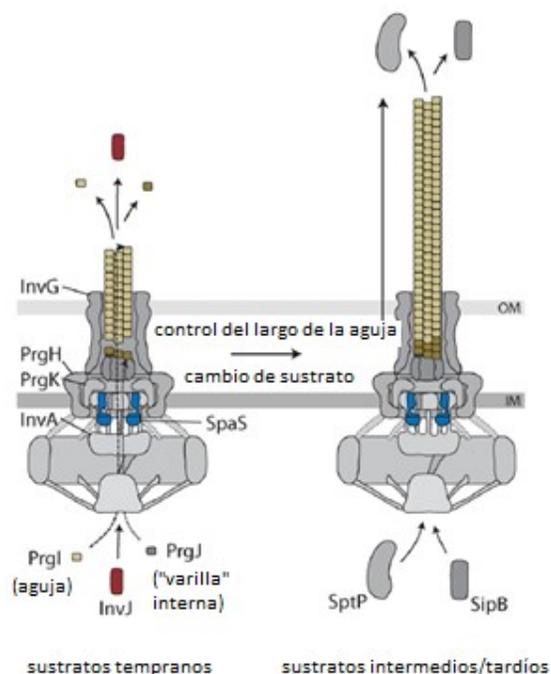


Figura 3.7. Modelo del complejo de aguja de SST3. Se destacan los componentes involucrados en el control de la longitud de la aguja y el cambio de especificidad del sustrato. El montaje de la aguja y la “varilla” interna se ve facilitado por la secreción temprana de los sustratos PrgI, PrgJ e InvJ. Luego de que la aguja alcanza una longitud suficiente, el sistema cambia la especificidad del sustrato a la secreción de sustratos intermedios (por ejemplo, SipB) y sustratos tardíos (por ejemplo, SptP). La evidencia sugiere que las proteínas InvJ (mostradas en rojo) y las proteínas SpaS (mostradas en azul) están involucradas en estos procesos. Imagen extraída y modificada de Monjarás Feria *et al.* 2015 [51].

La Tríada: Cáncer, Inflamasomas y *Salmonella*

Existe un fuerte vínculo entre inflamación y cáncer, siendo IL1 β -y por lo tanto, el inflamasoma- de los principales actores involucrados en ambos procesos [59]. Dada la pleiotropia de las citoquinas que se producen frente a estas situaciones, no es evidente si son beneficiosas o perjudiciales, tornándose necesario el análisis del papel de las mismas en cada situación particular. Hasta la fecha, los únicos reportes sobre la activación del inflamasoma inducida por una inmunoterapia contra cáncer basada en el uso de *Salmonella* fueron publicados por un mismo grupo de investigación en 2015 [60, 61], poco después del comienzo de esta línea de investigación. En estos trabajos, la administración intravenosa de *Salmonella* Typhimurium atenuada llevó a la reducción del tamaño tumoral de ratones portadores de carcinoma de colon. A nivel de tumor y ganglio drenante se determinó un reclutamiento aumentado de macrófagos y dendríticas así como un aumento significativo de la expresión y producción de TNF α , IL1 β e IL18 a nivel intratumoral.

Asimismo, *Salmonella* indujo *in vitro* la expresión de varias proteínas relativas al inflammasoma en macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) infectados.

Este trabajo de tesis se abocó a la evaluación de una aproximación inmunoterapéutica basada en el uso de *Salmonella* sobre ratones portadores de melanoma. Esto está apoyado en las muchas ventajas de *Salmonella* como inmunoterapia contra el cáncer, que han sido revisadas ampliamente, tanto por nuestro grupo de investigación como por otros [62, 63].

Entre ellas se destacan:

- Es un bacilo anaerobio facultativo móvil, lo que le permite dirigirse y replicar tanto en zonas hipóxicas y necróticas de grandes tumores -generalmente refractarias a terapias estándar [64]- como en áreas oxigenadas de tumores más pequeños o metástasis. Además no es exigente desde el punto de vista nutricional, y presenta bajo costo y fácil manejo en el laboratorio [62].

- Es fácilmente modificable, tanto para generar atenuación como para utilizarla como vector para expresión de antígenos, ya que la cepa de referencia LT2 fue secuenciada en 2001 y se conoce su genoma completo [65]. Esto hace que pueda presentar patogenicidad limitada en individuos inmunocompetentes y a su vez es fácilmente controlada con antibióticos. Asimismo, múltiples mutaciones se han llevado a cabo para mejorar su perfil de seguridad, con aproximaciones novedosas como la atenuación condicional en el LPS (inducible, de forma de no sobre-atenuar, lo que llevaría a la disminución de la efectividad) [66, 67]. Cabe destacar también en este punto que recientemente se ha descrito que la inactivación en el gen *aroA*, clásicamente utilizada para atenuar cepas que se utilizarán como vectores vacunales, no solo genera la atenuación esperada sino que también aumenta la inmunogenicidad, subrayando su buen potencial como terapia anti-tumoral [68].

- Puede acumular y replicar preferentemente en el microambiente tumoral [69, 70]. También en este caso se han diseñado estrategias novedosas para maximizar la acumulación. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión del regulador maestro de movilidad *flhDC* aumenta la acumulación intracelular y la colonización tumoral hasta 5 veces respecto a la cepa control [71].

- Posee actividad antitumoral intrínseca, dependiente de la cepa y el modelo experimental [72-74].

Desde el punto de vista inmunológico, *Salmonella* subvierte el estado de inmunosupresión del microambiente tumoral regulando a la baja factores inmunosupresores como arginasa-1, IL-4 y TGF- β , y potenciando la expresión de la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) e IFN- γ . Esto induce reclutamiento de neutrófilos, macrófagos, linfocitos T citotóxicos y células NK activadas, induciéndose la muerte celular por distintas vías [75].

Asimismo mediante la muerte y liberación de antígenos tumorales se genera una especie de retroalimentación positiva, donde células presentadoras de antígeno pueden captarlos y presentarlos a linfocitos T vírgenes, generándose así una respuesta T específica de tumor [76, 77]. Por otra parte, *Salmonella* disminuye la agresividad del tumor mediante la inhibición de la angiogénesis y el retraso de la actividad metastásica, hechos que se encuentran conectados dado que la generación de nuevos vasos no solo permite que el tumor crezca sino que también provee de una ruta para la diseminación y establecimiento de metástasis lejanas [78]. La regulación de la angiogénesis se orchestra a través del factor angiogénico VEGF, que es inducido en condiciones de hipoxia por la activación del factor de transcripción HIF-1 α . Hace poco se ha demostrado que *Salmonella* induce la disminución de la expresión de HIF-1 α y por lo tanto disminuye la expresión de VEGF en células de melanoma B16F10. Como resultado, animales portadores de tumor inoculados con *Salmonella* intraperitoneal mostraron una densidad vascular reducida luego de dos semanas del tratamiento [79]. Todos estos mecanismos se esquematizan brevemente en la Figura 3.8.

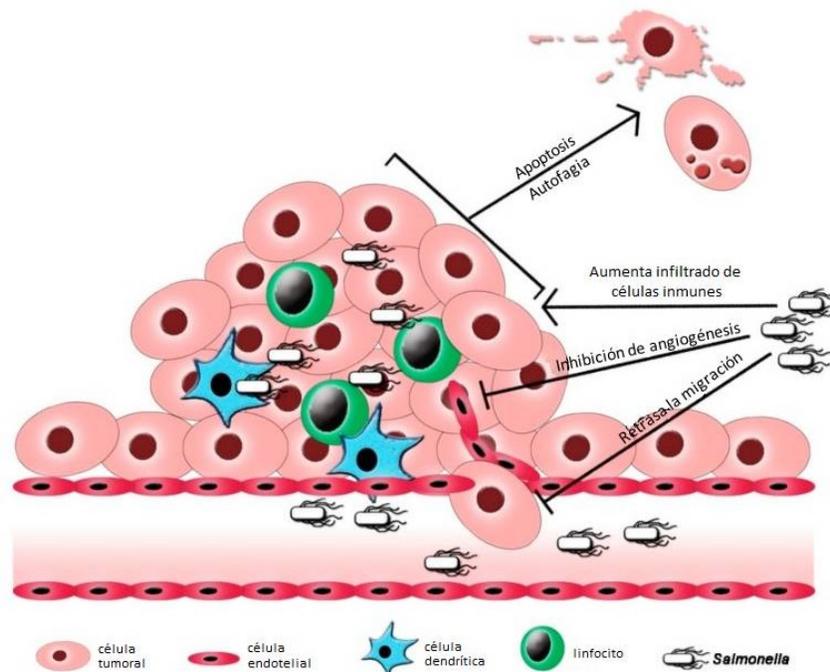


Figura 3.8. Inmunoterapia tumoral mediada por *Salmonella*. *Salmonella* desencadena el infiltrado de células inmunes en el tejido tumoral y provoca la autodestrucción de células tumorales mientras previene la microvascularización del tumor y retrasa la migración de las células tumorales. Imagen extraída y modificada de Pangilinan *et al.* 2019 [63].

En lo que respecta al grupo de trabajo en el que se enmarca esta tesis, también hemos generado abundantes antecedentes que se mencionan brevemente a continuación. Hace ya más de una década comenzamos la evaluación el uso de *Salmonella* como inmunoterapia en el contexto de melanoma. Inicialmente testamos su administración oral, encontrando que no generaba mejoras significativa en la sobrevida, a menos que estuviera modificada genéticamente para producir citoquinas como IL4 o IL18 [80]. Posteriormente la utilizamos vía intratumoral, caso en el cual sí prolongó significativamente la sobrevida de los animales sin necesidad de ninguna modificación adicional, aunque encontramos que junto con otras terapias como el imiquimod, agonista del TLR7, sus efectos se potenciaban [81]. Hemos puesto a punto un modelo animal de baja carga tumoral para melanoma mediante cirugía para la escisión del tumor primario, generando así contextos semejantes a los que nos enfrentaríamos a nivel clínico. De esa forma corroboramos en ese escenario el potencial de *Salmonella* LVR01 como inmunoterapia anti-tumoral, observando un retraso en el crecimiento tumoral y una extensión de la sobrevida libre de enfermedad y global de los animales tratados. Asimismo, hemos demostrado que el imiquimod (agente utilizado cuando el abordaje quirúrgico para melanoma *in situ* está contraindicado) también sería efectivo -al menos en combinación con *Salmonella*- para el control de metástasis distantes, ampliando su potencialidad terapéutica a otros contextos mas desfavorables [81]. Hemos evaluado favorablemente otras terapias combinacionales, como la utilización conjunta de *Salmonella* como inmunoterapia y quimioterápicos como la dacarbazina, con muy buenos resultados (Chilibroste *et al* 2021, submitido, ver Anexo 1). A nivel molecular, encontramos que *Salmonella* induce la producción de citoquinas y quimioquinas con perfil tipo Th1 en el microambiente tumoral así como IgG específicas contra B16F1 en suero, lo que finalmente repercute en una disminución de la ocurrencia, cantidad y tamaño de metástasis comparando el grupo control con el grupo tratado [81, 82]. En forma paralela, en el contexto de mi Tesis de Maestría comenzamos a profundizar en las bases que subyacen el potencial anti-tumoral de *Salmonella*, encontrando que la respuesta inmune montada reside en el aumento en el infiltrado de neutrófilos inducido por quimioquinas como CXCL1, CXCL2 y otras citoquinas, que a su vez ejercerán mecanismos tumorocidas. Particularmente logramos mediante un análisis multivariado de correspondencias establecer la expresión de IFN γ como un biomarcador asociado al tratamiento, que permite discriminar animales sin tratar de aquellos inoculados con *Salmonella* intratumoral. Factores resultantes de la activación del inflammasoma como IL1 β e IL18 también mostraron tener gran peso en ese análisis [83]. Por su parte, también contamos con antecedentes en otros modelos tumorales, principalmente en linfoma a células B. En ese contexto, también hemos demostrado que *Salmonella* LVR01 es efectiva

como inmunoterapia anti-tumoral sola [84] o en combinación con distintas aproximaciones como IL2 [85] o quimioterapia (CHOP: ciclofosfamida, doxorrubiina, vincristina y prednisona) [86].

Por todo lo anteriormente expuesto, entendemos que es necesario el estudio en profundidad de las bases celulares y moleculares que subyacen el efecto antitumoral de *Salmonella* en melanoma y a eso apuntamos con este trabajo. De esta manera esperamos aportar evidencia que lleve al diseño racional de nuevas inmunoterapias basadas en *Salmonella*, en un intento de acercarnos a una posible aplicación clínica.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Elucidar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la efectividad de *Salmonella* como inmunoterapia para melanoma.

4.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar las poblaciones celulares infiltrantes del tumor y evaluar la relevancia de las mismas, así como determinar moléculas y mecanismos involucrados en la actividad anti-tumoral inducida por *S. Typhimurium* LVR01 en modelo de melanoma subcutáneo.
2. Establecer el rol del inflamasoma en la respuesta anti-melanoma inducida por el tratamiento con *Salmonella* LVR01.
3. Generar cepas de *Salmonella* LVR01 carentes de moléculas activadoras del inflamasoma para evaluar su contribución individual al efecto antitumoral.

5. Materiales y métodos

5.1. Líneas celulares

Los ensayos *in vitro* fueron realizados sobre las líneas celulares murinas B16F1 (melanoma de baja capacidad metastásica) y J774A.1 (macrófagos), ambas provenientes de ATCC (American Type Culture Collection) o sobre macrófagos derivados de médula ósea, obtenidos como se describe en la siguiente sección. Para inducción de tumores *in vivo* se utilizó en todos los casos la línea celular B16F1, tal como se describe más adelante en la sección 5.15. Estas células fueron mantenidas en cultivo en medio DMEM High Glucose (PAA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (PAA) en el caso de B16F1 y (DMEMsup) y SFB inactivado por calor durante 30 minutos a 56°C en el caso de J774A.1.

5.2. Obtención de macrófagos derivados de médula ósea

Para la obtención de macrófagos derivados de médula ósea se sacrificaron por dislocación cervical dos ratones de la cepa salvaje y dos de la cepa caspasa 1/11 ko, de 5-6 semanas de edad. La disección y extracción del fémur y tibia se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Se extrajeron los huesos, eliminando restos de tejido muscular con bisturí, se limpiaron con alcohol 70% y se colocaron en una placa de Petri con DMEM. Los huesos fueron cortados en ambos extremos dejando expuesta la médula ósea. Posteriormente se inyectaron 5ml de DMEM, se recogieron las células en un tubo y se centrifugaron a 300 g durante 5 min a 20°C, descartándose el sobrenadante. Luego de lisar los glóbulos rojos durante 1 minuto en hielo con 1ml de buffer ACK (Ammonium Chloride Potassium), las células fueron lavadas y finalmente resuspendidas en 5 ml de DMEM. Se contaron en cámara de Neubauer con Trypan Blue y fueron resuspendidas a una concentración final de 5×10^5 células/ml en DMEM suplementado con 10% SFB y 20% de sobrenadante de cultivo de células L929 (línea celular que produce M-CSF, y por lo tanto, sesga la diferenciación de monocitos hacia macrófagos) junto con antibiótico-antimicótico 1x (mix de penicilina, streptomycin y anfotericina B, Sigma). Se cambió el medio de cultivo a los 4 y 7 días y finalmente se despegaron los macrófagos con PBS frío y en hielo para sus posteriores usos.

5.3. 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 1. Algunas de ellas fueron desarrolladas específicamente para este proyecto mediante el método de inactivación génica en un solo paso descrito por Datsenko [87]. La estrategia seleccionada se describirá a continuación, y consistió en sustituir los genes a inactivar por cassettes de resistencia a diferentes antibiótico de selección. Para este fin, se comenzó amplificando por PCR en tiempo final los cassettes de kanamicina (kan) o cloranfenicol (Cm) o Cm de los plásmidos pKD3 o pKD4 (Tabla 2), respectivamente, usando los cebadores P1 (forward) y P2 (reverse) reportados por los autores (Tabla 3). Luego se diseñaron cebadores específicos para cada gen que se deseaba anular fusionando la secuencia de los primers P1 y P2 a las regiones adyacentes a los genes a inactivar (Tabla 3), de modo de obtener por PCR el cassette de resistencia antibiótica fusionado a las regiones adyacentes al gen a inactivar. Estos amplicones “híbridos” fueron separados en geles de agarosa y la banda correspondiente al tamaño esperado fue recortada del gel y el ADN extraído con kit QIAEX II (Qiagen). Posteriormente este ADN se transformó en células electrocompetentes de LVR01 (previamente transformadas con el plásmido pKD46 -ver Tabla 2- que contiene la Red recombinasa del fago clonada bajo el control de un promotor inducible por arabinosa y cassette resistencia a ampicilina), la cual permite reemplazar el ADN híbrido por el gen que se desea anular mediante recombinación homóloga. Las colonias seleccionadas fueron aquellas que crecieron en presencia de cloranfenicol o kanamicina según correspondía, lo cual era indicativo de la presencia del cassette de resistencia y que a su vez no crecieron en LB + ampicilina ya que esto indica que perdieron el plásmido pKD46 (que una vez realizada la recombinación ya no interesa mantenerlo). Finalmente se verificó la sustitución de los genes a anular mediante distintas PCR.

Para el crecimiento de todas las cepas se utilizó el medio Luria Bertani (LB) y LB agar (LBA) suplementado cuando fue necesario con ampicilina (100µg/mL), kanamicina (100µg/mL) o cloranfenicol (25 µg/mL) (todos los reactivos de Sigma-Aldrich).

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

Nombre	Descripción	Referencia
LVR01	<i>S. Typhimurium</i> P228067 <i>aroC</i> -	[88]
LVR01flag-	<i>S. Typhimurium</i> LVR01 <i>fliC::kan^R/fljB::Cm^R</i>	[89]
LVR01-pKD46	<i>S. Typhimurium</i> LVR01 portando el plásmido pKD46, <i>Amp^R</i>	
prgJ-	<i>S. Typhimurium</i> LVR01 <i>prgJ::Cm^R</i>	Este trabajo
sipB-	<i>S. Typhimurium</i> LVR01 <i>sipB::kan^R</i>	Este trabajo
invG-	<i>S. Typhimurium</i> LVR01 <i>invG::Cm^R</i>	Este trabajo
LVR01-gfp-rpsM	<i>S. Typhimurium</i> LVR01 expresando GFP bajo el control del promotor de <i>rpsM</i> (expresión constitutiva)	[90]*

* La Dra. Isabelle Hautefort (Institute of Food Research, Norwich, United Kingdom) nos cedió gentilmente los lisados bacterianos a partir de los cuales la Dra. Lucía Veiga transdujo con fago P22 la cepa receptora (LVR01), generando las cepas de uso.

Tabla 2. Plásmidos utilizados para desarrollar las cepas mutantes mediante método de Datsenko [87]

Plásmido	Descripción (vector que contiene...)
pKD3	gen <i>cat</i> flanqueado por dos sitios FRT y secuencias P1 y P2, <i>Amp^R</i> , <i>Cm^R</i>
pKD4	gen <i>aph(3')</i> (amino O- fosfotransferasa) flanqueado por dos sitios FRT y secuencias P1 y P2, <i>Amp^R</i> , <i>Kan^R</i>
pKD46	genes del sistema Red de la recombinasa del fago lambda (γ , β y <i>exo</i>) bajo control del promotor de arabinosa <i>P_{araB}</i> . Replicón termosensible, <i>Amp^R</i>

Tabla 3. Cebadores utilizados para desarrollar las cepas mutantes mediante método de Datsenko [87]. Las secuencias de algunos de ellos fueron diseñadas específicamente para este trabajo mientras que otras fueron provistas por los autores.

Nombre	Secuencia	Ref
P1	5'-TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'	[87]
P2	5'-CATATGAATATCCTCCTTAGTTC-3'	[87]
prgJP1	5'TTGATGCTGCCATTATTCAGAACTTCCGTTAATCAGTTATAAGGTGG ATTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'	Este trabajo
prgJP2	5'CAGCCGGCAAGGGTCATTACCAGCAGAAAAGTATATAGATATCGACG AATCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC-3'	Este trabajo
sipBP1	5'CTAAAAACGGCGGAGACAGAGCAGCACAGTGAACAAGAAAAGGAAT AATTTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'	Este trabajo
sipBP2	5'ATTCCACATTACTAATTAACATATTTTTCTCCCTTATTTTGGCAG TTTATATGAATATCCTCCTTAGTTCC-3'	Este trabajo
invGP1	5'GCGTTTCGCGCGGAAATTATCAAATATTATTCAATTGGCAGACAAA TGATGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'	Este trabajo
invGP2	5'TGCCGGGACAATATTCTGAAAATGAAATACCGGAGGTTGAGCCAGG AATCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC-3'	Este trabajo
C1b	5'-CGATTTCAGGTTTCATCATGC-3'	[87]
C2	5'-GATCTTCCGTCACAGGTAGG-3'	[87]
prgIF	5'-GTAACGCGCAATCGAACAC-3'	Este trabajo
prgKR	5'-GCAAGGGTCATTACCAGCAG-3'	Este trabajo
sicAF	5'-GGCAAAAGCGTTGGTCTATC-3'	Este trabajo
sipCR	5'-GATTGCGAAGCTGTCTGTGA-3'	Este trabajo
invFF	5'-TCATCGCCTTCACATTTTTCT-3'	Este trabajo
invER	5'-CAGTATGCTGGGTGCATC-3'	Este trabajo

Para los casos en los que se utilizó la bacteria muerta por calor (LVR01hk), se calentó a 70°C un cultivo previamente cuantificado durante 10 minutos y luego se reservó a -20°C alícuotas para su uso posterior. Luego de utilizarse, un remanente se creció en LB a 37°C O/N con agitación para corroborar ausencia de crecimiento bacteriano (en términos de cambios en la turbidez del medio).

5.4. Curvas de crecimiento

Para estudiar la relación entre las modificaciones génicas y la cinética de crecimiento de LVR01 fue necesario realizar curvas de crecimiento. Para ello se realizaron diluciones 1/100 en LB a partir de cultivos O/N tanto de LVR01 como de las mutantes y se crecieron a 37°C con agitación (200 rpm). Cada una hora se midió la absorbancia a 600nm durante un período de 6 horas aproximadamente y se graficó la densidad óptica en función del tiempo. De forma de evaluar lo mismo en un contexto más relevante para los ensayos posteriores, se evaluó lo mismo en medio DMEM en lugar de LB.

5.5. Ensayos de invasión y replicación

Se incubaron 5×10^5 células B16F1 o J774A.1 en presencia de las distintas cepas de *Salmonella* en una relación bacteria:célula 100:1 durante 1 hora a 37° C en placas de 24 pocillos. Luego de la incubación se reemplazó el medio por medio suplementado con gentamicina (Sigma, 100 µg/mL) para eliminar las bacterias que no ingresaron a las células. Luego de 1, 4 o 24 horas se lavaron las células con PBS y se lisaron con Tritón-X100 0,1%. Finalmente se plaquearon diluciones adecuadas en medio LBA para recuento.

5.6. Evaluación de la capacidad de formación de biofilms

Para evaluar la capacidad de formar biofilms de las cepas mutantes respecto a la cepa parental se utilizó un protocolo previamente puesto a punto en nuestro laboratorio, específicamente para este género bacteriano. Brevemente, se creció las distintas cepas en LB a 37°C con agitación O/N. Posteriormente se realizó una dilución 1/100 del cultivo en medio SLB (LB sin cloruro de sodio) y se sembró 150 µL en cada pocillo de la microplaca por diez-plicado. Se incubó por 3 días a 20°C y posteriormente se descartó el líquido cuidadosamente, se enjuagó 3 veces con agua destilada y una vez seca la placa, se agregaron 200 µL de una solución del colorante cristal violeta al 1%. Se incubó durante 10 minutos a TA y luego de 3 nuevos enjuagues, queda el colorante tiñendo únicamente la biomasa adherida al pocillo. El mismo se disolvió utilizando 200µL de una solución de etanol:acetona (80:20) y luego de agitación durante 1 hora se midió absorbancia a 562nm con un lector de placas convencional. La clasificación de la capacidad de formación de biofilms se basó en lo reportado por Stepanovic *et al* 2000 [91]:

OD obtenida	Categoría
OD ≤ OD _c	No formador de biofilm
OD _c < OD ≤ (2xOD _c)	Débil formador de biofilm
(2xOD _c) < OD ≤ (4xOD _c)	Moderado formador de biofilm
(4xOD _c) < OD	Fuerte formador de biofilm

Siendo OD_c la OD promedio de la condición control (LB sin inóculo)

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

Para evaluar el efecto de la invasión de las distintas cepas de *Salmonella* sobre las líneas B16F1 y J774A.1 se determinó la viabilidad celular mediante ensayo con MTT. Para esto, se incubaron 1x10⁵ células B16F1 o J774A.1 en presencia de las distintas cepas de *Salmonella* en una relación bacteria:célula 100:1 durante 1 hora a 37^o C en placas de 96 pocillos de fondo plano. Posteriormente se reemplazó el medio por medio suplementado con gentamicina (100 µg/mL) para eliminar las bacterias que no ingresaron a las células y se incubó durante 24 horas en las mismas condiciones. Luego se sustituyó el medio nuevamente, esta vez por medio suplementado con ciprofloxacina (50 µg/ml) para eliminar las bacterias intracelulares capaces de procesar el MTT. Después de incubar durante 1 hora a 37^oC y 5% CO₂, se agregó 50 µL/pocillo de MTT (bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-y1)-2,5-difeniltetrazolio) (5 mg/ml) y se incubó en cámara oscura con papel aluminio durante 4 horas a 37^oC y 5% CO₂. Finalmente se agregó 50 µL/pocillo de SDS 20% (en agua miliQ) y se incubó nuevamente en cámara oscura por al menos 6 horas a temperatura ambiente para que se solubilicen los cristales de MTT-formazán. La lectura de la placa se realizó a 570nm a las 16 horas. Se definió el porcentaje de citotoxicidad como el porcentaje de células muertas luego de invasión con *Salmonella*, calculado como:

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

5.8. Evaluación de muerte celular inmunogénica

Para la determinación de la capacidad de *Salmonella* de inducir muerte celular inmunogénica (ICD) *in vitro* en células de melanoma, se evaluó la exposición en superficie de calreticulina y gasdermina-D (marcador de piroptosis, un tipo de ICD) mediante citometría de flujo. Brevemente, se incubaron las células con las bacterias tal como se describió más arriba en la sección 5.5 hasta el paso de la gentamicina. Luego se incubaron las células durante 20 horas, se reservó el sobrenadante a -80°C y por otra parte las células se lavaron, se marcaron con una dilución 1/150 de anticuerpos monoclonales anti-calreticulina en Alexa Fluor 647 y anti-gasdermina D purificado (ambos de Abcam). Para la determinación de gasdermina D fue necesario un paso adicional de incubación con un anticuerpo secundario anti-rabbit marcado en FITC (Thermo Fisher Scientific). Las células se analizaron mediante citometría de flujo (FACS Canto II, Becton Dickinson). Por otra parte, con los sobrenadantes reservados se evaluó la liberación extracelular de HMGB-1 utilizando el kit HMGB1 ELISA (IBL INTERNATIONAL), según instrucciones del fabricante. Como control positivo en todos los casos se utilizó doxorubicina $2,5\ \mu\text{M}$ (cedida gentilmente por la Dra. Sofia Grille).

5.9. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Para todos los ensayos de inmunofluorescencia se comenzó de la misma forma que los ensayos de invasión/replicación pero con una concentración menor de células (1×10^5) y poniendo antes un cubreobjetos estéril en cada pocillo. Luego de los tiempos estipulados para cada tipo de ensayo, las células fueron fijadas durante 30 minutos a 4°C con paraformaldehído (PFA) 4%. Previo al marcado se incubaron durante 20 minutos a TA con buffer de no permeabilización (BNP) (PBS $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ + BSA 2% + NH_4Cl 50 mM), luego se lavaron y se permeabilizaron durante 15 minutos a TA con buffer de permeabilización (BNP + Tritón100 0,3%). Para el marcado propiamente dicho se incubó durante 30 minutos a TA con una dilución 1/100 de un anticuerpo primario anti-*Salmonella* (Pro-Lab Diagnostics) y luego con el siguiente mix de secundarios, también diluídos 1/100: anti-rabbit + WGA Texas Red+ Hoescht 33342. En los casos que se usó LVR01-gfp-rpsM se omitió el paso del anticuerpo primario y el anti-rabbit secundario. Para montar en portaobjetos se utilizó una gota de ProLong™ Gold Antifade (ThermoFisher), se colocó el cubre con las células hacia abajo y se selló los bordes con esmalte de uñas. Las muestras se reservaron a -20°C y en el momento de su utilización se termostataron a TA unos minutos antes. Para la adquisición de videos en tiempo real se utilizaron placas de 27mm con fondo de vidrio (Thermo Scientific). En todos los casos se utilizó el microscopio

confocal Leica TCS LSI super-zoom del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) y el análisis se realizó con el software ImageJ/Fiji.

5.10. Cuantificación del proceso de METosis

Para cuantificar el ADN liberado por los macrófagos METóticos, se utilizó como base el ensayo de invasión-replicación explicitado anteriormente pero en placas de 96 pocillos compatibles con fluorescencia. Luego de la inducción de METs, ya sea con PMA (Sigma, 200 μ M) o LVR01 (MOI 40:1), en presencia o ausencia de pretratamiento con DNasa I (100U/ml), se transfirió los sobrenadantes a otra placa. Se completó los pocillos con medio TE 1x fresco y se agregó a ambas placas igual volumen de PicoGreen (Invitrogen, dilución 1/200), siguiendo instrucciones del fabricante. Luego de 10 minutos se determinó la fluorescencia en cada pocillo a longitud de onda de excitación/emisión de 485nm/520nm con un lector de placas automático (FLUOstar OPTIMA). Se comparó las lecturas contra una curva standard, realizada a partir de un extracto total de ADN de células J774A.1 obtenido con el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) cuya calidad y cantidad fue previamente chequeada mediante medidas espectrofotométricas a 260/280nm con un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

5.11. Evaluación de la citotoxicidad de METs sobre *Salmonella*

Para determinar la citotoxicidad ejercida por las METs sobre LVR01, se utilizó como base el ensayo de invasión-replicación explicitado anteriormente pero luego del tiempo de incubación de las bacterias con las células no se utilizó gentamicina, de manera de plaquear todas las bacterias que no fueron eliminadas por los diferentes mecanismos efectores de los macrófagos. Para diferenciar entre los procesos de fagocitosis y METosis se realizó pretratamiento de las células con citocalasina D (Sigma, 10 μ M) como inhibidor de fagocitosis o DNasaI (Sigma, 100U/ml) para degradar ADN extracelular, 30 minutos antes de la infección. Finalmente las células se lisaron y se plaquearon diluciones apropiadas para recuento.

5.12. Evaluación de la activación de caspasa-1

Para la evaluación de activación de caspasa-1 tanto *in vitro* (con las células infectadas en adherencia como se describe en la sección 5.5 hasta el paso de la gentamicina) como *in vivo* (con suspensiones celulares provenientes de homogenizados de tumores tratados) se utilizó el reactivo FLICA (Immunochemistry Technologies), ya sea en FITC o en APC según correspondiese. Se siguieron las instrucciones del fabricante, incubando las células con el reactivo durante 30 minutos a 4°C en oscuridad, y luego dejando difundir durante una

hora adicional la sonda que no se unió específicamente a la caspasa-1 activada. En caso de requerirse otras marcas, éstas se hicieron posteriormente, tal como se describe en la sección 5.17 ya que las temperaturas de incubación entre ambos tipos de marcaje no son compatibles. Finalmente las células se resuspendieron en el buffer para este fin provisto y se analizaron mediante citometría de flujo (FACS Canto II, Becton Dickinson).

5.13. Animales

Para todos los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones C57BL/6J (Dilave), caspasa1/11 knock out (ko) o nlrp3 ko (The Jackson Laboratory) y sus correspondientes littermate (C57BL/6NJ) (IPMont), todos de sexo femenino y 6-8 semanas de edad. Los mismos 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 así como los experimentadores involucrados en los mismos fueron aprobados previamente por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) y/o la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA).

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

En todos los casos se utilizó 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 en PBS. Luego de que los tumores se hicieron palpables (entre los días 10 y 11) los ratones se dividieron en tantos grupos como se deseara analizar para el ensayo en particular, con la consideración de que el volumen tumoral medio fuera lo más similar posible, y se les inyectó intratumoralmente (i.t.) una única dosis de 1×10^6 ufc de la cepa de *Salmonella* en cuestión en un volumen de 100 μ l. El grupo control fue inyectado 100 μ l de suero fisiológico. Se monitoreó periódicamente el tamaño tumoral, definido como largo x ancho x profundidad x $\pi/6$, así como la sobrevivencia de los ratones y se practicó eutanasia humanitaria en aquellos que alcanzaron volúmenes tumorales de 4000mm³.

5.15. Depleción de macrófagos y células NK

Con la finalidad de depletar los macrófagos se implementó un protocolo de inyecciones intraperitoneales conteniendo liposomas de clodronato (Clophosome®-Clodronate Liposomes (Neutral), FormuMax Liposome Reagents), utilizando como base las sugerencias del fabricante así como lo reportado por Miller y colaboradores en 2015 [92]. El mismo se estandarizó para inyectar 700 μ g en cada dosis, a los días 9, 14 y 18 post

implantación tumoral de manera de cubrir la ventana a la que normalmente observamos el mejor resultado de la terapia con *Salmonella* (co-administrada al día 11). Como control se utilizaron los liposomas vacíos, provistos también por el kit.

Para evaluar la relevancia de las células NK se utilizaron anticuerpos depletantes anti NK1.1, producidos en nuestro laboratorio (como parte de la tesina de grado de la Bach. María Clara Plata, de quien soy co-orientadora). Brevemente, se cultivó de la línea de hibridoma PK136 (ATCC), primeramente en DMEMsup y luego en OptiMEM libre de SFB. Los sobrenadantes ricos en anticuerpos se purificaron mediante filtración tangencial seguida de cromatografía de afinidad (ÄKTA, GE Healthcare). El proceso de purificación fue evaluado mediante una electroforesis en gel y la concentración final de anticuerpos purificados fue determinada por método de Bradford. El protocolo de depleción fue puesto a punto para inyectar a nivel i.p. 100 µg al día -1 y 0 de la administración de *Salmonella*.

En ambos casos la depleción fue seguida mediante citometría de flujo de sangre periférica a distintos tiempos.

5.5. Estudio de la expresión génica

El perfil transcripcional se evaluó en líneas celulares infectadas con *Salmonella* y en tumores tratados con *Salmonella*. Los cultivos celulares fueron resuspendidos directamente en TRIzol. Por otra parte, se sacrificaron ratones a los 3, 8 y 17 días del tratamiento y se extrajo material tumoral que se conservó en TRIzol previo a la extracción de ARN total. El tejido tumoral se rompió mediante el uso del TissueRuptor (Qiagen). En todos los casos se obtuvo el ARN mediante extracción con cloroformo. 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 DNAsaI (Invitrogen) 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 de las Tablas 4-6 utilizando el kit QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) en un termociclador Rotor-Gene 6000 (Corbett) o 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El gen codificante para GAPDH elegido como gen house-keeping para el análisis de citoquinas, mientras que el gen codificante para β-actina se seleccionó para los estudios asociados al inflammasoma y al fenotipo de macrófagos infiltrantes. Los niveles relativos de ARNm en cada muestra fueron calculados usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ tal como se describió previamente [93], donde $\Delta Ct = Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{housekeeping}}$. A su vez estos niveles fueron relativizados respecto al grupo control (células

sin infectar o tumores sin tratamiento). Se utilizó la línea de macrófagos murinos J774A.1 como control positivo de presencia y activación del inflammasoma.

Tabla 4. Secuencias nucleotídicas de cebadores utilizados para estudiar expresión de citoquinas

	Nombre	Secuencia del cebador
1	mGapdh_F	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'
	mGapdh_R	5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT-3'
2	mIFNg_F	5'-TCAGCAACAGCAAGGCGAAA-3'
	mIFNg_R	5'-CCGCTTCTCTGAGGCTGGAT-3'
3	mCXCL1_F	5'-CTTGGTTCAGAAAATTGTCCAAAA-3'
	mCXCL1_R	5'-ACGGTGCCATCAGAGCAGTCT-3'
4	mCxcl2_F	5'-CCCTCAACGGAAGAACCAAA-3'
	mCxcl2_R	5'-CACATCAGGTACGATCCAGGC-3'
5	mp35_II12_F	5'-ATCACACGGGACCAAACCA-3'
	mp35_II12_R	5'-CAGGCAACTCTCGTTCTTGTGTAGT-3'
6	mCcl2_F	5'-AGCTCTCTCTTCCCTCCACCAC-3'
	mCcl2_R	5'-CGTTAACTGCATCTGGCTGA-3'
7	CCL3F	5'-AACATCATGAAGGTCTCCAC-3'
	CCL3R	5'-CCAAGACTCTCAGGCATTCA-3'
8	CCL4F	5'-GCCCTCTCTCCTCTTGCT-3'
	CCL4R	5'-GTCTGCCTCTTTTGGTCAGG-3'
9	CCL5F	5'-GGTACCATGAAGATCTCTGCA-3'
	CCL5R	5'-AAACCCTCTATCCTAGCTCAT-3'
10	mCxcl9_F	5'-TGGAGCAGTGTGGAGTTCGA -3'
	mCxcl9_R	5'-CCTCGGCTGGTGCTGATG-3'
11	mCxcl10_F	5'-GCCGTCATTTTCTGCCTCAT-3'
	mCxcl10_R	5'-GCTTCCCTATGGCCCTCATT-3'
12	mTNFalfa_F	5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3'
	mTNFalfa_R	5'- CCTCCACTTGGTGGTTTGCT -3'
13	mIL-6_F	5'-GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA-3'
	m IL-6_R	5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'
14	mIL-10_F	5'-CATTTGAATCCCTGGGTGAGA-3'
	m IL-10_R	5'-TGCTCCACTGCCTTGCTCTT-3'
15	mIL-15_F	5'-CATCCATCTCGTGCTACTTGTGTT-3'
	m IL-15_R	5'-AGGGAGACCTACACTGACACAGCCCCAAA-3'
16	mCXCR4_F	5'-TTCTCATCCTGGCCTTCATC-3'
	mCXCR4_R	5'-CTTTTCAGCCAGCAGTTTCC-3'
17	mCXCR7_F	5'-GCCGTACCATTTTGTGGTTC-3'
	mCXCR7_R	5'-TGCAACGCTGTAAAGAGCAC-3'
18	mCXCL12_F	5'-GAAGTGGAGCCATAGTAATGCC-3'
	mCXCL12_R	5'-TCCAAGTGAAAAATACACCG-3'
19	mCCL20_F	5'-TTTTGGGATGGAATTGGACAC-3'
	mCCL20_R	5'-TGCAGGTGAAGCCTTCAACC-3'

Tabla 5. Secuencias nucleotídicas de cebadores utilizados para estudiar expresión de componentes moleculares asociados al inflamasoma

	Nombre	Secuencia del cebador
1	mB-actin_F	5'-GCTTCTTTGCAGTCCTTCGT-3'
	mB-actin_R	5'-CGTCATCCATGGCGAACTG-3'
2	m-nlrp3F	5'-TCCACAATTCTGACCCACAA-3'
	m-nlrp3R	5'-ACCTCACAGAGGGTCACCAC-3'
3	m-nlrc4F	5'-CTGGAAAAGGATGGGAATGA-3'
	m-nlrc4R	5'-CCAAGGCAGCATCAATGTAG-3'
4	m-ascF	5'-CAGAGTACAGCCAGAACAGGACAC-3'
	m-ascR	5'-GTGGTCTCTGCACGAACTGCCTG-3'
5	Casp1F	5'-CGCCCTGTTGGAAAGGAACT-3'
	Casp1R	5'-CCCTCAGGATCTTGTTCAGCC-3'
6	mI11beta_F	5'-CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG-3'
	mI11beta_R	5'-GATCCACACTCTCCAGCTGCA-3'
7	mIL18_F	5'-CAGGCCTGACATCTTCTGCAA-3'
	mIL18_R	5'-TCTGACATGGCAGCCATTGT-3'
8	mNlrp1a_F	5'-ACAGACATGGACCTCATGGTGGTT-3'
	mNlrp1a_R	5'-CAACTCCTCCAGTTTCTGGCTAAC-3'
9	mNlrp1b2_F	5'-ATGTGATGGTATGGAATTCAAAAGAACTG-3'
	mNlrp1b2_R	5'-AACCATACTGGGCAACTGTCAGCTT-3'
10	mNlrp1b1_F	5'-ACACGGTAATATGGAAATGGACAGAATTG-3'
	mNlrp1b1_R	5'-AACCATCCTTGGGGATATCAGTGC-3'
11	mNlrp1c_F	5'-GACAAGGGCAGTGACAATTGAGATT-3'
	mNlrp1c_R	5'-ACATTTGGGGTCCTCAGTGTCACT-3'
12	mNlrp6_F	5'-AGCTGAGAACGCTGTGTTCG-3'
	mNlrp6_R	5'-AACTTGGGAACCCCGAAGC-3'
13	mNlrp12_F	5'-GGACCTGAGCCAGGACAAAA-3'
	mNlrp12_R	5'-TGAAAGGTGCTGAGAGCCAG-3'
14	mAIM-2_F	5'-AAATGCTGTTGTTGACCGGC-3'
	mAIM-2_R	5'-GAGTGTGCTCCTGGCAATCT-3'

Tabla 6. Secuencias nucleotídicas de cebadores utilizados para evaluar el perfil de macrófagos infiltrantes de tumor

	Nombre	Secuencia del cebador
1	Mrc1_F	5'-GCATGGGTTTTACTGCTACTTGATT-3'
	Mrc1_R	5'-CAGGAATGCTTGTTTCATATCTGTCTT-3'
2	Tgm2_F	5'-CAGGAATGCTTGTTTCATATCTGTCTT-3'
	Tgm2_R	5'-CAGGAATGCTTGTTTCATATCTGTCTT-3'
3	Arg1_F	5'-CAGGAATGCTTGTTTCATATCTGTCTT-3'
	Arg1_R	5'-GTCCTGAAAGGAGCCCTGTCT-3'
4	Retnla_F	5'-GTCCTGAAAGGAGCCCTGTCT-3'
	Retnla_R	5'-GTCCTGAAAGGAGCCCTGTCT-3'
5	Nos2_F	5'-GTCCTGAAAGGAGCCCTGTCT-3'
	Nos2_R	5'-GTCCTGAAAGGAGCCCTGTCT-3'

5.6. Análisis de células infiltrantes de tumor o ganglio

Para estudiar el reclutamiento de células inmunes al sitio tumoral o a ganglio drenante luego de la administración de *Salmonella* así como el estado de activación del inflammasoma en neutrófilos y macrófagos o el fenotipo de macrófagos infiltrantes de tumor se realizó citometría de flujo. Para ello, los tumores y ganglios fueron extraídos (según el caso), mantenidos en hielo y homogeneizados en buffer PBS + 2% SFB + EDTA 1mM mediante el uso de filtros celulares de manera de obtener una suspensión de células separadas. Primeramente se bloqueó los receptores Fc de las mismas durante 20 minutos con Fc block, luego se lavaron y posteriormente se marcaron durante 30 minutos adicionales en oscuridad a 4°C. En el caso del co-marcado con FLICA (FAM-FLICA® Caspase-1 Assay Kit, ImmunoChemistry Technologies, MN), este se realizó previo al marcaje con anticuerpos, por 30 minutos at 37°C, según protocolo del fabricante. Dependiendo de la finalidad del experimento y de la disponibilidad y compatibilidad de reactivos se utilizaron distintos paneles, que se detallan en la Tabla 7. La información fue colectada con el citómetro FACS-Canto II (Becton Dickinson) y analizada mediante FACS Diva.

Tabla 7. Anticuerpos conjugados a fluoróforos utilizados para inmunofenotipificación

	PANEL 1	PANEL 2	PANEL 3	PANEL 4
FITC	FLICA	CD8	Ly6G	Gr1
PE	Ly6G	CD49b	F4/80	MHC-II (IA ^b)
PercP Cy5.5	CD11b	CD3	MHC-II(IA ^b)	
PE Cy7	-	CD4	CD11b	CD11c
APC	F4/80	CD19	CD11c	CD206
APC Cy7				CD11b
Pacific Blue 450				F4/80

5.7. Cuantificación de citoquinas mediante ELISA

Para cuantificar la producción de IL1 β y TNF α en sobrenadantes de cultivo se utilizaron los kit ELISA MAX Deluxe Set Mouse IL-1 β o TNF α , respectivamente (BioLegend), siguiendo instrucciones del fabricante. En el caso de la cuantificación de IL1 β activa en tumores de ratones tratados, éstos se conservaron en PBS (manteniendo la relación $\text{masa}_{\text{tumor}}/\text{volumen}_{\text{PBS}}$) y antes de la determinación fueron procesados con TissueRuptor (Qiagen), continuando posteriormente con el protocolo dictado por el fabricante. Las placas fueron leídas con un lector de placas de ELISA (Dynex Technologies) a 450nm y los resultados de lecturas fueron interpolados en la curva standard para este fin generada.

6. Resultados y discusión

6.1. Capítulo 1 – Células y moléculas involucradas en la actividad anti-tumoral de *Salmonella*

El objetivo de este primer capítulo consiste en definir las moléculas y las células responsables del efecto antitumoral de *Salmonella* LVR01. Para ello, en una primera instancia se abordó la interacción de LVR01 con las células tumorales B16F1. Estudios *in vitro* realizados en el marco de mi trabajo de maestría no permitieron observar muerte global de células tumorales inducida por LVR01, por lo que en este trabajo decidimos profundizar en este aspecto, diferenciando entre los posibles tipos de muerte inducida de manera de encontrar algún tipo particular que sí se viera modificado por el tratamiento. Cabe destacar que si bien no se encontró inducción diferencial de apoptosis o necrosis (datos no mostrados), encontramos indicios de que LVR01 induce muerte celular inmunogénica (ICD) *in vitro* en células de melanoma B16F1. Para esto, comparamos el porcentaje de células positivas para calreticulina post infección, ya que la exposición temprana de la misma es una de las hallmarks de ICD [94]. Encontramos que LVR01 induce un modesto, aunque significativo, aumento en el porcentaje de células no necróticas que exponen calreticulina en su superficie respecto a las células sin tratar (Figura 6.1.1). Como control positivo utilizamos doxorubicina (DX), ya que se ha descrito ampliamente como un inductor *bona fide* de ICD [95], y efectivamente éste también aumentó significativamente (datos no mostrados).

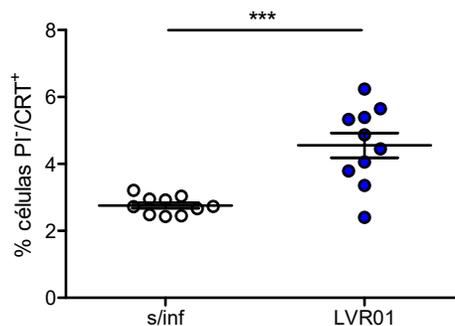


Figura 6.1.1. Porcentaje de células no necróticas positivas para calreticulina 20 horas post tratamiento de una hora. Datos representativos de tres experimentos independientes.

n=10/condición. Student's T test ***p≤0,001

Para continuar profundizando en el estudio de ICD inducida por *Salmonella*, evaluamos los niveles de HMGB-1 (otra de las hallmarks de ICD, [96]) en sobrenadantes de cultivo de células tratadas con LVR01 o DX. En ese sentido encontramos que efectivamente el tratamiento con *Salmonella* induce un discreto aumento en la liberación de HMGB-1 al medio extracelular (Figura 6.1.2). Nuevamente como control positivo utilizamos doxorubicina, y los niveles obtenidos en este caso (150 ng/ml aproximadamente) son comparables con los reportados para distintas líneas celulares humanas de cáncer de mama [97], reforzando la validez de nuestro enfoque y nuestros resultados. La caracterización de este mecanismo *in vivo* no fue posible debido la complejidad del microambiente tumoral y la sutileza del evento a analizar. Aún así los datos obtenidos *in vitro* sugieren que *Salmonella* podría iniciar ICD y de esta manera generar el establecimiento de memoria inmunológica a largo plazo, influenciando el balance cáncer-inmunidad hacia la inmunidad antitumoral. De hecho, muchos son los agentes utilizados como inmunoterapias contra el cáncer que son conocidos inductores de ICD [98], por lo que la inducción terapéutica de ICD a través de *Salmonella* podría representar una estrategia interesante para estimular una respuesta antitumoral más potente.

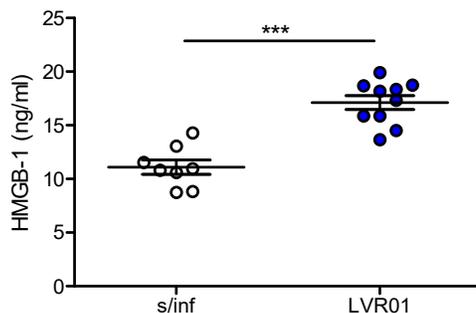


Figura 6.1.2. Niveles de HMGB-1 en sobrenadantes de cultivos de células B16F1 20 horas post tratamiento de una hora. n=10/condición. Student's T test ***p<0,001

Finalmente evaluamos la inducción de piroptosis, un tipo particular de muerte celular inmunogénica, a través del estudio de la expresión de gasdermina-D (GSDM-D) en la membrana de células tumorales. Encontramos que el tratamiento con LVR01 durante una hora induce un aumento en la expresión de GSDM-D 20 horas post tratamiento (Figura 6.1.3). Esta molécula forma poros en la membrana, que conducen a un tipo de muerte celular programada con características proinflamatorias ya que se libera el contenido citosólico [99]. La factibilidad de que LVR01 *activamente* induzca la activación del inflamasoma se abordará más adelante en otro capítulo de este trabajo.

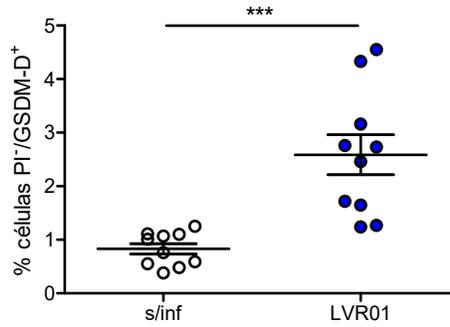


Figura 6.1.3. Porcentaje de células no necróticas positivas para gasdermina-D 20 horas post tratamiento de una hora. n=10/condición. Student's T test ***p≤0,001

Posteriormente se continuó caracterizando la acción de LVR01 con estudios a nivel *in vivo*. Una hipótesis muy aceptada es que el potencial antitumoral de *Salmonella* se debe a su capacidad de estimular el sistema inmune. De hecho, sabemos por nuestros antecedentes del grupo de trabajo que el tratamiento antitumoral con la *Salmonella* a ratones portadores de distintos tumores induce una cascada proinflamatoria de quimioquinas y citoquinas que a su vez propician el reclutamiento de distintas células que actuarán de diversas formas, como se reseñó al final de la sección 3 de este trabajo. Por tanto, quisimos establecer si la mera presencia de los PAMPs era suficiente para que la bacteria pueda ejercer su efecto antitumoral *in vivo*. Para ello, se comparó el crecimiento tumoral y la supervivencia de animales portadores de tumor tratados con LVR01 viva o muerta por calor (LVR01hk, ver Materiales y Métodos, sección 5.3). Como se observa en la Figura 6.1.4, el crecimiento tumoral se ve inhibido solamente cuando se utiliza LVR01 viva, indicando que además de la exposición de los PAMPs, se necesitan mecanismos activos de inyección de los mismos y/o que alcancen determinados compartimientos para encontrar sus receptores y desencadenar así una respuesta inmune efectiva. A partir de estos resultados, de aquí en adelante los siguientes experimentos se focalizaron solamente en LVR01 viva.

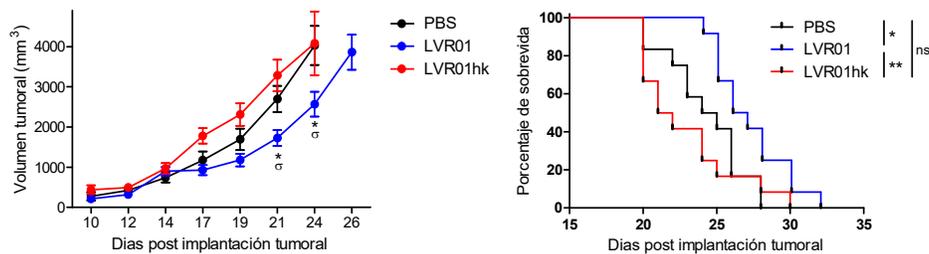


Figura 6.1.4. Curva de crecimiento tumoral de ratones C57BL/6 portadores de melanoma tratados con LVR01 o LVR01hk (izquierda), $*p \leq 0,05$: LVR01 vs control, $\sigma \leq 0,05$: LVR01 vs LVR01hk; y curva de supervivencia global (derecha), $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$. $n=12-13$ /grupo.

Siguiendo en línea con la hipótesis planteada anteriormente, el trabajo continuó caracterizando profundamente la respuesta inmune desencadenada por *Salmonella*.

Perfil de citoquinas

Comenzamos por realizar PCR cuantitativa en tiempo real sobre ARN obtenido de homogenizados de tumores extraídos a distintos tiempos luego del tratamiento con *Salmonella* de manera de establecer el perfil de citoquinas y quimioquinas inducido. Encontramos un aumento significativo en la expresión de once de las 18 analizadas (ver Materiales y Métodos, sección 5.13), al menos para algún punto de los tres evaluados. En ningún caso se observó una disminución de la expresión de alguna de ellas luego del tratamiento con *Salmonella*. En líneas generales las mayores diferencias en la expresión ocurren en las 72 horas posteriores al tratamiento, por lo que podemos decir que *Salmonella* induce la expresión temprana de un programa esencialmente proinflamatorio en el microambiente tumoral (Figura 6.1.5). Este perfil molecular explicaría globalmente el efecto antitumoral inducido por diversas vías que se describen a continuación. IFN γ es la principal citoquina involucrada en el perfil de una respuesta tipo Th1, necesaria para combatir el cáncer. Tiene actividad antitumoral ampliamente descrita [100] y promueve la actividad de células NK que a su vez la producen, generando un “loop” positivo. Cabe destacar que la expresión de IFN γ es elevada también a tiempos más tardíos, aunque no encontramos diferencias significativas respecto al control. Esto se puede explicar por la gran dispersión de los datos, ya que si bien el grupo control en general es bastante consistente, la administración de *Salmonella* amplía mucho la variabilidad del grupo, considerando todas las variables medidas (distribución evaluada en el contexto de mi maestría mediante análisis de componentes principales). IFN γ a su vez induce la secreción de CXCL9 y CXCL10, citoquinas cuya expresión también vimos aumentada. Ambas se han

descrito como grandes quimioatrayentes, tanto de macrófagos como de células NK y T, entre otras, y particularmente CXCL10 posee actividad antitumoral -probablemente debido a que inhibe angiogénesis [101], por lo que parecería ser relevante para nuestro trabajo. Más recientemente CXCL10 también se ha descrito como una citoquina mecanísticamente unida a ICD en cáncer, y junto con CXCL1 y CCL2 parecen contribuir a la muerte de células tumorales residuales (revisado en [98]). En el caso de CXCL1 y CXCL2, ambas quimioquinas son fuertemente reclutadoras de neutrófilos. Sin embargo, resulta interesante que CXCL1 es también secretada por células de melanoma humano y está implicada en su patogénesis [102]. CXCL1 y CXCL2 (que comparten una homología de secuencia de aproximadamente 90%) están involucradas en procesos de angiogénesis, tumorigénesis y metástasis [103-105] por lo cual su aumento sería un “arma de doble filo”. IL12 es una potente citoquina que activa la inmunidad antitumoral tanto innata (ya que activa células NK) como adaptativa a través de la activación de linfocitos T citotóxicos. Justamente estas células NK y T son grandes productoras de IFN γ y TNF α bajo el estímulo de IL12, y estas moléculas tienen gran relevancia en este contexto como se ha reseñado en esta sección. Igualmente CXCL9, CCL2, CCL3, CCL4 y CCL5 promueven la migración de LT CD8+ efectores que ejercen efecto antitumoral. CCL5 también induce la proliferación de células NK [106]. Por su parte, la expresión del TNF α aumenta rápidamente ($p=0,0009$ al día 3), ejerciendo su efecto citotóxico en las células tumorales. El mismo se debe a la activación local del endotelio vascular (tanto vasodilatación como aumento de la permeabilidad vascular), que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias previamente mencionado que provoca la activación de los linfocitos T y B.

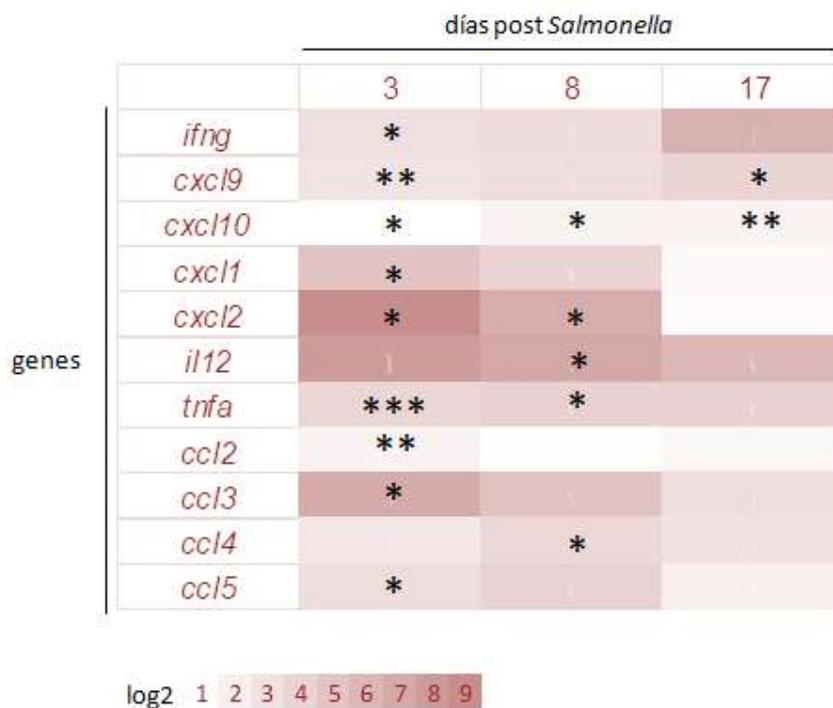


Figura 6.1.5. Heat map en el que se representa el aumento relativo respecto al grupo control de los niveles de ARNm de quimioquinas y citoquinas en homogenizados de tumor de ratones obtenidos 3, 8 o 17 días luego del tratamiento con *Salmonella* LVR01. n=4-7 por grupo. Los valores se han representado como el logaritmo en base 2 del valor real para facilitar visualización. Los asteriscos indican diferencias significativas entre el grupo LVR01 y el grupo control sin tratamiento * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001

Si bien la expresión de CXCL12, CXCR4 y CXCR7 no se vio modificada por el tratamiento con LVR01 (datos no mostrados), la relación CXCR4/CXCR7 se ve significativamente aumentada (p=0,0146 al día 3). Dado que CXCR7 es un receptor atípico de CXCL12 que actúa como antagonista (evitando su unión a su receptor convencional CXCR4), un aumento en esta relación reflejaría menor cantidad del antagonista circulante, por lo tanto mayor disponibilidad de CXCL12 libre para unirse con CXCR4. Esto podría ser favorable ya que CXCL12 es un fuerte quimiotáctico de células inmunes. Sin embargo, también podría ser negativo ya que se le atribuye un rol importante en la angiogénesis en la adultez [107].

Células involucradas

Respecto a la celularidad infiltrante al tumor, estudiamos el reclutamiento de distintas células inmunes al microambiente tumoral luego del tratamiento con LVR01 mediante citometría de flujo. Encontramos un aumento significativo en el infiltrado al tumor de neutrófilos, macrófagos, células natural killer (NK) y dendríticas (DC), respecto a los

tumores control (Figura 6.1.6). La relevancia de estas poblaciones en el contexto del cáncer se describirá en las siguientes secciones. Cabe mencionar que parte de este perfil de reclutamiento celular coincide con lo reportado en el contexto de la infección natural por *Salmonella*, en la que tanto neutrófilos como macrófagos y NK migran hacia las placas de Peyer y los nódulos linfáticos mesentéricos luego de la infección [108]. También se han reportado hallazgos similares en el contexto de cáncer de colon, donde la inyección intravenosa de *Salmonella* indujo reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y DCs tanto a tumor como a ganglio drenante [60]. Asimismo, resultados previos de nuestro grupo de trabajo ya han reportado el infiltrado tumoral de neutrófilos a 3 días post tratamiento [81, 83]. Por otra parte, la evaluación no arrojó diferencias significativas en los porcentajes en tumor de células NKT, LT CD8+ o LT CD4+ entre animales tratados y control.

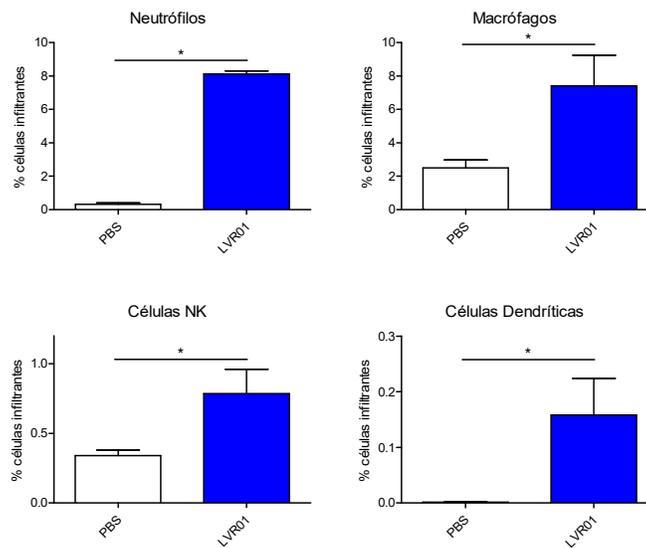


Figura 6.1.6. Porcentaje de neutrófilos, macrófagos o células NK respecto al total de células del homogenizado tumoral 24 horas post tratamiento con *Salmonella* LVR01. n=4-6 por grupo. * p<0,05.

Neutrófilos

Los neutrófilos son el granulocito más importante en términos de abundancia en sangre. Debido a su corto tiempo de vida son de rápida respuesta, por lo que es lógico encontrarlos en las primeras horas posteriores al tratamiento. En cuanto a su movilidad, responden a estímulos inflamatorios atravesando las paredes de los vasos sanguíneos para migrar hacia los tejidos. Esta quimiotaxis depende de varias de las citoquinas que encontramos aumentadas en el microambiente tumoral, como IFN γ (probablemente

liberado por las células NK) cuya relevancia se ha establecido previamente en nuestro modelo [83] y $TNF\alpha$ (probablemente liberado por macrófagos). Una vez en el microambiente tumoral, los mismos pueden cumplir funciones pro- o anti-tumorigénicas, y en los últimos años se ha establecido que esto se debe a que los neutrófilos asociados a tumor (TAN) son en realidad una población heterogénea, diferenciada por su perfil transcriptómico y que puede ser tanto N1 (anti tumorigénica) como N2 (pro tumorigénica) [109]. Particularmente, la diferencia más importante entre los TAN y las otras poblaciones de neutrófilos es el gran aumento de producción citoquinas y las quimioquinas, lo que sugiere un papel importante de los neutrófilos tumorales en el reclutamiento de otras células inmunes y en el equilibrio entre la activación y la supresión del sistema inmune. En un estudio realizado en ratones portadores de mesotelioma, entre el amplio grupo de quimioquinas cuyos ARNm se encuentran regulados al alza se reportaron CCL 2, 3, 4, 8, 12 y 17 y CXCL 1, 2, 9 y 16, por lo que los autores caracterizaron esos TAN como neutrófilos “clásicos” (o sea, con un perfil N1) [110], y muchas de esas citoquinas son las mismas que nosotros también encontramos sobreexpresadas. Además de estas funciones “indirectas”, los neutrófilos activados cumplen funciones más directas, particularmente citotóxicas. Hace mucho tiempo se sabe que particularmente pueden ejercer efectos antitumorales en distintas líneas celulares [111], y esto puede deberse a la producción de especies reactivas del oxígeno, proteasas, agentes perforantes de membrana y factores solubles como $TNF\alpha$, $IL1\beta$ e IFNs (revisado en [112]) -y que nosotros hemos detectado al alza-, así como citólisis tumoral dependiente de anticuerpos (ADCC) [113]. Aunque son poco reconocidos por este rol, también pueden actuar como células presentadoras de antígeno, direccionando la respuesta inmune hacia tipo Th1 [114]. Sin embargo, los neutrófilos también pueden ser detrimentales para la terapia antitumoral basada en el uso de bacterias. En 2008, Westphal y colaboradores describieron que dentro del tumor la región necrótica que contiene las bacterias está separada de las células tumorales viables por una barrera de neutrófilos infiltrantes, y que cuando esos neutrófilos son depletados, aumentan los recuentos de bacterias intratumorales, tanto en la zona necrótica como en la viable, y que incluso, aumenta la necrosis total, lográndose la erradicación total de tumores establecidos [115]. Resultados recientes de nuestro grupo de trabajo en los que depletamos neutrófilos mediante la administración de anticuerpo anti-Gr1 (en el marco de la tesina de grado de la Bach. María Clara Plata, que co-dirijo), muestran que tanto los animales depletados como los no depletados tratados con LVR01 exhiben un comportamiento similar, sugiriendo que los neutrófilos no serían relevantes para la actividad antitumoral de *Salmonella*. De todas formas, entendemos que aún queda mucho por estudiar en este sentido, ya que si bien completa, la depleción fue transiente.

Aún más, los niveles de neutrófilos no solo se recuperan rápidamente sino que aumentan a un 200-300% de los valores originales, cuestionando la validez de las conclusiones en este sentido. Observamos también que no se hace mención a este efecto que nosotros observamos sistemáticamente en otros trabajos que involucran depleción de estas células, por lo que es difícil comparar nuestros resultados con los reportados. Sumado a esto, como se menciona más arriba sería interesante profundizar en el fenotipo de los neutrófilos presentes en tumor. Además cabe recordar que el anticuerpo anti-Gr1 que utilizamos no solo depleta neutrófilos ya que estos marcadores se observan en otras células (ej. mieloides supresoras) por lo que se puede complejizar mucho más el análisis. Por otra parte, hace algunos el grupo de Ferri y colaboradores de la Universidad de McGill describió la correlación entre los neutrófilos y las metástasis en varios modelos de cáncer [116]. Se elucidó que la misma es a través de la producción de Neutrophil Extracellular Traps (NETs), redes de ADN que los neutrófilos utilizan como estrategia para atrapar patógenos y eliminarlos. Lo interesante es que estas NETs también pueden atrapar células tumorales circulantes a través de interacciones de integrina $\beta 1$, pero en lugar de destruirlas, favorecen el desarrollo de metástasis [117-119]. Si bien ya se sabe que *Salmonella* es capaz de inducir NETs [120], nosotros hemos descrito por primera vez que también es capaz de inducir liberación de trampas extracelulares de macrófagos (METs, del inglés Macrophage Extracellular Traps; ver sección 6.2, [121]). Hasta el momento no hemos estudiado un vínculo entre las METs y melanoma aunque se ha sugerido el nexo mecanístico entre la detección de ADN extracelular y la inducción de ICD en cáncer ya que este DAMP recluta y activa neutrófilos [122].

Macrófagos

Por su parte, los macrófagos son células inmunes esenciales para el reconocimiento y destrucción de organismos, tanto patógenos como células infectadas o transformadas. Además de fagocitar, secretan citoquinas y quimioquinas y presentan antígenos en el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), moldeando la respuesta inmune. Son un tipo celular ubicuo y muy diverso, cambiante en función de diferentes estímulos. En el contexto del cáncer, son reclutados hacia el tumor atraídos por factores de crecimiento y quimioquinas (como CCL2 o CCL5, las cuales encontramos aumentadas) secretados tanto por las células tumorales propiamente dichas como por las del estroma, y se los denomina Tumor Associated Macrophages (TAM), pudiendo representar hasta un 50% de la masa tumoral [123]. A grosso modo, pueden polarizarse en dos tipos, con funciones opuestas: los macrófagos activados clásicamente (M1) y los macrófagos activados alternativamente (M2). Mientras que los M1 serían cruciales para la destrucción

de células tumorales dada su producción de citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno/nitrógeno, los M2 producen citoquinas antiinflamatorias y participan en la resolución de la inflamación. Estos se consideran desfavorables porque no solo suprimen la inmunidad que eliminará células tumorales, sino que también promueven la angiogénesis y la remodelación de la matriz, lo que hace que el microambiente tumoral sea propicio para la progresión tumoral y la metástasis [124]. Dado que en nuestro modelo los macrófagos aumentan por el tratamiento y se asocian con menor tamaño tumoral esto sugiere que se sesgarían hacia un fenotipo M1. Además, los típicos estímulos para esta polarización (LPS, IFN γ y TNF α) están todos presentes en el microambiente tumoral, ya sea como PAMP de la propia bacteria o como citoquinas estimuladas por la presencia de la misma (Fig. 6.1.5). Por su parte, recientemente se ha reportado que utilizando una cepa de *S. Typhimurium anaerobia* estricta se puede, al menos *in vitro*, inducir el cambio del fenotipo M2 a M1 [125], lo que *in vivo* podría reforzar la inmunidad antitumoral. Asimismo, el grupo de Zheng y colaboradores demostró que utilizando una cepa de *S. Typhimurium* modificada genéticamente para secretar flagelina heteróloga (FlaB de *V. vulnificus*) se logra reducir el tamaño tumoral y prolongar la supervivencia en ratones portadores de cáncer de colon, reduciéndose el % M2 intratumorales y concomitantemente aumentando el % M1, lo que optimiza la inmunoterapia [126].

Para discriminar el perfil de los macrófagos reclutados al tumor, realizamos PCR cuantitativa en tiempo real sobre ARNm extraído de homogenizados de tumores tratados con LVR01, utilizando cebadores para genes clásicamente asociados a uno u otro fenotipo (Figura 6.1.7). Por una parte, encontramos que el tratamiento induce una tendencia al aumento en la expresión de la óxido nítrico sintasa (*nos2*), consistente con el aumento en la expresión de TNF α mencionado anteriormente (Figura 6.1.5). Si bien esta tendencia es clara, la gran desviación entre los resultados y el poco número de animales no nos permite una conclusión estadísticamente significativa. Sin embargo, aunque ésta no se confirme, existen indicios de que no solo sería importante un aumento a nivel de transcripto, sino que también debe considerarse la regulación a nivel epigenético. Se ha señalado al inflammasoma NLRC4 y particularmente la caspasa-1 como responsables del clivaje del regulador de cromatina PARP1, que a su vez llevará a una potenciación de la expresión de genes proinflamatorios haciendo más accesibles los sitios de acceso a NF κ B [127]. Como se presentará más adelante en este trabajo, LVR01 activa Caspasa-1, por lo que es posible que el tratamiento intratumoral con esta bacteria induzca modificaciones epigenéticas que incrementen el ambiente proinflamatorio. Sumado a esto, la disminución significativa en la expresión de la resistina RELM α (*retna*), refuerza la idea de un sesgo M1. Sin embargo

también observamos un aumento significativo en la expresión de *tgm2* y *arg1*, ambos marcadores de M2. Por su parte *mrc1*, gen codificante para CD206, se mantuvo incambiado. Si bien estos resultados en principio podrían parecer contradictorios, se ha reportado que marcadores clásicos de macrófagos M2 como *arg1* y *mrc1* también pueden sobreexpresarse en M1 y por lo tanto no constituyen una marca incuestionable de este fenotipo, tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína (revisado en [128]).

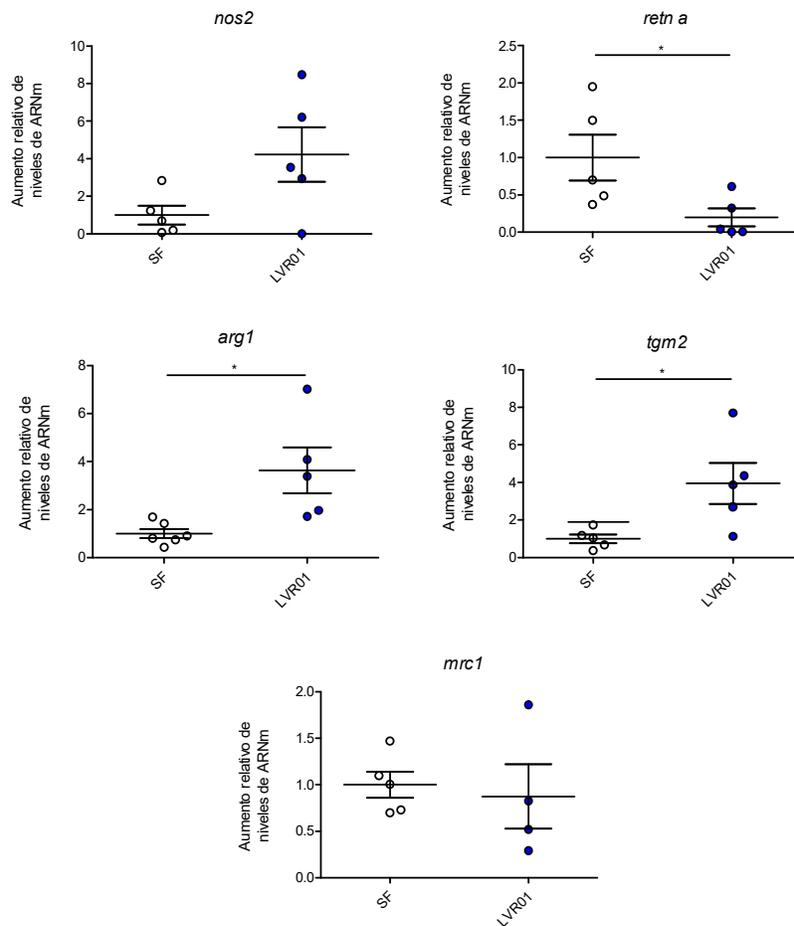


Figura 6.1.7. Aumento relativo de los niveles de ARNm de genes clásicamente asociados a fenotipos M1 o M2 en homogenizados de tumor, 3 días luego del tratamiento con *Salmonella* LVR01. n=5-6 por grupo. * p<0,05

De todas formas, para continuar la discriminación del fenotipo dominante de los macrófagos infiltrantes al tumor, evaluamos la expresión de CD206 en superficie a distintos tiempos post tratamiento. Como se observa en la Fig. 6.1.8, la inoculación intratumoral de *Salmonella* rápidamente induce un aumento en la relación M1/M2 en homogenizado de tumor. Sin embargo este efecto es transiente ya que al pasar los días,

este fuerte sesgo M1 se va perdiendo, para llegar a los 7 días post tratamiento a niveles similares al grupo sin tratar.

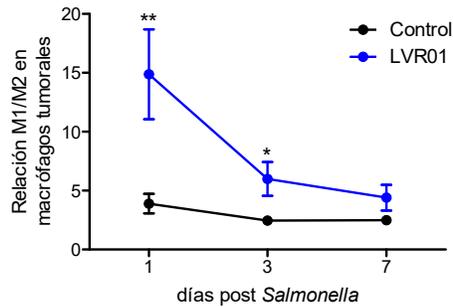


Figura 6.1.8. Relación M1/M2 observada en los macrófagos totales en homogenizados de tumor, 1, 3 o 7 días días luego del tratamiento con *Salmonella* LVR01. n=4-5 por grupo. * p<0,05 ** p<0,01

Para confirmar el rol de los macrófagos en el efecto antitumoral de *Salmonella* realizamos una depleción específica de esta población mediante el uso de liposomas de clodronato. Para esto, se puso a punto el esquema de tratamiento que se esquematiza en el panel superior de la Figura 6.1.9 (por detalles, ver sección 5.16), lográndose un 50% de depleción sistémica sostenido al menos 3 días luego de la última dosis. Posteriormente, se aplicó este esquema en animales portadores de tumor, y se evaluó la progresión tumoral encontrándose que la depleción de macrófagos abole completamente el retardo en el crecimiento tumoral inducido por LVR01 (p=0,0182 en el día 21, comparando el efecto de LVR01 en ratones con o sin depleción; ver Figura 6.1.9, abajo, derecha). En base a lo discutido anteriormente y a estos resultados, reafirmamos que estos macrófagos asociados a tumor serían del fenotipo M1. Una observación cualitativa interesante es que los animales depletados de macrófagos no solo no lograron combatir el crecimiento tumoral sino que también exhibieron mayor grado de ulceración tumoral que los ratones sin tratar, hecho que atribuímos a la carencia de la actividad reparadora de los macrófagos que lleva a un estado persistente de injuria no resuelta [129].

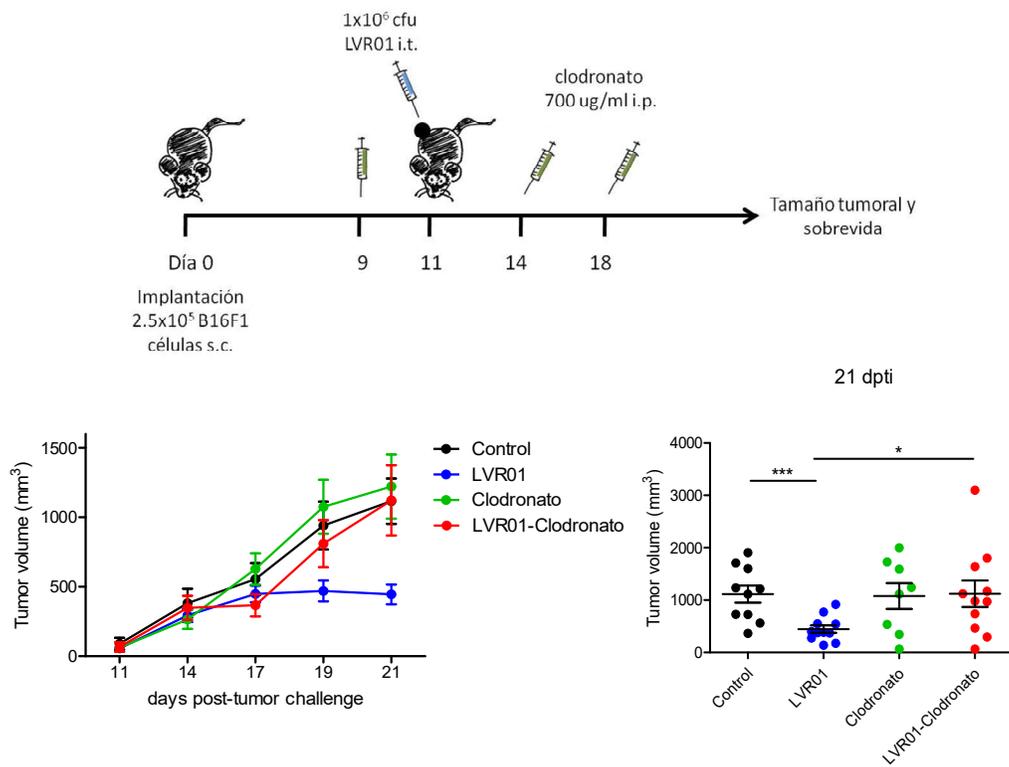


Figura 6.1.9. Arriba. Esquema de depleción de macrófagos. Las jeringas verdes corresponden a clodronato i.p, las jeringas celestes corresponden a *Salmonella* i.t.. Abajo. Curva de crecimiento tumoral de ratones C57BL/6 portadores de melanoma tratados con LVR01, con o sin depleción de macrófagos (izquierda) y tamaños tumorales al día 21 (derecha). Datos representativos de dos experimentos independientes. n=12-13/grupo. * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$

Como se verá mas adelante en el capítulo 6.3, BMDMs infectados con LVR01 durante 1 hora aumentan significativamente su producción de $\text{TNF}\alpha$ (Fig. 6.3.3), reforzando aún más la teoría de que *Salmonella* estimula el fenotipo M1.

Células Natural Killer

Retornando al análisis de las células infiltrantes al tumor, la otra población celular significativamente aumentada por el tratamiento son las células NK. Las mismas son linfocitos de rápida acción productores de varias de las citoquinas proinflamatorias mencionadas más arriba. Reconocen células transformadas desencadenando rápidamente programas de lisis o apoptosis en las mismas y son un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. Tal es la relevancia de las mismas que han sido evaluadas como posibles terapias celulares contra el cáncer, ya sea en el contexto de trasplantes autólogos como alogénicos [130]. Por esas razones entendemos que el aumento de las mismas en el infiltrado tumoral puede ser importante para combatir las células de melanoma. Sumado a esto, previamente hemos descrito que el tratamiento con *Salmonella* en ratones portadores de melanoma induce niveles circulantes de anticuerpos anti-B16F1 [81], los que podrían potenciar el efecto citotóxico de estas células -y otras con receptores Fc como los neutrófilos- a través de ADCC.

Para profundizar en el rol de las células NK, utilizamos anticuerpos anti NK1.1 para depletarlas. Nuevamente, se puso a punto el esquema de tratamiento que se esquematiza en la Figura 6.1.10 (por detalles, ver sección 5.16) para luego aplicarlo a ratones portadores de tumor. En este caso la depleción no fue tan eficiente y si bien se llegó a un 50% al día 4 post inicio del esquema, la misma no se mantuvo, disminuyendo a un 33% al día 6 y dejando de ser estadísticamente significativa al día 8 (comparando en todos los casos los grupos LVR y LVR+Ac NK1.1). Esta depleción parcial y transitoria inhibe el efecto antitumoral de *Salmonella* a tiempos tempranos ($p=0,0285$ en el día 16, comparando el efecto de LVR01 en ratones con o sin depleción; ver Figura 6.1.10, abajo, derecha) pero luego los niveles celulares se restituyen (dado que no se continuó con el esquema de depleción) (Figura 6.1.10, izquierda). Cabe destacar en este punto que los anticuerpos depletantes anti NK1.1 no son específicos únicamente de las células NK, ya que otras células inmunes también expresan este marcador. Esta observación es de particular relevancia en tanto las células pre-mNK han sido descritas como antitumorales [131] y podrían estar siendo disminuídas en este contexto junto con las NK.

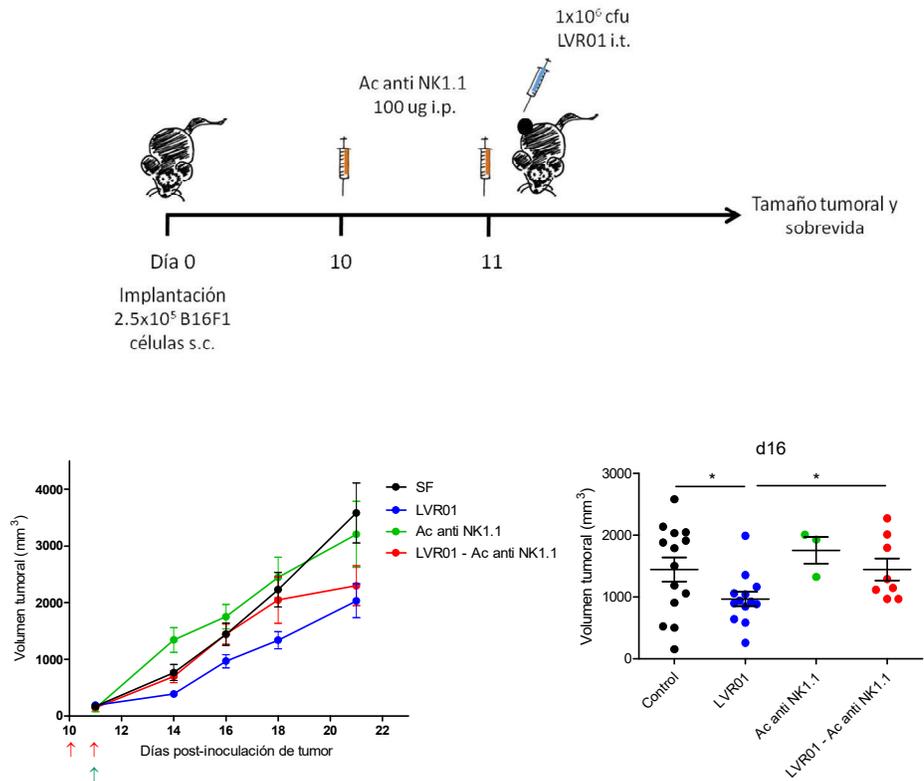


Figura 6.1.10. Arriba. Esquema de depleción de células NK. Las jeringas naranjas corresponden a anticuerpos depletantes i.p., las jeringas celestes corresponden a *Salmonella* i.t. Abajo. Curva de crecimiento tumoral de ratones C57BL/6 portadores de melanoma tratados con LVR01, con o sin depleción de células NK (izquierda) y tamaños tumorales al día 16 post implantación tumoral (derecha). Las flechas rojas indican las dosis de Ac depletantes y la flecha celeste indica la dosis de LVR01. Datos representativos de dos experimentos independientes. * $p \leq 0,05$

Células Dendríticas

Estas células representan la única población que aumentó significativamente por el tratamiento con *Salmonella* tanto en tumor (Fig. 6.1.6) como en ganglio drenante (Fig. 6.1.11). Si bien los porcentajes obtenidos en ambos compartimientos son muy bajos, aún luego de tratamiento, se sabe que estas células constituyen una población inmune rara en ellos [132].

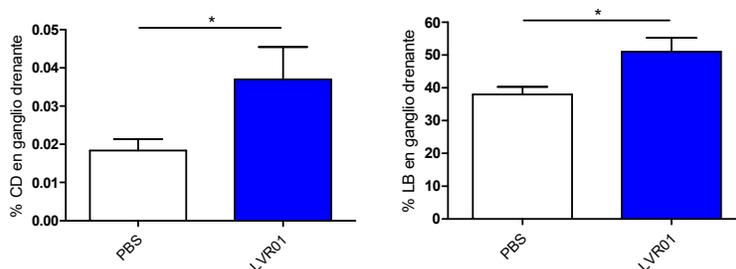


Figura 6.1.11. Porcentaje de células dendríticas (izquierda) y células B (derecha) respecto al total de células del homogenizado de ganglio drenante 24 horas post tratamiento con *Salmonella* LVR01. n=5-7 por grupo. * p<0,05.

Las DC son las células presentadoras de antígeno profesionales por excelencia, y esta capacidad de detectar y fagocitar agentes invasores, procesarlos y presentar péptidos derivados en su superficie para interactuar con células T en los ganglios linfáticos las hace un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. Son justamente esas características las que las hacen un candidato interesante para intervenir de forma de mejorar las inmunoterapias contra el cáncer, y de hecho, la primera vacuna contra el cáncer aprobada por la FDA hace ya una década utiliza estas células del propio paciente (sipuleucel-T, Provenge®). Distintos subtipos de DC tienen roles específicos en la inmunidad antitumoral. Por un lado, las DC convencionales son clave en el control inmune del cáncer y de hecho su cantidad en tejidos tumorales de pacientes ha demostrado ser un buen biomarcador pronóstico tanto de supervivencia como de respuesta a terapias de bloqueo de puntos de control [133]. De esta manera, el aumento del infiltrado de las mismas mediado por *Salmonella* que observamos puede constituir una estrategia para potenciar la inmunidad antitumoral. Sin embargo, por otra parte, las DC plasmacitoides (pDC) reclutadas al microambiente tumoral pueden adquirir un fenotipo del tipo inmunosupresor/tolerogénico, siendo deletéreas para la terapia [134]. Resultados previos de nuestro grupo demuestran que efectivamente el tratamiento con *Salmonella* induce una disminución de células pDC en ganglio drenante [81], reforzando el concepto de su rol

negativo en el contexto de la inmunoterapia. Asimismo, la detección de estas células (con un fenotipo inmaduro pero funcional) particularmente en melanoma pero también en otros tipos de cáncer, se correlaciona con un mal pronóstico (revisado en [134]). Otro punto interesante es el estado de activación de las mismas, ya que se ha reportado previamente que a pesar de que se detectan pDC en ganglio centinela, las mismas son defectivas en producir IFN α *in situ* y tampoco expresan moléculas coestimuladoras como CD80 o CD86, sugiriendo un estado incompleto de activación [135].

En este trabajo se utilizó CD11c como uno de los marcadores de superficie para detectar células dendríticas por lo que entendemos que las que encontramos aumentadas por el tratamiento constituirían el subtipo convencional (ya que las pDC expresan bajos o nulos niveles de CD11c en su superficie). Entendemos que esto constituye un hallazgo interesante que reafirma el potencial de *Salmonella* de inducir potentes respuestas antitumorales a través de diversos mecanismos que amerita mayor estudio, por ejemplo, respecto al estado de activación de las mismas.

Células B

Respecto a las poblaciones celulares en ganglio drenante, la única que se vio modificada por el tratamiento fueron los linfocitos B ($p=0,0164$), ver Figura 6.1.11. Este aumento correlaciona positivamente con los niveles de IgG totales anti B16F1 detectados en suero de animales portadores de tumor 10 días post tratamiento con LVR01 previamente reportados por nuestro grupo de investigación [81], sugiriendo que estos linfocitos B podrían ser específicos contra el tumor.

A modo de conclusión de esta sección podemos decir que *Salmonella* demostró ser capaz de inducir piroptosis en células tumorales, lo que contribuye la generación de un ambiente proinflamatorio propicio para que se monte una respuesta antitumoral efectiva, y muerte celular inmunogénica, que podría generar una suerte de memoria o protección frente a un siguiente encuentro con las células tumorales. Si bien no encontramos aumento de infiltrado tumoral de células de la inmunidad adaptativa como LT CD8+, en este modelo estas células no parecerían tener relevancia, ya que hemos visto que la depleción total y sostenida de las mismas no afecta el efecto antitumoral de *Salmonella* (Tesina de grado Bach. María Clara Plata, en preparación). Asimismo, el tratamiento de melanoma con *Salmonella* LVR01 intratumoral induce un programa de expresión génica en el microambiente tumoral que varía con el tiempo pero es esencialmente proinflamatorio. En paralelo también se promueve el reclutamiento de neutrófilos, células dendríticas y NK, y macrófagos al sitio tumoral, siendo estos dos últimos relevantes para la correcta ejecución

del efecto antitumoral. En el siguiente capítulo ahondaremos en otro novedoso rol de los macrófagos en el contexto de la infección con *Salmonella*.

"A veces se encuentra lo que uno no está buscando"

Alexander Fleming

6.2. Capítulo 2 – Liberación de METs inducida por *Salmonella*

En el transcurso de este trabajo, evaluando la interacción de *Salmonella* con los macrófagos tuvimos un hallazgo inesperado. En los macrófagos J774A.1 tratados con LVR01 y mediante la tinción de ADN con Hoechst observamos la presencia de nubes de ADN extracelular en la proximidad de las células tratadas con LVR01. Con la hipótesis de que podrían ser trampas extracelulares de macrófagos, realizamos distintos ensayos confirmatorios.

Según bibliografía, el PMA es un inductor de METs [136] por lo que se incubó las células durante 30 minutos con PMA y luego se observaron al microscopio confocal. Tal como se aprecia en la Figura 6.2.1B, el tratamiento con PMA efectivamente induce la liberación de estas redes de ADN, mientras que esto no ocurre en las células control (Fig 6.2.1A).

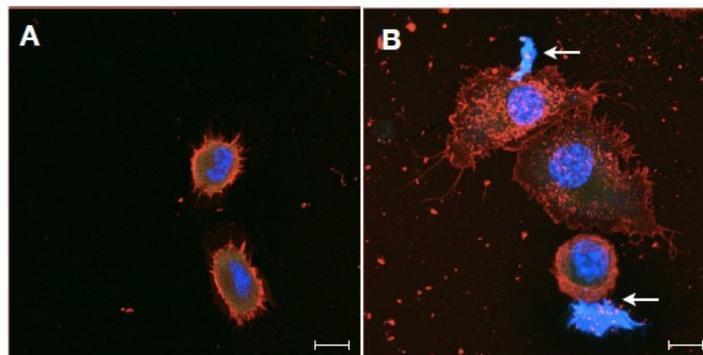


Figura 6.2.1. A. Células J774A.1 sin tratar. B. Células J774A.1 tratadas con PMA 200 μ M durante 30 minutos. En rojo: membrana; en azul: ADN. Las flechas señalan las METs, la barra de medida corresponde a 10 μ m.

Posteriormente evaluamos cómo el tratamiento con *Salmonella* los inducía, en términos de cinética y cantidad. Para esto, se evaluaron distintos tiempos de infección (10, 30 y 60 minutos) y como prueba de concepto una MOI alta (40:1) en macrófagos J774A.1. La liberación de METs inducida a MOI 40:1 se observó desde los 10 minutos y durante todo el tiempo ensayado, con un tamaño promedio de las fibras de 17 ± 10 μ m, variando entre 7 y 50 micras. Hasta los 30 minutos esto ocurrió sin detrimento de las células involucradas, pero a los 60 minutos la viabilidad celular se vio seriamente comprometida (Figura 6.2.2, fila central). Para confirmar la naturaleza de estas redes, evaluamos la inducción de las mismas frente a un pre-tratamiento con DNAsa I (100 U/ml). En este caso, no se encontraron METs aún cuando sí se observó enucleación celular (Figura 6.2.2, fila inferior), sugiriendo que el proceso efectivamente tuvo lugar pero el ADN extracelular fue degradado por la DNAsa I.

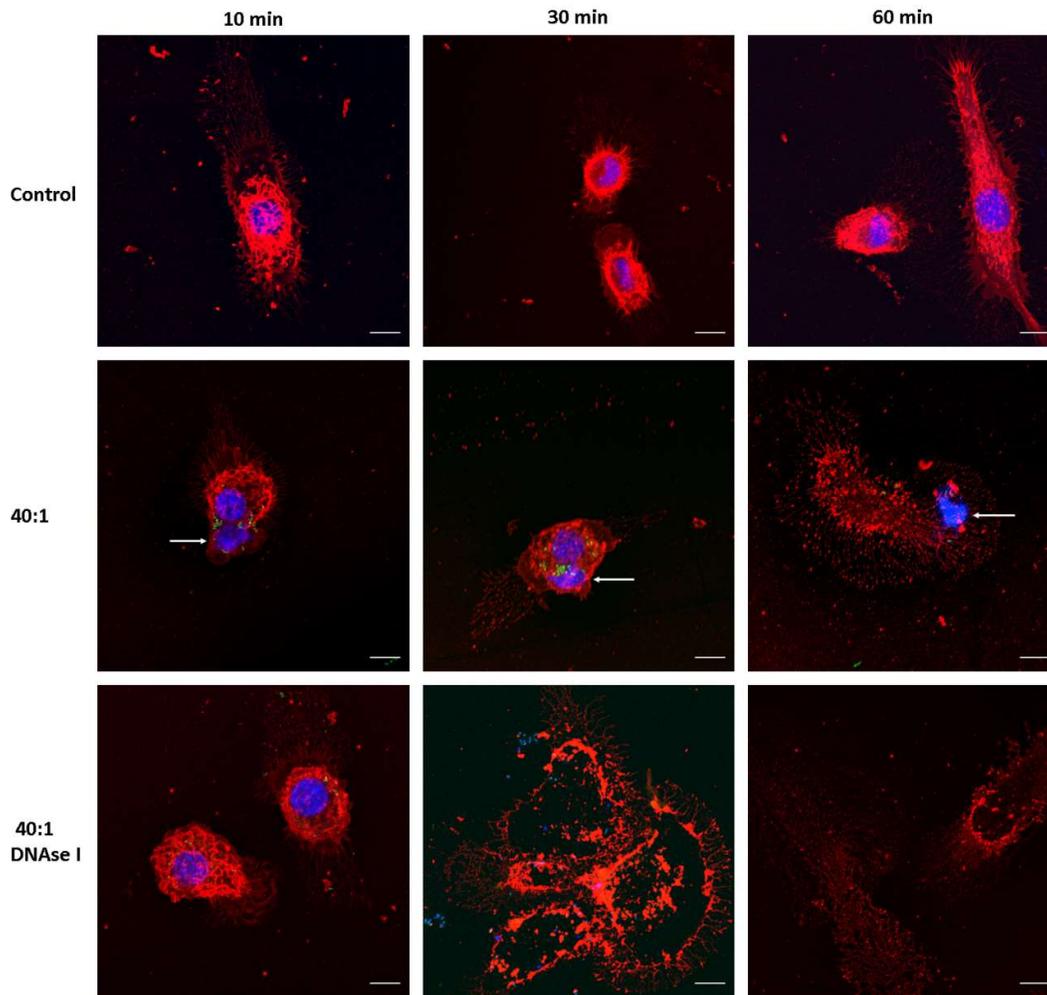


Figura 6.2.2. Liberación de METs inducida por *Salmonella* a $t=10, 30$ y 60 min. Panel superior: control sin infectar. Panel central: Células infectadas con *Salmonella* 40:1. Panel inferior: Células infectadas con *Salmonella* 40:1 en presencia de DNase I. En rojo: membrana; en azul: ADN; en verde: *Salmonella*. Las flechas señalan las METs, la barra de medida corresponde a $10 \mu\text{m}$.

Las células J774A.1 son una línea inmortalizada del “tipo macrófago”, por lo que buscamos confirmar este fenómeno en condiciones más acercadas a la realidad, utilizando macrófagos derivados de médula ósea. Como se observa en la figura Figura 6.2.3, *Salmonella* también induce liberación de METs en BMDMs luego de 30 minutos de infección a una MOI 40:1.

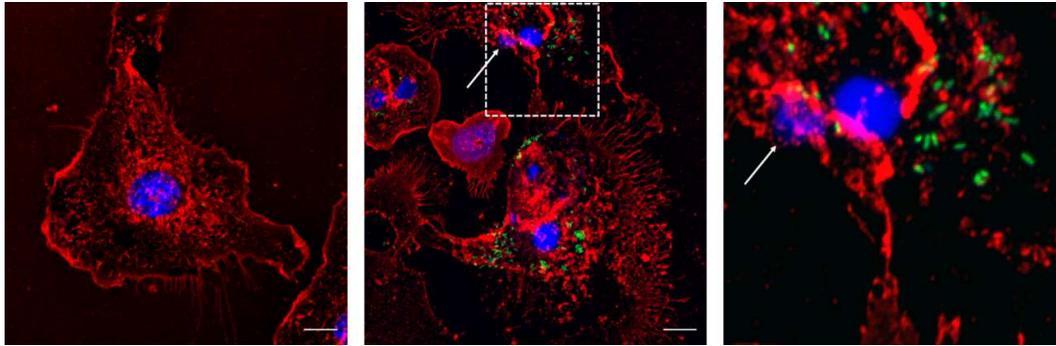


Figura 6.2.3. Macrófagos derivados de médula ósea infectados con *Salmonella*. Panel izquierdo: Control sin infectar. Panel central: BMDM infectados durante 30 minutos con LVR01 40:1. Panel derecho: Zoom del cuadrado punteado de la imagen entral, para observar la MET. En rojo: membrana, en azul: ADN, en verde: *Salmonella*. Las flechas señalan las METs, la barra de medida corresponde a 10 μm .

Posteriormente cuantificamos la liberación de METs mediante el uso del reactivo Quant-iT PicoGreen, que une al ADN doble hebra y fluoresce, pero no es permeable a la célula. Nuevamente se utilizó como control positivo el PMA, encontrando que LVR01 induce niveles superiores de liberación que este conocido inductor. La concentración media de ADN por estimulación con PMA fue 525 ± 98 ng/ml mientras que para la infección con LVR01 fue 612 ± 78 ng/ml. El tratamiento con DNasa I 30 minutos antes de la inducción resultó en niveles significativamente menores de ADN (Figura 6.2.4).

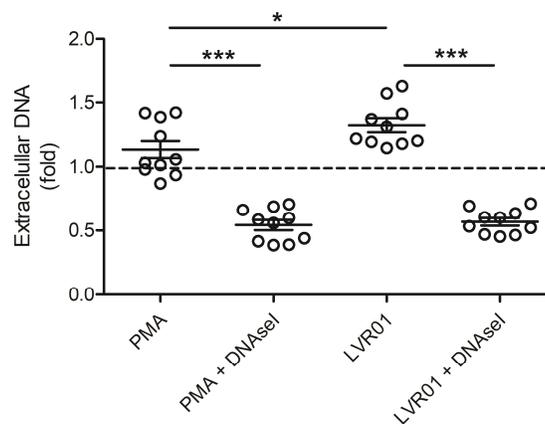


Figura 6.2.4. Incremento relativo de ADN extracelular de macrófagos J774A.1. Las células se incubaron por 30 minutos con PMA o LVR01, con o sin pretratamiento con DNasa I. La línea punteada indica la condición sin estimular. $n=10/\text{condición}$. $*p \leq 0,05$, $***p \leq 0,001$.

Luego se procedió a evaluar el porcentaje de células liberadoras de MET a diferentes relaciones bacteria/célula (MOI 1, 10 y 40:1). Como se observa en la Figura 6.2.5., la relación bacteria:célula sería indiferente para la inducción de este mecanismo, que aumenta significativamente tanto a los 10 como a los 30 minutos. De forma interesante, luego de 60 minutos el porcentaje de células liberadoras de MET es similar en las infectadas que en las sin infectar. Esto podría deberse a que mínimas cantidades de material celular liberado por la muerte de las mismas podría actuar como DAMP, estimulando así una cascada proinflamatoria que incluye citoquinas como IFN γ y TNF α , ambos conocidos inductores de METs [137, 138]. De esta forma, la producción estéril de METs podría estar ocurriendo, amplificando el efecto aún cuando no existe infección en curso. Esta hipótesis fue confirmada transfiriendo sobrenadante de células en cultivo a células frescas, donde se observó liberación de METs pero no ocurrió lo mismo en el control con medio fresco (datos no mostrados).

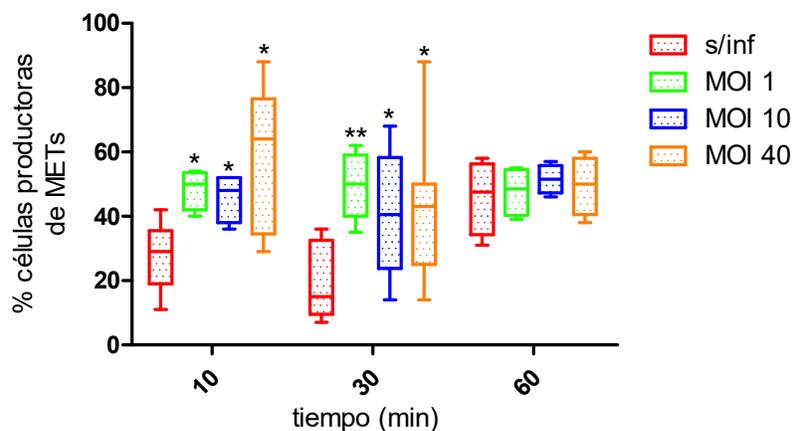


Figura 6.2.5. Porcentaje de macrófagos J774A.1 liberadores de METS luego de infección con *Salmonella*. Las células se infectaron por 10, 30 o 60 minutos con *Salmonella*, MOI 1, 10 o 40. Se contaron tantos campos como fueron necesarios para contar un mínimo de 150 células para cada condición. Los resultados se muestran como media \pm SEM para cada condición evaluada. * indica diferencias significativas entre células infectadas y sin infectar al mismo punto de tiempo, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, Test de Student. Se muestra un experimento representativo de 2 independientes.

Cabe destacar que también observamos y registramos este fenómeno en tiempo real (Video 1, accesible online como Movie M1 en <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.639768/full#supplementary-material>). Un análisis pormenorizado de este video permitió clasificar las bacterias según su comportamiento, conformándose cuatro grupos: (1) aquellas que están atrapadas en la METs durante toda la grabación (n=11), (2) otras que exhiben movimiento libre y luego

son capturadas en la red (n=4), (3) otro grupo que si bien inicialmente se ve retenido luego logra escapar (n=4) y (4) un último grupo de bacterias que se mueven libremente en el campo sin ser retenidas (n=72). Asimismo, el seguimiento de las trayectorias muestra grandes diferencias de cantidad de desplazamiento entre estos grupos [121]. Sumado a esto, detectamos que una vez liberadas las METs, *Salmonella* queda atrapada en las mismas, y muere rápidamente. Esto se evidencia por que el color verde, correspondiente a la fluorescencia de GFP (vale recordar que en todo este capítulo se utilizó una cepa de LVR01 que expresa constitutivamente GFP) comienza a “apagarse” inmediatamente luego de que las bacterias son retenidas en la MET, cambiando finalmente al azul correspondiente al ADN de la bacteria, sin movimiento ni expresión activa de GFP. Si bien no fue evaluado, entendemos que esa muerte puede estar dada por las enzimas presentes en las MET. A MOI mayores, las bacterias se observan mayoritariamente retenidas en “vacuolas contenedoras de *Salmonella*” (SCV, del inglés *Salmonella*-containing vacuoles) (Video 2, accesible online como Movie SM2 en <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.639768/full#supplementary-material>). Dado que es sabido que *Salmonella* es capaz de sobrevivir e incluso replicar en estas vacuolas [139], quizá este es un mecanismo para evitar la liberación de las METs. Si bien está ampliamente descrito que las NETs tienen amplia capacidad microbicida, no hay muchos reportes sobre la toxicidad de las METs en bacterias. En un trabajo de 2014 se observó que las METs inducidas por *E. coli* tendrían capacidad microbicida limitada, logrando matar solo un 11% de las bacterias luego de 60 minutos de incubación [140]. Dadas nuestras observaciones (Video 1) y ese reporte, evaluamos la citotoxicidad de las METs sobre LVR01. Encontramos que en condiciones normales, la inducción de METs mediada por LVR01 deviene en una muerte bacteriana de aproximadamente un 10%, mientras que la DNasa I, que degrada ADN extracelular, abole por completo este efecto (Figura 6.2.6). Considerando la totalidad de las bacterias involucradas en el análisis del Video 1 mencionado más arriba, podemos decir que un 16% de las mismas (15/91) quedaron efectivamente retenidas en la MET (grupos 1 y 2), y si asumimos que luego serán muertas, este porcentaje es similar al obtenido mediante este otro ensayo, reforzando la validez de los resultados.

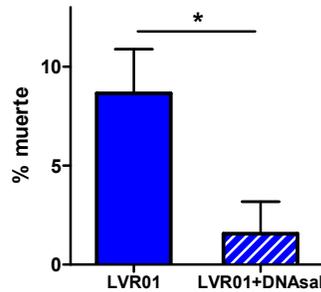


Figura 6.2.6. Porcentaje de muerte bacteriana 60 minutos post infección de macrófagos J774 con LVR01 a MOI 40:1. Las células se incubaron con LVR01, con o sin pretratamiento con DNAsa I y posteriormente se lisaron y se plaqueó el medio en diluciones apropiadas. n=3/condición. Gráfico representativo de cinco ensayos independientes.

Cabe destacar que en el caso de infección a MOI 100:1 no se observó muerte bacteriana (datos no mostrados). Entendemos que esto podría deberse a que como se mencionó anteriormente, a MOI mayores *Salmonella* ingresa a SCVs en lugar de inducir METs, y de esa forma se protege al tener la capacidad de sobrevivir en las mismas. Al lisar las células para plaquear la totalidad de las bacterias sobrevivientes, las mismas se liberan al medio nuevamente y son recuperadas para su recuento. Esto podría sugerir que grandes cargas bacterianas solo pueden ser controladas por fagocitosis, mientras que la liberación de METs es suficiente para controlar cantidades más pequeñas, pero estudios adicionales son necesarios para probar esta hipótesis.

Por lo tanto, podemos decir que LVR01 induce la liberación de METs con limitada capacidad bactericida. La función *in vivo* de estas trampas extracelulares liberadas por macrófagos que muchas veces son residentes y por lo tanto, los primeros respondedores frente a una infección, podría ser un freno para la diseminación de las bacterias, evitando su propagación sistémica. Asimismo, las bacterias podrían ser retenidas en esas METs hasta el reclutamiento de neutrófilos, cuyas NETs son más efectivas para matar microorganismos [140].

La ETosis es un novedoso mecanismo inmune descrito por primera vez para neutrófilos y recientemente también atribuido a macrófagos (revisado en [141]). Hasta la fecha, la liberación de METs se ha observado en respuesta a una variedad de patógenos, incluyendo bacterias gram negativas como *E. coli*, *H. influenza*, *H. somni*, *K. pneumoniae* y *M. haemolytica* [136, 142-144]. En este trabajo describimos por primera vez que *S. enterica* serotipo Typhimurium también induce este mecanismo, aunque Zhao *et al* ya habían reportado la potenciación de las METs por BCA como una forma eficiente de eliminar

bacterias, tanto intra como extracelulares [145]; reforzando nuestros resultados que presentan las METs como un mecanismo bactericida contra *Salmonella*.

En conclusión, hemos descrito por primera vez un nuevo mecanismo inmune inducido por *Salmonella* en macrófagos murinos. El mismo actúa eficientemente reteniendo y eliminando las bacterias infectantes en cuestión de minutos, con concomitante muerte de los macrófagos efectores. La relevancia *in vivo* de este novedoso mecanismo resta por ser evaluada, pero entendemos que este reporte es un aporte relevante al conocimiento de los mecanismos inmunes contra patógenos de relevancia global. El estudio de la relación de estas METs con cáncer excede el alcance de este trabajo pero definitivamente amerita ser abordado (y de hecho un proyecto al respecto será presentado ante los Fondos Vaz Ferreira convocatoria 2021). De todas formas, algunos asuntos interesantes sobre las posibles implicancias de las METs inducidas por *Salmonella* en el contexto del melanoma serán discutidos en la sección 7.

6.3. Capítulo 3 – Rol del inflammasoma en la respuesta anti-tumoral de *Salmonella*

Como vimos en la sección 6.1, *Salmonella* LVR01 induce rápidamente en las células tumorales un tipo de muerte celular programada llamada piroptosis, determinada por la secreción de GSDM-D. La misma es inducida por caspasas inflamatorias, como caspasa-1 y caspasa-11, que son activadas en los inflamasomas [146]. Este capítulo se aboca al establecimiento del rol del inflammasoma en la respuesta anti-melanoma inducida por el tratamiento con *Salmonella* LVR01. Con ese fin, primeramente evaluamos la activación de caspasa-1 en células B16F1 luego de infección con LVR01 (Figura 6.3.1). Encontramos que tanto a tiempos tempranos como tardíos, LVR01 induce significativamente la activación de caspasa-1 en células de melanoma.

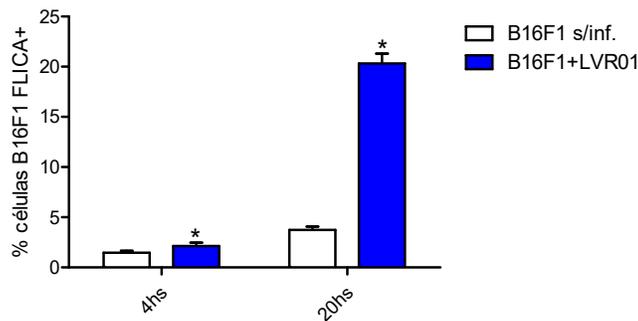


Figura 6.3.1. Porcentaje de células B16F1 positivas para FLICA, luego de 4 o 20 horas de infección con *Salmonella*. n=3. * p<0,05.

Resultados recabados en mis estudios de maestría arrojaron que las células B16F1 en cultivo no expresan niveles detectables de ARN mensajero para *Nlrp3* ni *Nlrc4*, ambos descritos hasta ahora como los únicos receptores del inflammasoma activables por *Salmonella*. En un intento por establecer la vía por la cual *Salmonella* activaría caspasa-1 en células tumorales, en este trabajo buscamos mensajeros para todos los demás receptores citosólicos conocidos capaces de iniciar el ensamblaje del inflammasoma (ver lista completa de genes en Materiales y Métodos, Tabla 4). No se encontró expresión de ARNm de ninguno de ellos por lo que sigue siendo imperativa la búsqueda del receptor que inicia la respuesta. Una hipótesis que podría explicar la activación del inflammasoma independiente de NLRP3 y NLRC4 es que el LPS de *Salmonella* una directamente a caspasa-11, iniciándose la activación no canónica del inflammasoma reseñada en la introducción de este trabajo. Existen varias hipótesis sobre cómo el LPS accedería a la caspasa-11 citoplásmica, pero se sabe que *Salmonella* tiene mecanismos de escape de la

SCV al citosol [147], estando reportado que en los primeros 90 minutos hasta un 20% de las bacterias fagocitadas pueden acceder a este compartimento [148]. Asimismo, estudios recientes indican que la SCV es una estructura dinámica que se agranda y se achica constantemente, y en ese proceso bacterias también acceden al citosol [149]. Otra posibilidad es la liberación de Outer Membrane Vesicles (OMV) como vehículo para llevar el LPS bacteriano al citosol [150]. De forma interesante, en todos estos casos el LPS se uniría a una caspasa-11 que actuaría más como receptor que como efector, demostrando una vez más la versatilidad de funciones que ejercen estas proteínas. Cabe destacar que todas las posibilidades aquí presentadas no son mutuamente excluyentes por lo que es altamente probable que ocurran simultáneamente o al menos secuencialmente en las mismas células. Nuestros resultados indican que 17 horas luego de infección de células B16F1 con *Salmonella* durante una hora, se estimula significativamente la expresión de caspasa-11 a nivel de ARN mensajero (Figura 6.3.2), por lo que podríamos sugerir que el LPS de *Salmonella* está siendo detectado a nivel citosólico, conllevando a un aumento de la activación no canónica del complejo del inflammasoma.

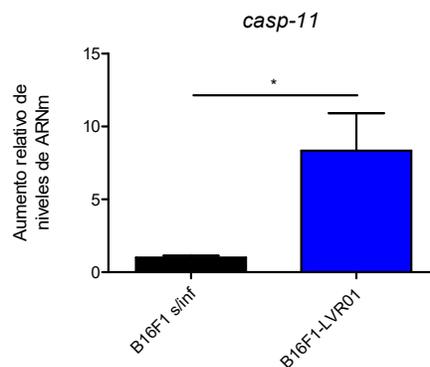


Figura 6.3.2. Aumento relativo de los niveles de ARNm de caspasa-11 en células B16F1 17 horas post infección con *Salmonella* LVR01 durante 1 hora. n=3 por condición. * p<0,05

Considerando que se ha reportado que la producción de IL1 β y TNF α por parte de macrófagos está asociada al control tumoral [61] y la relevancia de la activación del inflammasoma en el contexto del tratamiento de cáncer con *Salmonella* [60], evaluamos la producción de IL1 β y TNF α por parte de BMDM extraídos de ratones deficientes en caspasa-1/11 (a partir de ahora casp-1/11 ko) o su contraparte no defectiva (littermate C57BL/6N), a partir de ahora wt), infectados *in vitro* con *Salmonella* durante 1 hora. Mientras que IL1 β no pudo ser detectada en sobrenadantes de cultivo, encontramos resultados interesantes para TNF α (Figura 6.3.3). Tanto en el caso de los macrófagos wt como ko, encontramos que LVR01 induce un aumento de la liberación de TNF α respecto a

las células sin infectar. Sin embargo, este aumento es significativamente más pronunciado en los ratones carentes de caspasa. Estos resultados podrían indicar una posible vía de respaldo de muerte celular post infección en casos que la piroptosis no puede actuar, decantando por ejemplo, por entrar en necroptosis. Este fenómeno de redundancia de vías de muerte celular no es nuevo y ha sido descrito como un posible mecanismo evolutivo de “backup” (revisado en [151]). Particularmente la muerte por necroptosis en ausencia de caspasas ha sido descrita anteriormente, aunque por inhibición de caspasa-8 y no 1/11 (ampliamente revisado en [152]).

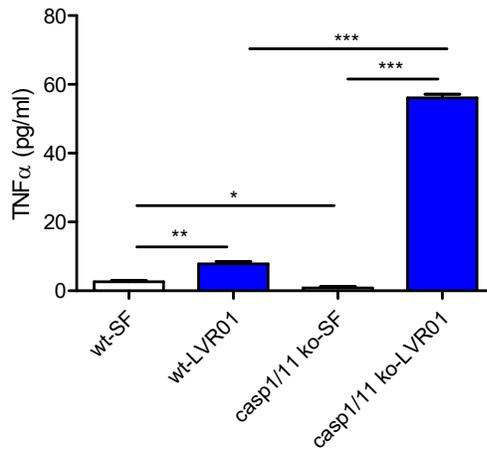


Figura 6.3.3. Niveles de TNF α en sobrenadantes de cultivo de BMDM wt y casp-1/11 ko 1h post tratamiento con *Salmonella*. n=3/condición. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Como siguiente paso nos planteamos definir si la activación del inflammasoma mediada por *Salmonella* está involucrada en la respuesta antitumoral inducida. Resultados previos de mi trabajo de maestría indican que el tratamiento con *Salmonella* induce en el microambiente tumoral el aumento en la expresión de los receptores *Nlrp3* y *Nlrc4*, así como *pro-IL1 β* . Dado que no detectamos expresión de estos mRNAs en células tumorales *in vitro*, entendemos que el aumento en la expresión de estos genes se corresponde a las células inmunes infiltrantes del tumor. Para profundizar en este asunto usamos ratones casp-1/11 ko, ya que sus células inmunes son defectivas para la correcta activación del inflammasoma, mientras que las tumorales implantadas en ellos no lo son. En ese sentido, primeramente verificamos que la implantación de tumores B16F1 fuera equiparable entre los ratones wt y los casp-1/11 ko. Comprobamos que los tumores B16F1 crecen con la misma cinética en ambas cepas de ratones y que la sobrevida de ambas es comparable (figura 6.3.4.A) por lo que este modelo sirve para el uso propuesto. Posteriormente, evaluamos crecimiento tumoral y sobrevida de ratones wt o casp-1/11 ko luego de la

administración de una única dosis intratumoral de *Salmonella*. Tal como se observa en la Figura 6.3.4.B, el efecto antitumoral de *Salmonella* se ve abrogado en los ratones casp-1/11 ko, cuyo crecimiento tumoral y sobrevida es similar al de los ratones sin tratamiento. Esto nos permite afirmar que el efecto antitumoral de *Salmonella* está, aunque sea en parte, mediado por la activación del inflamasoma en células no tumorales.

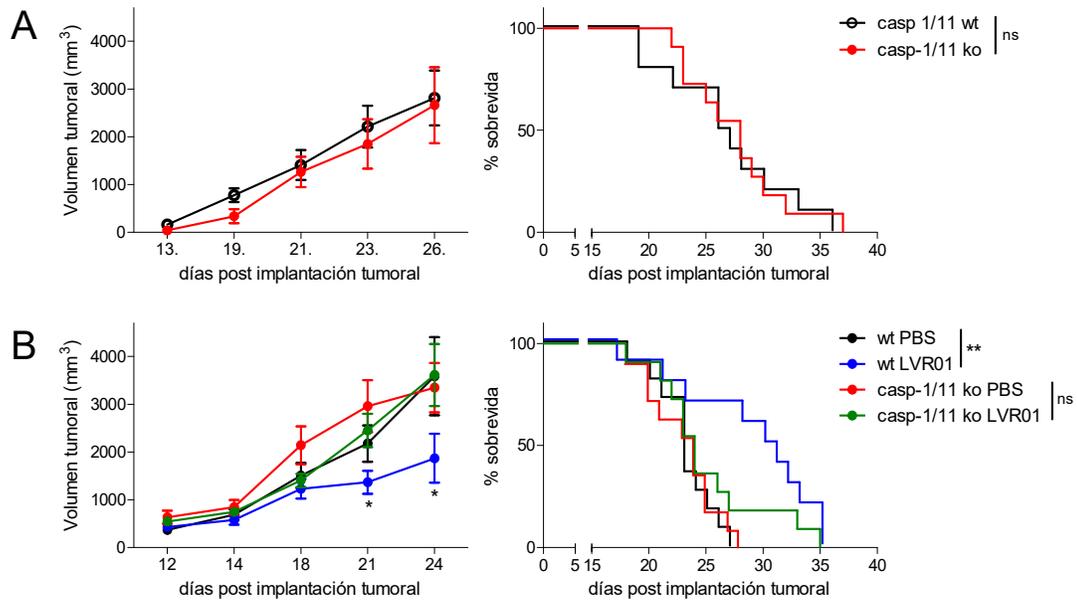


Figura 6.3.4. Curvas de crecimiento tumoral y sobrevida de ratones wt y casp-1/11 ko durante la puesta a punto (A) o luego del tratamiento con *Salmonella* (B). n=12-13/grupo. * p<0,05, ** p<0,01, PBS vs. LVR01.

Asimismo se evaluó mediante ELISA la producción de IL1 β a nivel de microambiente tumoral, encontrándose un aumento significativo en los niveles de proteína madura sólo en los ratones casp-1/11 wt (Figura 6.3.5).

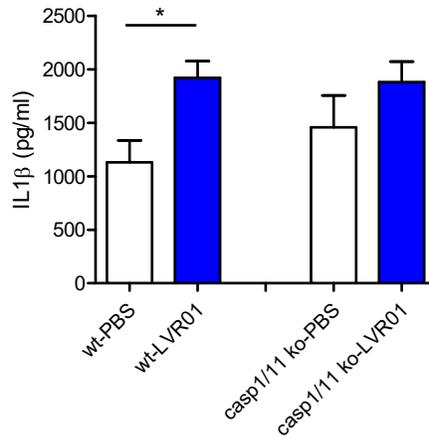


Figura 6.3.5. Niveles de IL1 β en homogenizados de tumores de ratones wt y casp-1/11 ko 24 hs post tratamiento con *Salmonella*. Datos representativos de tres ensayos independientes. n=12-13/grupo. * p<0,05 PBS vs. LVR01.

Si bien las diferencias observadas son significativas solo en el caso de los ratones wt, es llamativo que de todas formas observamos producción de IL1 β en los ratones caspasa1/11 ko, con o sin tratamiento. En este punto cabe recordar que los animales son casp1/11 ko pero las células tumorales implantadas no lo son, por lo que una explicación podría ser que toda la IL1 β provenga de las células de melanoma. Sin embargo, resultados previos de mi trabajo de Maestría sugieren que estas B16F1 no serían la fuente de esta citoquina, ya que no detectamos mensajeros de Il1b en cultivos celulares de las mismas. Recientemente y cada vez con más énfasis se ha señalado por diferentes grupos de investigación que existe una íntima conexión entre las vías ejecutoras de los distintos tipos de muerte celular y que incluso el inflamasoma, la caspasa-1 y la caspasa-8 tienen roles redundantes, y se pueden activar en un complejo PAN-optótico para promover inflamación (revisado en [153], ver sección 7 de este trabajo). Esto sugeriría entonces que la caspasa-8, clásicamente clasificada como apoptótica, podría estar siendo la responsable del clivaje de IL1 β .

A nivel celular analizamos el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos al tumor 24 horas luego del tratamiento con *Salmonella*, tanto en ratones wt como caspasa-1/11 ko. En líneas generales, encontramos que los ratones caspasa-1 ko fallan al reclutar neutrófilos y macrófagos al sitio tumoral en comparación con los ratones wt (Figura 6.3.6, arriba), y a su vez en estas células reclutadas aumenta significativamente la activación de caspasa-1 (Figura 6.3.6, abajo).

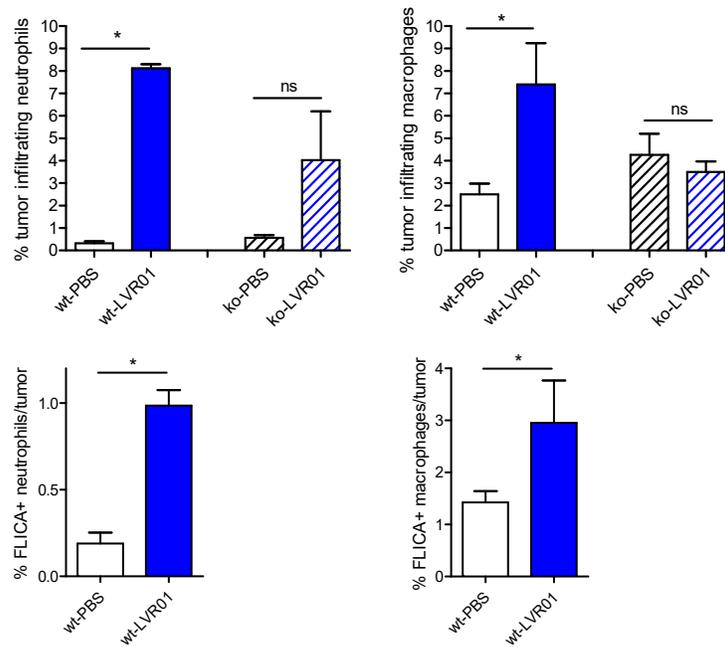


Figura 6.3.6. Porcentaje de neutrófilos y macrófagos infiltrantes de tumor (arriba) y FLICA+ (abajo) 24 hs post tratamiento con *Salmonella*. Datos representativos de dos experimentos independientes. n=4-7/grupo. * p<0,05

Se sabe que *Salmonella* activa el inflammasoma a través de los receptores Nlr4 y Nlrp3 [146]. A su vez, trabajos previos de nuestro grupo de investigación utilizando una cepa de *Salmonella* LVR01 carente de flagelina (LVR01flag-) revelan que la misma (que es reconocida por Nlr4) no tiene gran relevancia en el efecto antitumoral de *Salmonella* [154]. Dadas ambas observaciones nos planteamos definir aún más la participación del inflammasoma en el efecto antitumoral, utilizando ratones deficientes en Nlrp3 ya que este receptor está “más arriba” en la cascada molecular de activación de Caspasa-1. En ese sentido, nuevamente verificamos que la implantación tumoral fuera equiparable a los ratones wt y comprobamos que los tumores B16F1 crecen con la misma cinética en ambas cepas de ratones y que la sobrevida de ambas es comparable (datos no mostrados). Posteriormente evaluamos crecimiento tumoral y sobrevida de ratones wt o nlrp3 ko luego del tratamiento y tal como se observa en la Figura 6.3.7, el tratamiento con *Salmonella* induce un retardo en el crecimiento tumoral tanto en wt como en ko. Sin embargo, la diferencia en el retardo del crecimiento es más evidente en el wt que en ko lo que se refleja en que en la gráfica de sobrevida solo observamos una prolongación significativa debida al tratamiento en los animales wt. Creemos importante señalar que ocasionalmente sí hemos observado mayor sobrevida por el tratamiento en los ratones ko (ver grupos correspondientes en Fig. 6.3.8 B), por lo que creemos que nos encontramos en

una zona “borderline”, donde en todo caso, siempre hay una tendencia a la mejoría inducida por *Salmonella*.

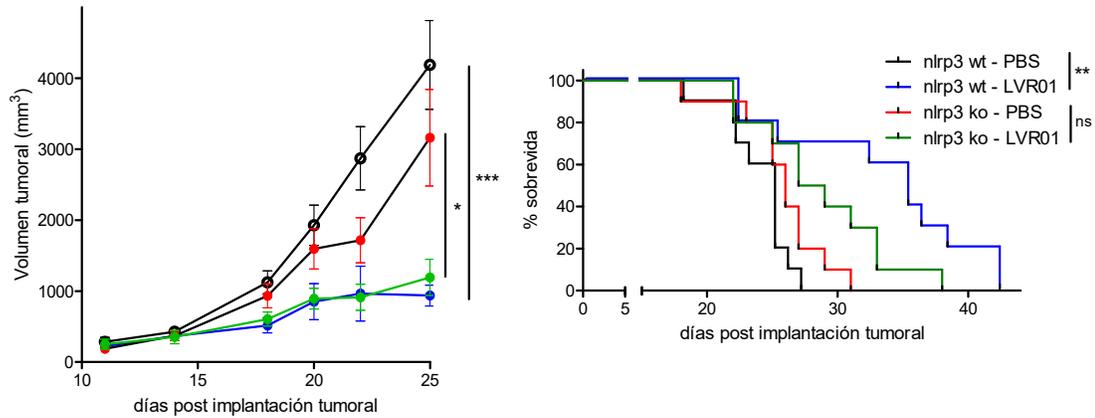


Figura 6.3.7. Curvas de crecimiento tumoral y sobrevivencia de ratones wt y nlrp3 ko luego del tratamiento con *Salmonella* LVR01. n=12-13/grupo. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 PBS vs. LVR01.

Dadas estas observaciones nos propusimos ir un paso más adelante, combinando el uso de ratones deficientes en Nlrp3 con el uso de la cepa LVR01flag-. En ese sentido, encontramos resultados interesantes. Primeramente, observamos que en los ratones wt, *Salmonella* exhibe efecto antitumoral aún en ausencia del flagelo (wt-PBS vs wt-LVR01, p<0,0001; wt-PBS vs wt-LVR01flag-, p=0,0073) (Figura 6.3.8A). Este hecho, ya observado en mi tesina de grado en un modelo de linfoma a células B (presentado en forma oral en [154]), podría deberse a la redundancia existente entre Nlrp3 y Nlrc4 [47]. Sin embargo, en ausencia de Nlrp3 *Salmonella* mantiene su efecto antitumoral solamente cuando tiene flagelo (ko-PBS vs ko-LVR01, p=0,0212; ko-PBS vs ko-LVR01flag-, p=0,2195) (Figura 6.3.8B).

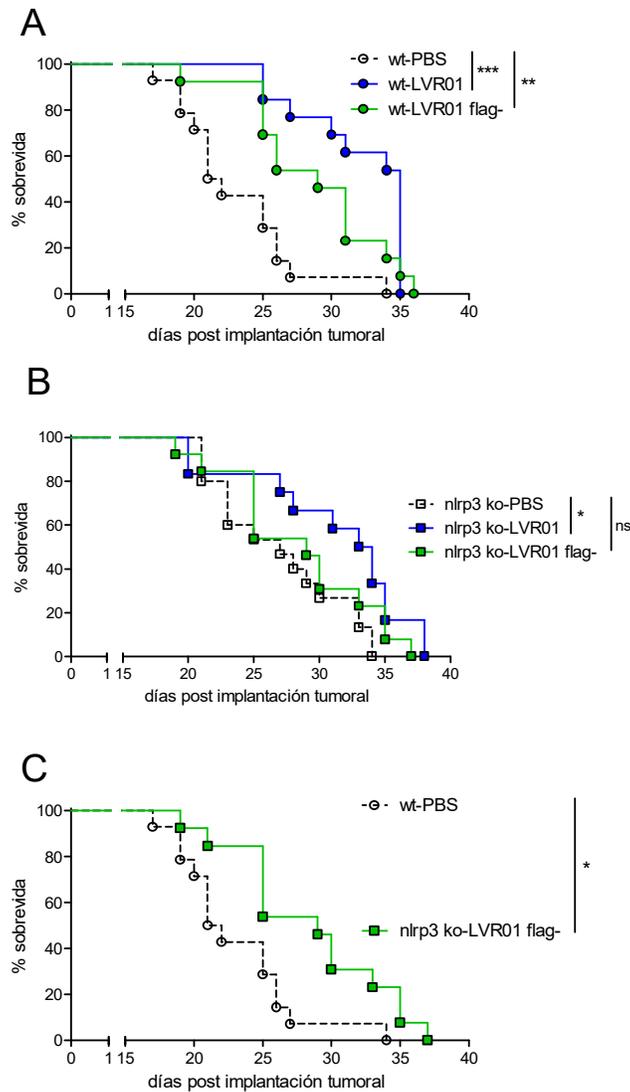


Figura 6.3.8. Curva de supervivencia de ratones wt (A) y *nlrp3* ko (B) luego del tratamiento con *Salmonella* LVR01 o LVR01flag-. (C) Comparación entre wt-PBS y ko-LVR01flag-. n=12-13/grupo.

A pesar de todo esto, cuando comparamos animales wt sin tratar con animales ko tratados con *Salmonella* aflagelada (o sea, en ausencia de *Nlrp3* y la señal más estudiada para *Nlrc4*), aún encontramos diferencias significativas en la prolongación de la supervivencia, de más de una semana (wt-PBS vs ko-LVR01flag-, $p=0,0111$) (Figura 6.3.8C). Esto nos daría la pauta de que *Salmonella* tiene otras formas de inducir, ya sea directa o indirectamente, el reconocimiento *in vivo* y así desencadenar mecanismos que conllevan a una respuesta efectiva contra el melanoma. En el siguiente capítulo ahondaremos en esas moléculas que podrían estar contribuyendo al efecto antitumoral de LVR01.

Dados los resultados expuestos hasta aquí, la activación del inflamasoma inducida por *Salmonella* parecería ser esencial para el efecto antitumoral de la misma. Esto está en concordancia con reportes del grupo de Min y colaboradores, que evaluaron la supresión de varios tipos de carcinoma de colon en ratones tratados de forma intravenosa con *Salmonella* Typhimurium atenuada [60, 61]. Al igual que ellos, nosotros encontramos que esta induce rápidamente a nivel intratumoral el aumento significativo en los mensajeros de IL1 β y TNF α , así como un aumento en el nivel de IL1 β secretada. Respecto a TNF α , nosotros también encontramos aumentos importantes a nivel de mensajero pero no evaluamos a nivel de proteína. Uno de los mecanismos sugeridos por los autores involucra la liberación ATP como señal de daño por parte de las células tumorales infectadas con *Salmonella*, mientras que nosotros reportamos en este trabajo que LVR01 induce en las células tumorales la liberación de HMGB-1, otro patrón molecular asociado a daño. Por otra parte, ellos resaltan la importancia de la interacción directa entre bacterias y macrófagos, que desencadena el aumento en la expresión de componentes asociados al inflamasoma por parte de estos últimos. En ese sentido, fuimos un paso más adelante, al evaluar el efecto de *Salmonella* en animales deficientes en inflamasoma, comprobando la relevancia de este complejo.

6.4. Capítulo 4 – Evaluación de la contribución individual de distintas moléculas activadoras del inflamasoma al efecto antitumoral de *Salmonella*

Dados los resultados presentados anteriormente, en este capítulo nos abocamos a generar y evaluar tanto *in vitro* como *in vivo* cepas de *Salmonella* LVR01 carentes de moléculas activadoras del inflamasoma, de forma de estudiar la contribución individual de estas moléculas al efecto antitumoral observado. Mediante herramientas bioinformáticas corroboramos la presencia de estas proteínas en nuestra cepa de trabajo, la cual estaba previamente secuenciada (datos no publicados). Comprobamos que los genes *prgJ*, *sipB* e *invG* están presentes en el genoma de LVR01, mientras que *sopE* está ausente. Esto viene en la línea de lo descrito para este gen, que al estar codificado dentro de una región de profago, solo está presente en muy pocos aislados de *Salmonella*, generalmente asociados con epidemias graves [155]. Por esa razón, no se tuvo en cuenta esta proteína y se generaron cepas mutantes en las proteínas PrgJ, SipB e InvG (a partir de ahora prgJ-, sipB- e invG-). Cabe mencionar que no se generaron y evaluaron mutantes aflagelados en el contexto de este trabajo porque esto ya se realizó en una instancia previa [154].

Respecto a la construcción de estas cepas mutantes se dedicarán algunos párrafos a la descripción de los resultados intermedios que llevaron a la obtención exitosa de las mismas, ya que consideramos que su preparación en sí constituye un resultado importante. Como se mencionó en la sección 5.3, para construirlas se utilizó el método de inactivación génica en un solo paso descrito por Datsenko [87]. La primera etapa consiste en sustituir los genes a inactivar por cassettes de resistencia a diferentes antibióticos de selección por lo que se comenzó amplificando por PCR en tiempo final los cassettes de cloranfenicol o kanamicina de los plásmidos pKD3 o pKD4 respectivamente usando los cebadores P1 (forward) y P2 (reverse) (Tabla 2, sección 5.3). Luego se diseñaron cebadores específicos considerando las secuencias flanqueantes a cada gen a inactivar y las secuencias de P1 y P2 provistas por los autores (Tabla 3, sección 5.3), de modo de obtener por PCR el cassette de resistencia antibiótica fusionado a las regiones adyacentes al gen a inactivar. Todas las PCR debieron ser optimizadas respecto a lo reportado por los autores, en relación a la temperatura y ciclado por características particulares de los cebadores que diseñamos. Finamente estos amplicones “híbridos” fueron separados en geles de agarosa 0,8% y la banda correspondiente al tamaño esperado en cada caso (prgJ e invG: 1114 pb, coinciden ya que se usó el mismo gen de resistencia a antibióticos, cloranfenicol; y sipB: 1578 pb, correspondiente a kanamicina) fue recortada del gel y el ADN extraído. En la Figura 6.4.1 se observa que efectivamente se extrajeron fragmentos de

ADN del tamaño deseado. Se aprecia también que quedaron algunos remanentes de ADN en el gel aún luego de la extracción, pero se priorizó maximizar la cantidad de material genético llevándose la menor cantidad de gel posible ya que dificulta la posterior extracción del ADN.

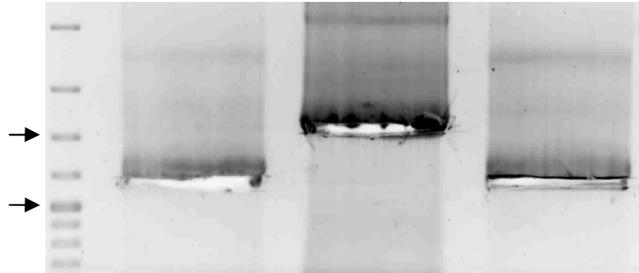


Figura 6.4.1. Verificación de la extracción de ADN a partir de gel. Carril 1: Marcador de peso molecular #SM0321. Se señalan con flechas las bandas de 1500 pb (arriba) y 1000 pb (abajo). Carril 2: Inserto para inactivar *prgJ*. Carril 3: Inserto para inactivar *sipB*. Carril 4: Inserto para inactivar *invG*.

Posteriormente se verificó que el ADN extraído no estuviera degradado y se transformó en células electrocompetentes de LVR01-pKD46. Estas permiten la recombinación inducible por arabinosa, de forma de reemplazar el ADN híbrido por el gen cromosómico que se desea anular mediante recombinación homóloga. La selección de las colonias recombinantes se realizó en medio con el antibiótico correspondiente (kanamicina para *prgJ* o *invG* y cloranfenicol para *sipB*-), y además se testeó que no crecieran en medio con ampicilina (ya que pKD46 presenta esa resistencia pero el plásmido se pierde al crecer la bacteria a 37°C debido a su termolabilidad).

Finalmente se verificó de distintas formas que el ADN genómico de los mutantes tuviera las características deseadas. Para esto se hizo una extracción rápida de ADN de colonia y se realizaron tres PCR diferentes para cada nueva cepa:

- PCR #1: Con un cebador genérico F por fuera del inserto y otro dentro del mutante, de forma de solo ver amplificación si ocurrió la inactivación.
- PCR #2: Con un cebador que hibrida dentro del mutante y otro cebador genérico R por fuera del inserto, de forma de solo ver amplificación si ocurrió la inactivación.
- PCR #3: Con cebadores genéricos, fuera del cassette, de forma de ver amplicones del tamaño del cassette, aproximadamente.

En la Figura 6.4.2 se muestran los resultados finales obtenidos, y que los mismos concuerdan con los tamaños esperados. Para que el análisis sea sencillo, los mismos se

presentan a continuación en la Tabla 1, donde se encuentran los tamaños esperados para cada reacción, para cada cepa, siempre en comparación con la cepa LVR01 parental.

Tabla 1. Tamaño esperado (en pares de bases) de los amplicones resultantes de las distintas PCR en función de si funcionó la inactivación (columna “mutante”) o si no funcionó (columna “LVR01”). Las cruces indican los casos en los que no se espera amplificación.

	prgJ-		sipB-		invG-	
	mutante	LVR01	mutante	LVR01	mutante	LVR01
PCR1	184	X	578	X	171	X
PCR2	269	X	1001	X	272	X
PCR3	1197	438	1669	1973	1187	1859

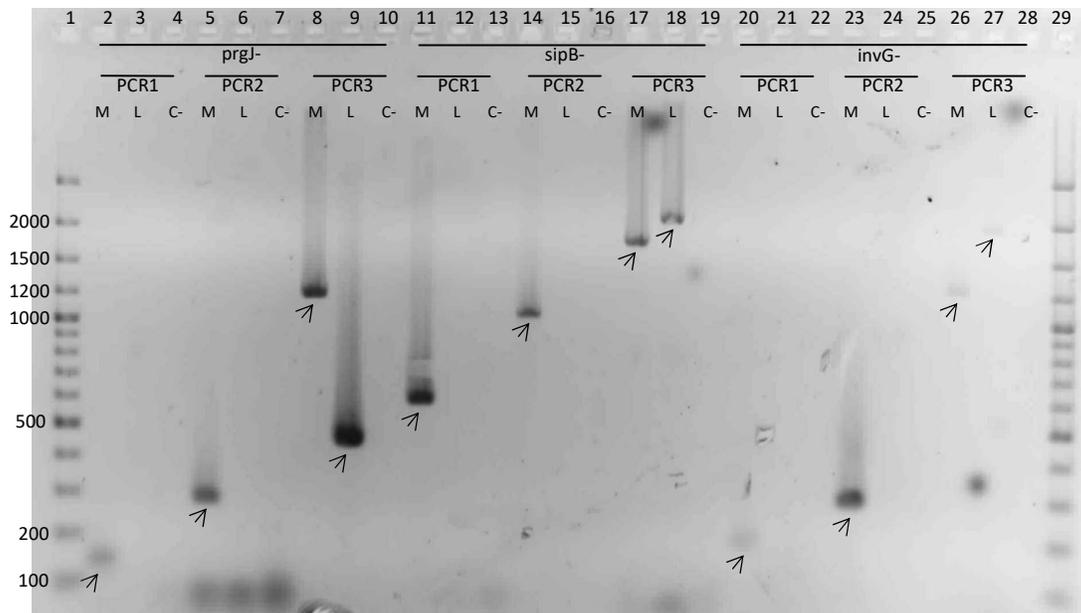


Figura 6.4.2. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Carril 1 y 29: Marcador de peso molecular #SM0321. En todos los casos, para cada cepa mutante a evaluar se la sembró primero (M), luego el control LVR01 (L) y luego el control negativo (C-). Ejemplo: Los carriles 2-4 corresponden a la PCR1 para el presunto mutante prgJ-. 2: amplicón de la cepa mutante, 3: amplicón de la cepa parental LVR01, 4: control negativo. Las flechas indican la banda correspondiente al tamaño esperado.

Respecto a la caracterización de las nuevas cepas, primeramente se confirmó que el proceso de electroporación no hubiese afectado el LPS de las bacterias, mediante un ensayo de aglutinación. Los antígenos somáticos (antisuero O:4) dieron todos positivos y la autoaglutinación dió negativa en todos los casos, confirmando que el LPS se encuentra íntegro.

Luego evaluamos su crecimiento tanto en medio de cultivo de bacterias como en medio de cultivo celular, verificando que todas crecen a la misma velocidad menos prgJ-, que en ambas condiciones crece más lento (Figura 6.4.3). Esto podría deberse a cambios inadvertidamente generados durante el proceso de inactivación génica, ya que solo evaluamos la proximidad del gen mediante PCR pero no chequeamos que el cassette no se hubiera insertado en algún otro lado del genoma. Por esa razón, proponemos a futuro secuenciar la cepa prgJ- y compararla *in silico* con la cepa parental LVR01, de forma de determinar si alguna secuencia distante fue modificada.

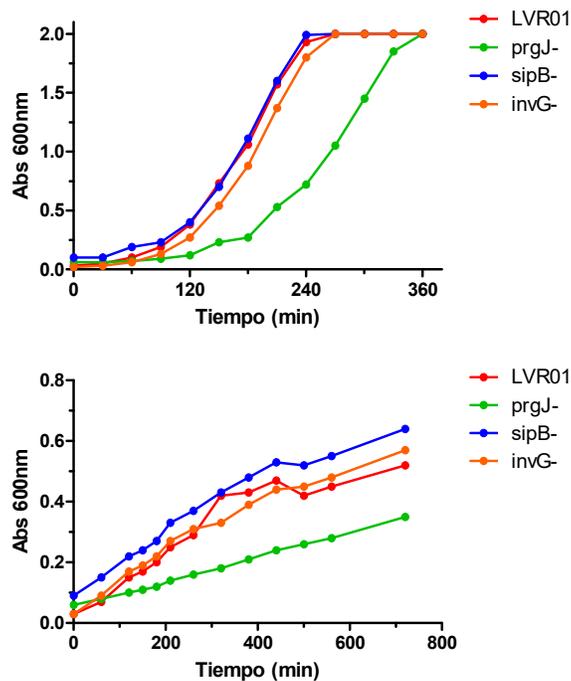


Figura 6.4.3. Curva de crecimiento de LVR01 y los mutantes en LB (arriba) o DMEM (abajo).

Para finalizar la caracterización *in vitro*, se estudió la activación del inflammasoma inducida por las diferentes cepas tras infectar células J774 en cultivo. En ese sentido encontramos que efectivamente se observa una marcada disminución del porcentaje de células FLICA positivas inducida por cualquiera de las mutantes respecto a la cepa parental a tiempos tempranos (Figura 6.4.4). La activación del inflammasoma conlleva a la muerte de los macrófagos, observando en este caso que solo LVR01 sería citotóxica, mientras que las mutantes no (Figura 6.4.5).

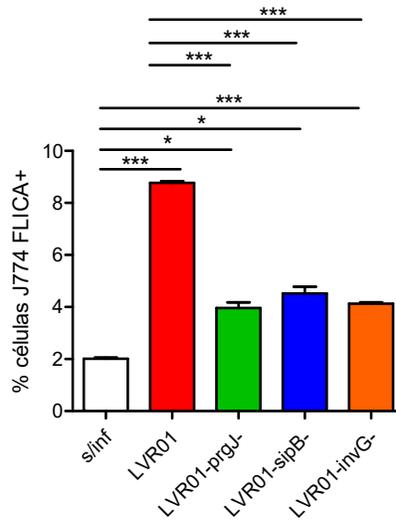


Figura 6.4.4. Porcentaje de células J774 positivas para FLICA 4 horas post infección de 1 hora con *Salmonella* (respectivamente). n=4/condición. *p≤0,05, ***p≤0,001

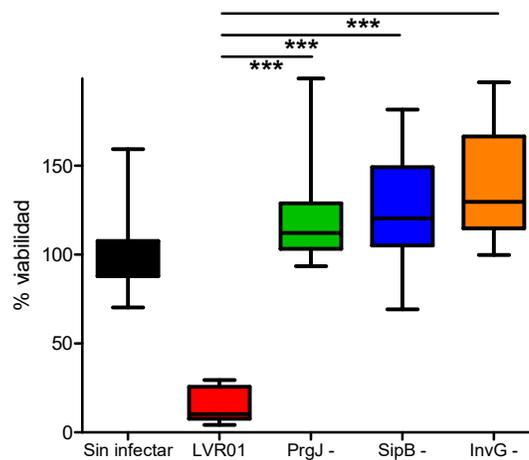


Figura 6.4.5. Evaluación de viabilidad celular mediante MTT de células J774 24 hs post infección de 1 hora con *Salmonella*. Datos acumulativos de tres experimentos independientes. n=10/condición. ***p≤0,001

Por otra parte, a tiempos más tardíos los mutantes sí llevan a un aumento significativo del porcentaje de macrófagos FLICA positivos (Figura 6.4.6), mientras que esto ya no se observa para el caso de la parental, probablemente porque la mayoría de las células ya murieron. Esto indicaría que más allá de que a tiempos tempranos los mutantes tengan un rezago en la activación del inflammasoma en macrófagos, efectivamente tienen la capacidad de hacerlo.

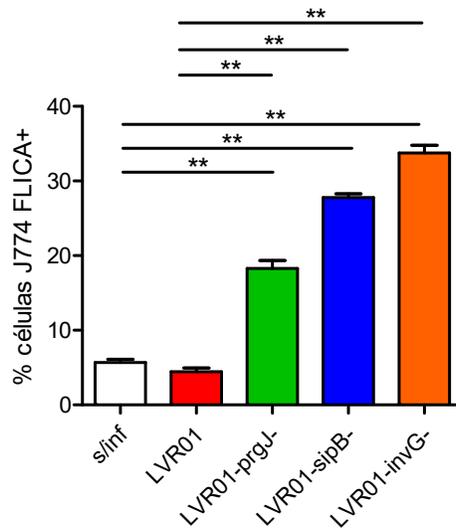


Figura 6.4.6. Porcentaje de células J774 positivas para FLICA 24 horas post infección de 1 hora con *Salmonella* (respectivamente). n=4/condición. **p≤0,01

En cuanto a la invasividad de los mutantes sobre las células tumorales, se encontró que los mismos disminuyen su capacidad de invadir células B16F1 en cultivo respecto a la cepa parental (Figura 6.4.7); resultado si se quiere esperado ya que las mismas carecen de moléculas involucradas justamente en la invasión celular. Esto a su vez puede explicar el rezago observado en la activación del inflammasoma mencionado más arriba.

Sin embargo, un resultado sorprendente observado sistemáticamente en estos ensayos fue que la cepa sipB- es capaz de replicarse dentro de las células, incluso más que LVR01. Esta “ventaja replicativa” quizá podría explicarse por el hecho de que la bacteria “pasa más desapercibida” ya que no inyecta ese efector, y por lo tanto, la célula no ejecutaría ningún mecanismo bactericida contra ella, permitiéndole replicar libremente. Cabe recordar que sipB es un efector inyectado por la bacteria dentro de la célula eucariota, mientras que las otras dos moléculas mutadas (prgJ e invG) son estructurales de la aguja. Por lo tanto, en función de estos resultados hipotetizamos que la presencia o ausencia de proteínas estructurales del SST3 no incidiría sobre la detección de *Salmonella* por parte de la célula diana, mientras que la presencia del efector dentro de la célula sí sería clave. Otra explicación un poco más metodológica es que dada la capacidad de *Salmonella* de inducir muerte en las células, aunque los números de bacterias por célula se mantuvieran o aún aumentaran dentro de las mismas, al haber muerte celular se liberan las bacterias al medio extracelular donde actúa la gentamicina, y de esta manera al plaquear bacterias intracelulares estaríamos subestimando su número total. Este asunto no puede resolverse ya que la gentamicina en el medio extracelular es necesaria para discernir bacterias dentro

de la célula de aquellas fuera. De todas maneras, esto no explicaría porqué se ve mayor recuento solo en las sipB- y no en las otras mutantes, aunque podría deberse simplemente a cambios en la cinética de muerte y “emparejarse” a tiempos más tardíos, no evaluados.

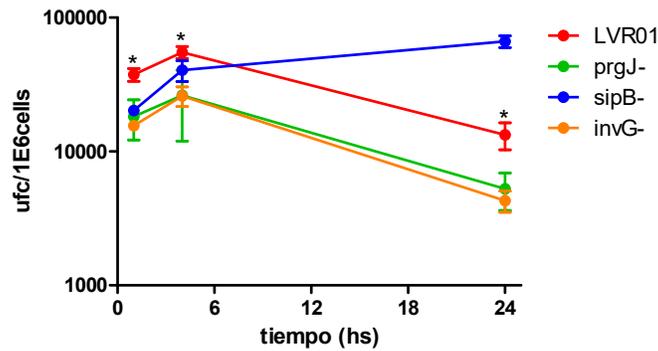


Figura 6.4.7. Unidades formadoras de colonia (UFC) de las distintas cepas de *Salmonella* por millón de células de melanoma B16F1. Las células fueron infectadas a una MOI 100:1 durante una hora y luego se utilizó gentamicina para la eliminación de las bacterias que no ingresaron a la célula. Las células fueron lisadas y las bacterias plaqueadas para recuento luego de 1, 4 o 24 horas. Resultados representativos de dos experimentos independientes. Cada condición fue ensayada por triplicado. * $p \leq 0,05$ indica diferencias entre LVR01 y cualquiera de los mutantes.

Para corroborar si efectivamente sipB- replicaba más a nivel intracelular, recurrimos a la microscopía confocal. Mediante esta técnica encontramos que había aproximadamente el doble de sipB- que de LVR01; sin embargo, no a nivel intracelular sino más bien en la proximidad a la membrana (Figura 6.4.8).

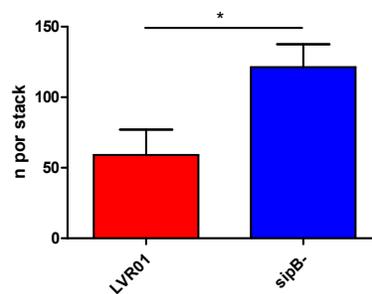
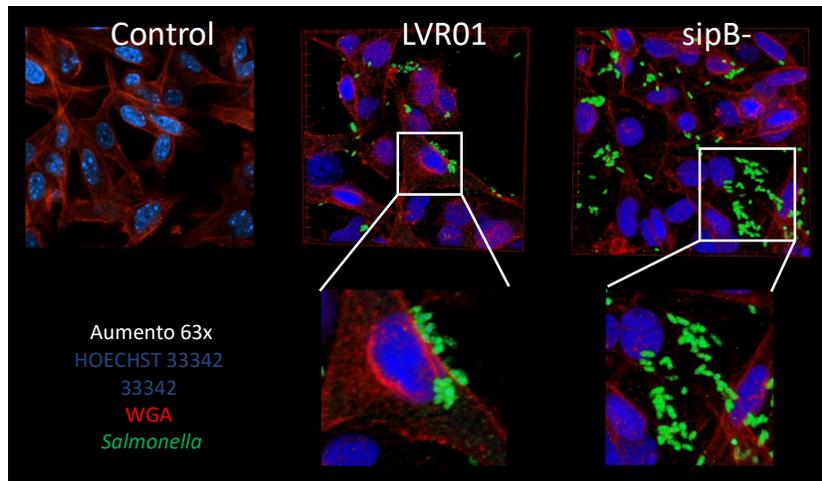


Figura 6.4.8. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de células B16F1 4 hs post infección (arriba) y posterior análisis cuantitativo (abajo). Se adquirieron y evaluaron 3 stacks por cada condición. * $p \leq 0,05$

Este hallazgo nos sorprendió ya que se utilizó gentamicina a una concentración bactericida (puesta a punto previamente), por lo que evaluamos la posibilidad de que sipB- forme biofilms, y de esa manera evada parcialmente la actividad de la gentamicina. En ese sentido encontramos que sorprendentemente, todos los mutantes aumentan significativamente su capacidad de formar biofilms respecto a la cepa parental (Figura 6.4.9). De hecho, siguiendo el criterio de Stepanovic *et al* 2000 (ver sección 5.6), LVR01 se definiría como formador de biofilms moderado mientras que los mutantes serían fuertes formadores de biofilms [91]. Si bien esto podría explicar el recuento superior de sipB- respecto a LVR01 en la proximidad de estas células, no observamos lo mismo para los otros mutantes.

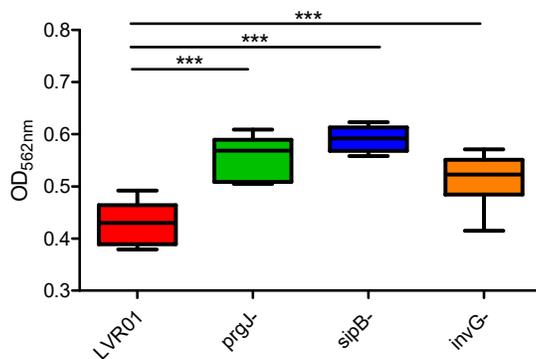


Figura 6.4.9. Evaluación de la capacidad de formación de biofilms de las distintas cepas luego de 72 horas de crecimiento. Datos representativos de dos experimentos independientes. n=7-9/condición. ***p≤0,001

Respecto a la viabilidad de las células B16F1 frente a la infección con LVR01 o sus mutantes, encontramos que si bien todas las cepas utilizadas inducen en cierta medida la muerte celular, prgJ- lo hace en menor medida que LVR01 (Figura 6.4.10). Atribuimos esto a lo observado anteriormente respecto a una velocidad de crecimiento más lenta de esta cepa (Figura 6.4.3), por lo que hipotetizamos que alcanzadas las mismas ufc, más tarde en el tiempo se alcanzan niveles de muerte inducida equivalentes.

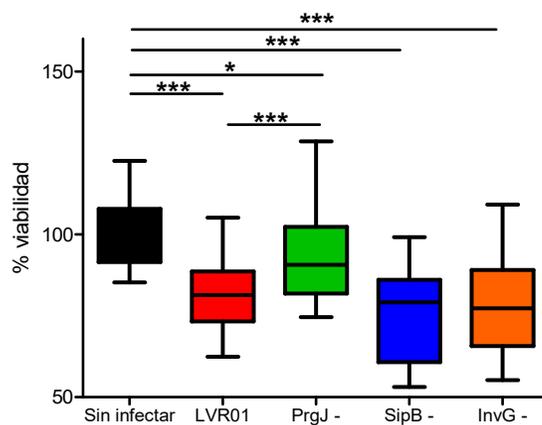


Figura 6.4.10. Evaluación de viabilidad celular mediante MTT de células B16F1 24 hs post infección de 1 hora con *Salmonella*. Datos acumulativos de tres experimentos independientes. n=10/condición. ***p≤0,001

Respecto a la evaluación *in vivo* de la capacidad antitumoral de los mutantes, los mismos se administraron de forma intratumoral a ratones portadores de melanoma subcutáneo no metastásico. Encontramos que si bien todas las cepas lograban un enlentecimiento en el crecimiento tumoral en comparación con el control al día 19 a excepción de prgJ- (PBS vs

prgJ-, $p=0,0764$; hecho que nuevamente se podría explicar porque crece más lento, Fig. 6.4.3), únicamente invG- era comparable con LVR01 en cuanto a esta capacidad (LVR01 vs invG-, $p=0,2891$; Fig. 6.4.11, izquierda). A pesar de todo eso, todos los mutantes inducen la misma prolongación de la sobrevida que la cepa parental (LVR01 vs prgJ-, $p=0,3356$; LVR01 vs sipB-, $p=0,8226$; LVR01 vs invG-, $p=0,3538$), siendo la variación entre la media de sobrevida inducida por cepa parental y los mutantes de menos de dos días (Figura 6.4.11, derecha). Entendemos que esto puede deberse a que los mutantes son simples, por lo que la falta de alguna molécula se vería compensada por las otras. Esta hipótesis se sustenta en la observación de deficiencia en la activación temprana del inflammasoma en macrófagos por parte de los mutantes, que es compensada a tiempo más tardíos (Fig. 6.4.6.). Aún así, el rol de la activación temprana del inflammasoma en macrófagos sigue vigente ya que LVR01 evidencia el mayor potencial anti-tumoral (Fig. 6.4.11, izquierda).

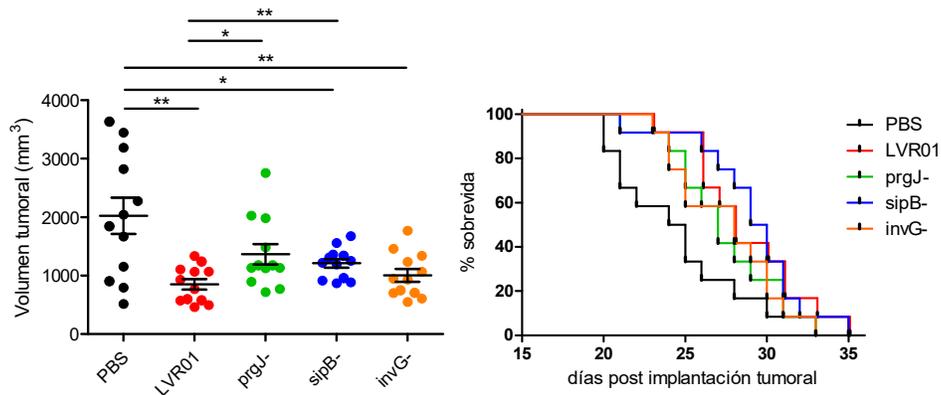


Figura 6.4.11. Tamaños tumorales al día 19 (izquierda) y sobrevida global (derecha) de ratones C57BL/6 portadores de melanoma tratados con LVR01 o las diferentes mutantes. $n=12-13$ /grupo.

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$

Colectivamente nuestros resultados indican que si bien estas moléculas se indican en bibliografía como activadoras de inflammasoma, y de hecho, comprobamos que su inactivación individual falló en activar este complejo en células J774 a tiempos tempranos *in vitro* (Figura 6.4.4), la carencia de las mismas *in vivo* no genera grandes consecuencias para la respuesta inmune del hospedador. Planteamos entonces a futuro generar mutantes múltiples, incluso uno cuádruple (incluyendo FliC) y así evaluar todas estas vías en conjunto. Particularmente, el grupo de Hoffman y colaboradores reportó en 2010 que la inactivación de SipB e InvG abolía completamente la activación de caspasa-1 en macrófagos [55]. Otros factores a tener en cuenta, como el LPS, serán abordados más adelante (ver sección 7).

Aún así, una gran limitante de este tipo de ensayos es que la inactivación de estas moléculas puede llevar a la alteración de ciertas características patogénicas, independientes de la activación del inflamasoma, que pueden variar su potencial como inmunoterapia. Por ejemplo, el efecto anti-tumoral disminuido por parte de prgJ- (reflejado en tamaños equivalentes al control sin tratar al día 19, Fig. 6.4.11, izquierda) podría explicarse por su menor capacidad de crecimiento, o la diferencia del recuento entre sipB- con respecto a LVR01 (Fig. 6.4.7) podría deberse a su mayor capacidad formar biofilms.

Resultó llamativo que si bien PrgJ es una proteína estructural del SST3 -por lo que no estaría relacionada con el crecimiento bacteriano *per se*-, su falta retrasa significativamente la replicación de LVR01. En una revisión publicada en 2014 los autores exploran otros roles no patogénicos de este sistema y describen un trabajo en el que una bacteria endosimbionte de la mosca tse-tse, *Sodalis glossinidius*, requiere del SST3 para replicar dentro de células del insecto [156, 157]. Esto sugeriría que el SST3 podría llegar a modular de alguna forma el crecimiento bacteriano. En esa misma revisión se cita otro trabajo en el que cepas mutantes de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium, ya sea en flagelina o SipB, alcanzan mayores números que la cepa salvaje cuando colonizan la leguminosa *Medicago trunculata* [158]. Los autores sugieren que la falta de ese translocón efector es aunque sea parcialmente responsable de la disminución de la respuesta de defensa de la planta y por lo tanto esto explicaría la “hipercolonización”. Algo similar es observado por el grupo de Schikora, en este caso infiltrando hojas de *Arabidopsis* con *S. Typhimurium* salvaje o mutantes de componentes del SST3-SPI-1 [159]. Salvando las distancias entre hospederos, esto viene en línea con nuestros resultados en los que observamos que 24 hs luego de infección de la línea celular B16F1 con la mutante sipB-, ésta se encuentra en mayores números que la cepa parental.

Recientemente se ha reportado que los SST3 también pueden llegar a tener un rol en la agregación celular de forma similar a los biofilms. El equipo de Jennings y colaboradores demostró que cuando se sobreexpresa el locus SPI-1, el mismo induce un agrupamiento de las *S. Typhimurium* presentes en el medio, aparentemente debido a acumulación de proteínas codificadas en el mismo, entre ellas SipB y SopE [160]. En un paralelismo con la función protectora reportada para los biofilms, estos agregados celulares podrían “escudar” a las bacterias de los receptores de defensa de las plantas, limitando su respuesta inmune.

7. Discusión general, conclusiones y perspectivas

En el presente trabajo se presentaron los resultados obtenidos en el contexto de una tesis de Doctorado, y si bien entendemos que los mismos son interesantes y significativos para el campo de investigación, resta discutir algunos puntos a la luz de los más nuevos avances de otros investigadores y proponer estrategias a futuro para complementarlos. No se debe olvidar que por el tiempo que llevan estos proyectos de investigación, desde su propuesta hasta su finalización se descubren y describen nuevos mecanismos y moléculas constantemente. A continuación se discutirán algunos puntos que entendemos vale la pena resaltar.

En la sección 6.1 hemos estudiado la inducción de ICD *in vitro*, mediante la evaluación de distintos hallmarks en células en cultivo infectadas con *Salmonella*. La pregunta que se desprende de esos resultados es qué está ocurriendo *in vivo*, teniendo en mente que en ese caso estamos frente a un contexto no solo tumoral sino con aporte inmunológico. Esto se vuelve más complicado, ya que actualmente existen pocos modelos para estudiar ICD *in vivo* (revisado en [98]). Como parte de este trabajo se intentó poner a punto una de estas aproximaciones, llamada “modelo de profilaxis”. El mismo consiste en tratar las células tumorales *ex vivo* con *Salmonella* -con la idea de inducir en ellas la ICD- para posteriormente implantarlas en los animales (en el “flanco vacuna”) y luego de algunas semanas desafiar en el flanco opuesto con células tumorales viables. Los resultados preliminares (no mostrados) de este ensayo son contradictorios, ya que si bien se observa retardo en el crecimiento tumoral de aquellos animales pretratados con B16F1-LVR01, el control positivo de ICD tratado con B16F1-DX no mostró retardo alguno. Asimismo, luego de un tiempo empezaron a crecer tumores en el flanco vacuna, dificultando las curvas de supervivencia. Cabe destacar que las células constituyentes de la profilaxis no fueron sorteadas por ningún parámetro y en su lugar se inoculó el contenido celular obtenido del sobrenadante del cultivo, en el entendido de que las células vivas estarían adheridas al sustrato. Por lo tanto, una clara perspectiva a futuro será mejorar estos abordajes de manera de que arrojen resultados más confiables.

Por ser uno de los objetivos de este capítulo ahondar en las moléculas involucradas en la muerte de células tumorales inducida por *Salmonella*, indirectamente abordamos los tipos de muerte celular, intentando discernir cuál o cuáles estarían ocurriendo. Sin embargo, a

la luz de recientes hallazgos los límites entre los distintos tipos de muerte serían difusos. En ese sentido, el grupo de Kanneganti recientemente acuñó el término PAN-optosis, para referirse a Piroptosis, Apoptosis y Necroptosis como tres tipos de muerte celular que en realidad están orquestados por los mismos reguladores maestros, ZBP1 y TAK1, ya que existe una co-regulación y crosstalk entre los distintos mecanismos [153]. Estos reguladores maestros integran señales complejas de múltiples ligandos/estímulos, actuando como sensores críticos que desencadenarán respuesta inflamatoria adecuada y muerte celular. ZBP1 es un sensor de la respuesta innata y puede desencadenar tanto la activación del inflammasoma NLRP3 o la necroptosis, a través de su interacción con RIPK3, entre otras funciones. Por su parte, TAK1 es una quinasa esencial que actúa regulando la quiescencia de estos fenómenos. Todo esto se esquematiza en la Figura 7.1 y ha sido ampliamente revisado en [153].

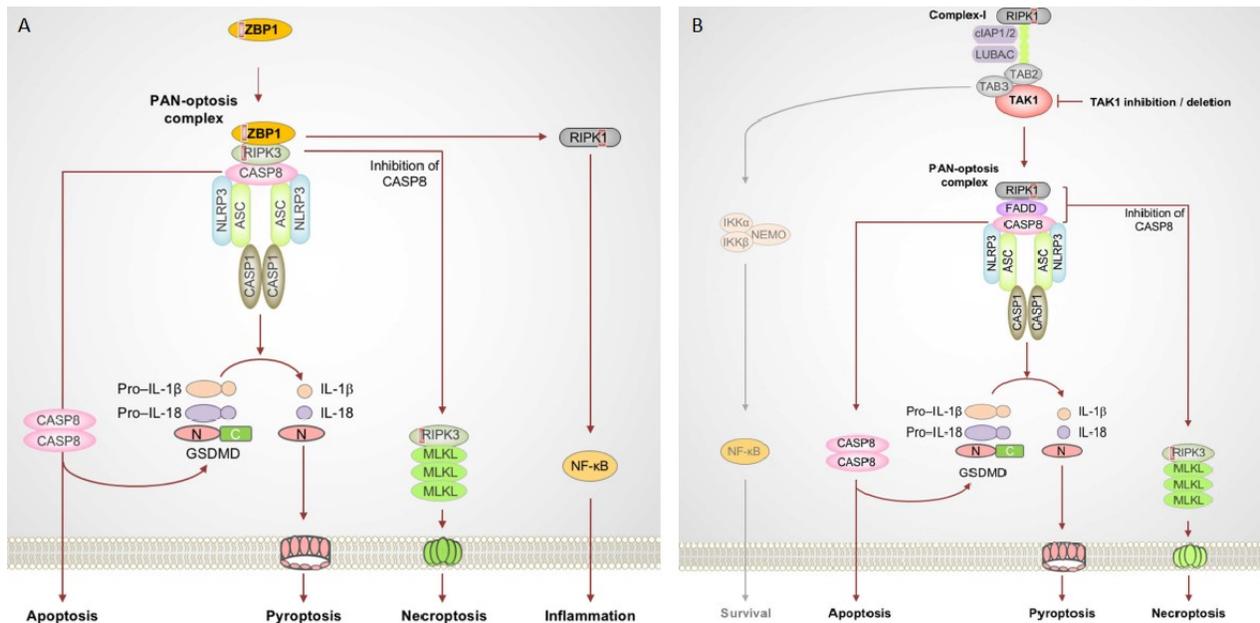


Figura 7.1. Representación esquemática de las funciones de ZBP1 (A) y TAK1 (B) en el contexto de la regulación de la PAN-optosis. La activación de ZBP1 desencadena el ensamblaje de complejos señalizadores de PAN-optosis e inflamación, mientras que TAK1 actúa como un master switch para la quiescencia de la PAN-optosis, siendo su inactivación la que desencadena ensamblaje de los complejos PAN-óptóticos. Imagen extraída y modificada de Malireddi *et al* 2019 [153].

Si bien en este trabajo demostramos que LVR01 induce piroptosis, otros han demostrado que *Salmonella* induce apoptosis mediante distintos mecanismos [161] y de hecho una de las moléculas mencionadas por Lin y colaboradores es SipB, ampliamente mencionada en el último capítulo de esta tesis. Por su parte, también se ha vinculado a *Salmonella* a la

necroptosis de macrófagos, a través de interferones [162], molécula que también ha destacado en este trabajo. Por todo esto entendemos entonces que sería interesante estudiar el involucramiento de *Salmonella* en la regulación más integral de estos procesos, estudiando su efecto sobre la expresión de los ZBP1 y TAK1, y las consecuencias de ello sobre el control del cáncer. Al respecto tenemos algunas pistas. Dada la esencialidad de estos reguladores en la respuesta innata frente a la infección por patógenos, estos microorganismos han evolucionado hacia estrategias de bloqueo como forma de evadir la respuesta inmune. La toxina YopJ secretada por la bacteria intracelular *Yersinia pestis* ha demostrado ser capaz de inactivar uno de esos reguladores, TAK-1 [163]. El homólogo de esta proteína en *Salmonella* es AvrA, y mediante secuenciación y herramientas bioinformáticas lo hemos encontrado en LVR01, aunque presenta algunos polimorfismos respecto a la cepa de referencia (resultados obtenidos en el marco de la línea de investigación de la candidata, no como parte de esta tesis; Informe Final Proyecto CSIC Inciación 2017 Mónaco-Pérez, ver Anexo 2). Por otra parte, AvrA se ha descrito como promotora de tumorigénesis colónica en pacientes infectados crónicamente con *Salmonella* [164, 165], por lo que definitivamente amerita estudiarla más en el contexto de nuestro modelo particular.

En este trabajo mostramos que *Salmonella* induce en células de melanoma la liberación al medio extracelular de DAMPs como HMGB-1. Hace algunos años se ha descrito que luego de la infección con *Salmonella*, los macrófagos liberan HMGB-1 en forma dependiente de caspasa-1 por lo que entendemos que el mismo constituye uno más de los mediadores proinflamatorios [166]. Dado que esta molécula también actúa como agonista del TLR4 [167], puede constituir otra forma de amplificar la respuesta antitumoral generada por nuestra cepa de trabajo. En ese sentido, se ha descrito que la interacción HMGB-1/TLR4 es esencial para que las células dendríticas -que encontramos aumentadas en tumor y ganglio drenante por el tratamiento- puedan procesar y presentar antígenos tumorales permitiendo así el priming de linfocitos T específicos de tumor. De hecho, pacientes con polimorfismos de TLR4 que afectan la unión presentan recaídas más tempranas frente a tratamientos quimioterápicos como antraciclinas [168]. Por su parte, también se le ha atribuido un rol al HMGB-1 en la inhibición de las funciones supresoras de células T reguladoras, aumentando la expresión de citoquinas proinflamatorias [169]. Sin embargo, en ese trabajo también describen al LPS como promotor de la capacidad supresora de células T reguladoras, por lo que dado que *Salmonella* tiene LPS y además induce la liberación de HMGB-1 es lógico afirmar que el balance entre los efectos inducidos por ambos dictará el resultado final. En nuestro trabajo no se ahondó en estudios de ese tipo

celular pero puede representar una interesante pregunta a responder a futuro. De todas formas, antecedentes de nuestro grupo de trabajo en otro modelo indican que el tratamiento con *Salmonella* intratumoral no induce un aumento en las células T reguladoras [84]. Respecto al LPS, en el marco de un proyecto en curso en el que participo (CSIC I+D 2018 Moreno, ver Anexo 2), generaremos una mutante de LVR01 deficiente de LPS, por lo que constituirá una herramienta para avanzar en estas cuestiones.

Como mencionamos más arriba en esta sección, en este trabajo reportamos el aumento significativo a nivel tumoral de moléculas como IFN γ . El mismo, producido entre otras por los linfocitos T reactivos al tumor, es una molécula efectora clave con efectos pleiotrópicos durante la respuesta inmune antitumoral. Recientemente se ha demostrado que aunque la secreción de IFN γ comienza a nivel local luego del reconocimiento de antígenos tumorales, el efecto del mismo altera el microambiente tumoral en áreas distantes, no solo a través de su difusión directa sino a través del llamado “bystander effect”, en el que las células T median la señalización sostenida de IFN γ en células tumorales remotas. Asimismo, los autores correlacionaron el número de LT infiltrantes con la cantidad de IFN γ producido, lo que su vez determina la magnitud de la respuesta de las células tumorales [170]. Si bien en nuestro trabajo no encontramos que *Salmonella* indujera aumento en el infiltrado global de linfocitos T en tumor (vale mencionar en este punto que no realizamos ningún tipo de subclasificación por lo que podríamos estar perdiendo de vista aumentos en algún tipo particular de LT, y en particular LT específicos contra tumor), entendemos que inmunoterapias con *Salmonella* podrían representar una forma de aumentar la producción de IFN γ y por lo tanto modificar profundamente el microambiente tumoral en favor de una respuesta antitumoral más efectiva. Apoya esta hipótesis el hecho de que hayamos encontrado que el tratamiento con *Salmonella* induce un aumento significativo en el infiltrado tumoral de células NK, las grandes productoras de IFN γ , así como aumentados los mensajeros para esta molécula en homogenizados de tumores tratados, por lo que planteamos a futuro realizar nuevos ensayos *in vivo* utilizando animales deficientes en esta molécula para confirmar este punto.

Retornando al asunto de las células T, se podría decir que estas constituyen el objetivo final de una inmunoterapia antitumoral efectiva, en la medida que se desarrolla una inmunidad protectora a largo plazo para evitar recaídas. En ese sentido, se ha observado que el infiltrado tumoral de células T CD8+ con fenotipo de memoria residente (T_{rm}) correlaciona con una mejor supervivencia, y que incluso luego de la eliminación del tumor estas células quedan residiendo en la piel [171]. Sin embargo, como se mencionó en el párrafo anterior, en nuestro caso no determinamos un aumento en el infiltrado tumoral de células T CD8+ inducido por *Salmonella*, y tampoco encontramos que la depleción de éstas

células modificara el efecto del tratamiento. De todas formas, dado que la depleción sistémica por anticuerpos no logra depletar las Trm de tumor/piel [172], no podemos descartar a estas células como involucradas, pero quizá al estar en tan bajos porcentajes en tumor pasan desapercibidas. Resultados recientes de nuestro equipo de trabajo indican que *Salmonella* sí induce un aumento significativo en las células Trm en ganglio drenante, sugiriendo que podrían ser importantes para la inducción de una respuesta sistémica eficaz contra melanoma (Tesis de Maestría Lic. Sofía Chilibroste, en preparación).

Sobre la relevancia de las células NK, nuestros resultados no son concluyentes ya que no logramos una depleción completa de las mismas. Sin embargo, aún así observamos inhibición transitoria del efecto antitumoral de *Salmonella* (Figura 6.1.10), lo que indicaría que estas células son importantes a tiempos tempranos. Nuevas formas de depletar NK o la optimización de este método de depleción permitirán sacar conclusiones más definitivas al respecto.

En la misma línea de razonamiento, la depleción de macrófagos con clodronato mostró que los mismos son fundamentales para el efecto antitumoral de *Salmonella*, en la medida que animales depletados pero tratados exhiben el mismo comportamiento tumoral que los del grupo control. Es importante resaltar que también observamos activación del inflammasoma en los macrófagos infiltrantes de tumor, más que nada teniendo en mente que se ha propuesto que las diferentes subpoblaciones de macrófagos exhiben activación diferencial del inflammasoma [173]. En otras palabras, la modulación de la polarización será fundamental para moldear el microambiente tumoral (ej. perfil de citoquinas, ver capítulo 6.1), que a su vez será esencial para el resultado final de la inmunoterapia. En este trabajo mostramos que la administración intratumoral de *Salmonella* induce un rápido cambio de fenotipo de los macrófagos infiltrantes hacia M1, y junto con la demostración de que los macrófagos son esenciales para la efectividad del tratamiento, todo esto sugiere que este evento es responsable de la actividad antitumoral de *Salmonella*. Sin embargo, como al día 7 este balance hacia M1 se pierde, esto a su vez podría explicar el efecto antitumoral transiente de la terapia, que si bien es efectiva en inducir retardo del crecimiento tumoral y prolongación de la supervivencia, eventualmente todos los ratones terminan muriendo por tumor. De esta manera, surge la necesidad de encontrar estrategias que potencien o mantengan este fenotipo antitumoral. En ese sentido, se ha descrito que la activación forzada de la señalización a través de Notch aumenta el sesgo M1 y potencia su actividad antitumoral [174], lo que a su vez sugiere que una estrategia combinada en la que se use *Salmonella* para inducir el perfil M1 y la señalización a través de Notch para mantener el fenotipo podría prolongar el beneficio a más largo plazo. De todas formas, esta posibilidad

debe ser estudiada más en profundidad dada la complejidad de la señalización de Notch, que de hecho se ha descrito tanto como oncogen y supresor tumoral (revisado en [175]). Además demostramos que la activación de NLRP3 mediada por *Salmonella*, que a su vez lleva a la activación de Caspasa-1, son dos fenómenos conectados esenciales para la actividad antitumoral. Se sabe que la expresión de Caspasa-1 es aumentada en macrófagos M1 pero no M2 luego de que los receptores NLRP3 reconocen algún agonista [173], sugiriendo que el ensamblaje del inflamasoma NLRP3 inducido por *Salmonella* está en el centro de la polarización de los macrófagos hacia M1.

La activación del inflamasoma es un proceso altamente complejo y por lo tanto, presenta variedad de desenlaces diferentes, finamente regulados (Figura 3.4; revisado en [39]). Esto es particularmente relevante en el contexto de la inmunoterapia aquí evaluada, en tanto *Salmonella* puede sobrevivir dentro de las células así como acumular fuera de ellas, dirigiendo la respuesta del hospedador. En este trabajo hemos demostrado que *Salmonella* puede inducir piroptosis en células tumorales, contribuyendo a la generación de un ambiente proinflamatorio propicio para que se monte una respuesta antitumoral efectiva, que involucra tanto el reclutamiento de neutrófilos, células NK y macrófagos al sitio tumoral como la secreción de mediadores proinflamatorios que amplifiquen el efecto. Sería interesante utilizar *in vivo* algún agente inhibidor de piroptosis para comprobar que el efecto antitumoral de *Salmonella* depende directamente de este proceso. En ese sentido recientemente se ha descrito que el disulfiram, droga aprobada por la FDA hace casi 70 años para el tratamiento del alcoholismo crónico, es capaz de inhibir la formación de poros de GSDM-D en la membrana, aún cuando sí ocurra el clivaje de este zimógeno, bloqueando así la piroptosis [176]. Proponemos como perspectiva entonces complementar nuestros resultados mediante la evaluación del rol *in vivo* de la GSDM-D mediante el uso de este agente en el contexto de nuestra inmunoterapia.

Determinamos también que la caspasa-1, ejecutor central de la piroptosis pero molécula no limitada únicamente a esta función, es indispensable para el efecto antitumoral de nuestra cepa de trabajo, LVR01. Esto está en línea con lo reportado por otros autores respecto a la relación entre piroptosis y muerte de células tumorales (revisado ampliamente en [177]), aunque también hay que mencionar que otros han encontrado activación del inflamasoma inducida por *Salmonella*, dependiente de caspasa-1, pero que no lleva a la muerte celular [178]. A nuestro entender, estos resultados diferentes no tienen por qué ser contradictorios, en la medida que distintos tipos celulares presentan distintos niveles de expresión de GSDM-D, lo que podría determinar la secreción de citoquinas de la familia de IL1 sin necesidad de muerte celular. Asimismo, diferentes cepas utilizadas por los distintos grupos de investigación podrían inducir niveles variados de

inflamación, modulando más finamente la respuesta, debido a la presencia o ausencia de determinadas moléculas (por ejemplo, nuestra cepa de trabajo carece de SopE que se asocia a cepas más virulentas). Incluso se ha reportado que la misma cepa pero en diferentes fases de crecimiento presenta diferencias significativas en lo que refiere a activación del inflamasoma, debido a la expresión diferencial de los distintos sistemas de secreción [47].

Si bien los inflamasomas han sido propuestos como dianas para inmunoterapias contra el cáncer, particularmente melanoma por su plasticidad y su capacidad de desplegar rápidamente mecanismos de resistencia [179], el rol de la activación del inflamasoma en la progresión tumoral es controversial [180, 181]. Por un lado, la expresión aumentada del NRP3 se ha asociado a múltiples tipos de cáncer, incluido el melanoma [182]. Por otra parte, la secreción de IL18 inducida por la activación de NLRP3 en cáncer colorectal ha demostrado ser protectora, a través de la producción de IFN γ [183]. Resultados previos de mi tesis de Maestría indican que los niveles de IL18 se mantienen incambiados en tumor luego del tratamiento, pero como se discutiera oportunamente, dado que los niveles basales de IL18 en melanoma ya de por sí son altos [184], posiblemente se esté enmascarando pequeños cambios inducidos por *Salmonella*.

A pesar de que intentamos determinar la relevancia de algunas de las moléculas de *Salmonella* involucradas en la activación del inflamasoma, no encontramos que ninguna de ellas fuera totalmente indispensable. La contribución individual de las mismas al efecto antitumoral es limitada y es lógico creer que existen mecanismos redundantes por lo que la falta de alguna se ve aunque sea parcialmente compensada por las otras. Un ejemplo claro podrían ser FliC y PrgJ, que presentan un altísimo porcentaje de homología en el extremo carboxi-terminal [185], que se atribuye a una divergencia evolutiva del sistema de secreción a partir del aparato flagelar [186]. Por esa razón una clara perspectiva a futuro de este trabajo será la generación de mutantes múltiples, tanto en las moléculas aquí evaluadas como en otros componentes relevantes, como en los últimos años ha demostrado ser el LPS, capaz de activar el inflamasoma de forma no canónica como se mencionó anteriormente en este trabajo [187]. Por otro lado, por más que se hayan realizado mutantes simples, éstos sistemas de secreción multiproteicos son mecanismos jerárquicos (ver Figura 3.7), de tal forma que el hecho de eliminar alguna de estas moléculas quizá afecte la funcionalidad de otras, por más que estén codificadas en el genoma de la bacteria. La relevancia de la funcionalidad y no solo la presencia está apoyada por nuestros resultados *in vivo* en los que se ve la necesidad de que la bacteria esté viva para desencadenar una respuesta inmune que pueda actuar contra el tumor (ver Figura 6.1.4), por lo que la mera presencia de los PAMPs no es suficiente. Específicamente

podría incidir una jerarquía en el caso de las proteínas estructurales PrgJ e InvG en relación al efector sipB, ya que este último podría necesitar de un complejo de aguja intacto para ingresar. En ese sentido, análisis funcionales más exhaustivos serán requeridos para analizar la contribución indirecta de la falta de una molécula en el efecto de la otra.

Por exceder el alcance y la magnitud de una tesis de doctorado, solo se abordaron algunos de todos los aspectos que fueron surgiendo a medida que este trabajo avanzaba. En ese sentido, entendemos que a futuro también sería interesante estudiar las posibles implicancias de la analogía entre los sistemas de secreción de tipo 3 codificados en SPI-1 o SPI-2. Como se explicó en la sección 3 de este trabajo, ambos sistemas comparten características estructurales similares, pero actúan en momentos diferentes de la infección. Por esa alta homología que presentan, las moléculas aquí evaluadas (PrgJ, SipB e InvG, correspondientes al SST3 codificado SPI-1) tienen sus análogos en el SST3 codificado en SPI-2 (SsaI, SseC y SsaC, respectivamente, ver [188]). Esas moléculas no fueron inactivadas en nuestras cepas mutantes por lo que amerita el estudio de la relevancia de las mismas también, en el entendido de que al faltar sus homólogos de SPI-1 pudieran de alguna forma sustituirlos. Por poner un ejemplo, quizá al eliminar PrgJ el complejo de aguja sigue siendo funcional utilizando de alguna forma su homólogo SsaI. Sumado a esto, existe información limitada sobre la relación entre alguno de ellos con el complejo de inflammasoma por lo que su estudio en mayor profundidad sería interesante y un aporte relevante al campo. Según nuestra búsqueda bibliográfica, solo se ha estudiado SsaI en el contexto de la posible activación del inflammasoma, encontrándose que a diferencia de su homólogo PrgJ, no es reconocido por NLRC4 debido a algunas mutaciones puntuales en aminoácidos clave para el reconocimiento [185, 189]. Sin embargo, es interesante destacar que *Salmonella* Typhimurium VNP20009 deficiente en *SseC*- (homólogo a sipB en el SST3-SPI2) ve abrogada su actividad antitumoral en un modelo de melanoma, sin ver afectado su crecimiento *in vitro* en un medio clásico de cultivo [190]. En el momento de esa evaluación recién se estaba describiendo el inflammasoma por primera vez por lo que evidentemente no se buscó esa relación pero valdría la pena revisarlo considerando la gran cantidad de información recabada al respecto en estas últimas décadas.

Como se mencionó anteriormente, un posible resultado de la activación del inflammasoma es la piroptosis de las células tumorales. Si bien en este trabajo se abordó el enfoque beneficioso de la misma, cabe destacar que este fenómeno podría resultar detrimental en algunos contextos, ya que en ocasiones los mediadores inflamatorios liberados favorecen la tumorigénesis (revisado en [191, 192]). Aquí la clave podría ser el *tipo* de inflamación: si es aguda y se resuelve en un lapso acotado de tiempo (como ocurre en nuestro caso, ver

Fig. 6.1.5 en la que al día 17 post-*Salmonella* prácticamente se ve el mismo perfil de citoquinas y quimioquinas de animales sin tratar) o si es crónica y la persistencia de esos mediadores induce la transformación y perpetuación de células tumorales, ya que se sabe que la inflamación es una de las “hallmarks” del cáncer [193]. Además, la inflamación en el contexto del cáncer se autoalimenta positivamente, en un círculo vicioso, debido a la muerte necrótica de las células tumorales, que, al crecer el tumor, ven limitado su acceso a nutrientes o sucumben a infecciones por la disrupción de la barrera, avivando la inflamación [194]. Es interesante agregar que en varios tipos de cáncer se ha observado que NF- κ B está constitutivamente activado, tanto en células neoplásicas como en las del microambiente tumoral [195], reforzando la relación causal con la inflamación crónica. Respecto a este punto, resultados preliminares realizados en un modelo murino de melanoma basado en células murinas con la mutación BRAFV600E -RG13.2- (gentilmente cedidas por la Dra. Romina Girotti del Laboratorio de Inmuno Oncología Traslacional del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), Argentina) muestran que el efecto antitumoral de una única dosis de *Salmonella* LVR01 se pierde si la misma se administra de forma intratumoral semanalmente (resultados no mostrados), por lo que entendemos que mantener el estado de inflamación crónica podría ser de hecho perjudicial para el resultado final de la inmunoterapia. Por otra parte en otros modelos de tumor que utilizamos en nuestro laboratorio (como linfoma no-Hodgkin de células B mediante la implantación subcutánea de células A20 en ratones Balb-C), hemos demostrado que son necesarias tres dosis intratumorales de LVR01 separadas por una semana para obtener resultados favorables [84], indicando la importancia de no extrapolar conclusiones entre distintos tipos de tumor. Cabe destacar que aunque se la asocia a un alto porcentaje de muerte por cáncer (aproximadamente 35%), no toda inflamación crónica lleva a cáncer, ya que el *sitio* de la inflamación también es importante (revisado en [196]). Resta aún el estudio en profundidad de las diferencias entre la inflamación aguda o crónica inducida por *Salmonella* en el contexto del tratamiento de melanoma pero entendemos que podría ser interesante abordarlo a futuro, y un punto a tener en cuenta al definir los posibles esquemas de administración a utilizar en la clínica.

Otro mecanismo por demás interesante e inexplorado en este trabajo pero que vale la pena abordar a futuro ya que ha cobrado relevancia en los últimos tiempos es la inmunidad entrenada (TI, del inglés Trained Immunity). La misma consiste en una suerte de memoria inmunológica de células del sistema inmune innato (principalmente células NK, macrófagos y neutrófilos), que luego de la exposición a distintos agentes inductores logran un estado de actividad incrementada, respondiendo mejor en velocidad y magnitud frente a un segundo estímulo, aunque no esté relacionado al primero (descrita por

primera vez en [197], revisado en [198]). Cabe destacar que a pesar de que estas células tienen una vida media corta, actualmente se sabe que la TI se conserva por un período mucho más largo (meses hasta un año, aunque estudios recientes apuntan incluso a la transmisión transgeneracional [199]) debido a cambios funcionales a nivel de células madres y progenitoras hematopoyéticas en médula ósea [200].

Recientemente se le ha atribuido a este fenómeno un rol potencial en inmunoterapias contra el cáncer [201, 202]. Microorganismos como BCG han demostrado ser capaces de inducir TI a través de cambios epigenéticos y metabólicos [203], que a su vez, se han asociado a la activación de NLRP3 [204]. Vale recordar que como se reseñó en la sección 3 de este trabajo, este microorganismo constituye un tratamiento efectivo hace más de 40 años para el cáncer de vejiga, y recientemente se ha demostrado que su efecto es a través de la inducción de TI [205]. Es entonces que la administración intratumoral de *Salmonella* podría estar ejerciendo parte de su efecto a través de la estimulación de TI, y en este trabajo hemos generado alguna evidencia que podría apuntar a eso. El tratamiento con *Salmonella* genera un rápido aumento de mensajeros de citoquinas como IFN γ o TNF α y quimioquinas como CXCL1, 2, 9 y 10 (Fig. 6.1.5), que a su vez inducen el reclutamiento al tumor de las células inmunes innatas en las que se observa la inducción de TI: NK, neutrófilos y macrófagos (Fig. 6.1.6). Asimismo, en esta última población se observa un cambio de fenotipo en tumor, favoreciendo el balance hacia M1 (Fig. 6.1.8). Todo esto colectivamente indicaría un cambio de un estado inmunosupresor a un potente estado proinflamatorio. Sumado a esto, cuando macrófagos o células NK se depletan, el efecto antitumoral se pierde (Figs. 6.1.9-10), lo que indica la relevancia de estas poblaciones. Por otra parte, cuando se estimula *in vitro* BMDM con *Salmonella*, se registra un aumento significativo en la producción de TNF α (Fig. 6.3.3). Finalmente, en nuestro grupo de trabajo también hemos observado que *Salmonella* amplifica el efecto de terapias de inhibición de puntos de control (datos no publicados, Tesis de Maestría de la Lic. Sofía Chilibróste, en preparación). Todos estos puntos arriba reseñados son sugestivos de TI [202]. Respecto al mecanismo, se ha descrito al LPS a bajas dosis como inductor [206], por lo que nuevamente destacamos que la cepa deficiente en LPS que estamos generando podría ser una herramienta valiosa para estudiar este fenómeno en relación al efecto anti melanoma de *Salmonella*, que claramente amerita ser estudiado en mayor profundidad.

Otro factor a considerar con miras a la posible aplicación clínica de este tratamiento basado en el uso de bacterias es la respuesta inmune preexistente contra *Salmonella* que podrían presentar los pacientes que la recibirán. Los ratones utilizados en todo este trabajo fueron criados y mantenidos en estricta ausencia de patógenos, particularmente

Salmonella, hasta que la misma fue administrada a nivel intratumoral en el contexto de la inmunoterapia. Sin embargo, en el caso de humanos existe un porcentaje de la población que presenta inmunidad contra *Salmonella* debido a encuentros previos con la misma. Estudios indican que aproximadamente un 20% de la población humana presentaría un título de anticuerpos anti-*Salmonella* que podría ser efectivo en su eliminación [207], lo que podría interferir con el efecto terapéutico de nuestra aproximación. Particularmente algunos trabajos realizados en Nepal e India mostraron en estudios pequeños (entre 100 y 400 personas evaluadas) que entre un 20 y un 60% de individuos sanos dan positivo para alguno de los 4 antígenos de *Salmonella* enterica testeados [208, 209]. En ese sentido el grupo de Felgner y colaboradores demostraron en un modelo de carcinoma de colon murino que la pre-exposición a *Salmonella* disminuye significativamente la eficacia de la terapia antitumoral basada en el uso de esta bacteria, incluso cuando se usan distintas cepas para la inmunización primaria y la posterior. Sin embargo, propusieron y evaluaron una estrategia para superar esa limitación generando un vector optimizado con modificaciones en el lípido A y la síntesis de flagelo, que demostró reestablecer la capacidad imunoestimuladora de la cepa [210]. Particularmente en nuestro caso nos planteamos como perspectiva evaluar la influencia de una exposición previa a *Salmonella* que luego se utilizará otra vez para tratar el melanoma. Resultados preliminares demuestran que efectivamente ratones inoculados con la misma cepa de forma subcutánea previo a la implantación tumoral (y en los cuales se encontró altos títulos de anticuerpos anti-LPS en suero), luego no responden al tratamiento intratumoral, asemejándose los volúmenes tumorales aquellos del grupo control. Resta evaluar si otras cepas del mismo serotipo exhiben el mismo efecto, aunque el hecho de que todas compartan el antígeno O del LPS (O4 en el caso de Typhimurium), sugeriría que sí. Por otra parte, si la mutante en LPS que mencionamos más arriba que planeamos generar aún posee actividad antitumoral, también puede constituir una alternativa para la evaluación de la relevancia de la preexposición.

Como una serendipia en este trabajo reportamos por primera vez que *Salmonella* induce la liberación de trampas extracelulares por parte de macrófagos murinos, que acaban por eliminarla y morir [121]. Si bien esto representaría un nuevo mecanismo inmune inducido por esta bacteria, *a priori* podría parecer que va en contra de nuestra inmunoterapia, ya que eliminaría el agente terapéutico. Dado que excedía los límites de este trabajo no profundizamos en el mismo pero entendemos fundamental analizar su relevancia en el contexto de inmunoterapias contra el cáncer. Se ha indicado que la generación de NETs (no se ha establecido una relación directa entre METs y cáncer) resultaría perjudicial en el contexto del cáncer, estimulando el crecimiento tumoral [211], promoviendo la salida de

fase de equilibrio hacia la etapa de escape en el proceso de inmunoedición [212] así como diseminando las células tumorales estableciendo metástasis en sitios distantes [213-215]. Por otra parte, Sabbione y colaboradores recientemente demostraron que las NETs estimuladas por cristales de urato monosódico (MSU) en las vías aéreas de ratones inducen producción de citoquinas proinflamatorias que contribuyen al reclutamiento de neutrófilos [216]. Dado que el MSU es un conocido activador del inflammasoma, entendemos que podría existir una relación entre las trampas extracelulares producidas por células inmunes y la activación del inflammasoma. De hecho, algunos grupos ya han mostrado que las NETs inducen activación del inflammasoma [214, 217] por lo que creemos que las METs también podrían constituir un DAMP que promueva o amplifique la activación del mismo. Además en una extensiva revisión publicada recientemente, se plantea que el proceso de piroptosis -a consecuencia de la activación del inflammasoma- y ETosis son similares en términos de la generación de poros en la membrana y posterior liberación del contenido celular [218], reforzando la necesidad de estudiar la inducción de ambos procesos mediada por *Salmonella*. Por otra parte, resultados de este trabajo sugieren que *Salmonella* polariza los macrófagos hacia un fenotipo M1, y se ha reportado que los M1 -pero no los M2- son propensos a la liberación de METs al enfrentarse a NETs u otros estímulos inflamatorios [219, 220], por lo que esto podría sugerir que la liberación de METs podría contribuir al efecto antitumoral que observamos por administración de *Salmonella*. Esto quizá también explicaría el hecho de que al día 7 post *Salmonella* el balance M1/M2 vuelve a ser similar al grupo sin tratamiento, ya que los M1 liberaron las METs y murieron, mientras que los M2 los superan en número porque no sufrieron METosis.

Como grandes perspectivas a futuro restan entonces una caracterización más exhaustiva de este fenómeno *in vitro* y la observación y evaluación de la relevancia del mismo *in vivo* en el contexto de la inmunoterapia contra melanoma basada en el uso de *Salmonella*. En ese sentido, nos planteamos valorar el impacto de su inhibición o eliminación en el contexto de melanoma, tanto no diseminado como metastásico.

En suma, este trabajo estuvo dirigido a explorar las bases celulares y moleculares por las cuales *Salmonella* Typhimurium LVR01 es efectiva como inmunoterapia contra melanoma. En primer lugar se determinó que el tratamiento induce en poco tiempo un programa de expresión génica esencialmente proinflamatorio en el microambiente tumoral, lo que promueve el reclutamiento de distintas células inmunes que probaron en mayor o menor medida ser clave. En un ciclo virtuoso, la inducción de piroptosis mediada por caspasa-1 e inducida por *Salmonella* amplifica la inflamación y destruye células tumorales. Respecto a los factores particulares de *Salmonella* involucrados, por lo expuesto anteriormente no

podimos determinar una contribución relevante de ninguna de ellas en particular. Todos estos resultados fueron presentados en forma parcial tanto a nivel local como internacional (ver Anexo 1), algunos de ellos publicados y otros en proceso de publicación próxima. La Figura 7.2 esquematiza los hallazgos más relevantes obtenidos en el contexto de este trabajo.

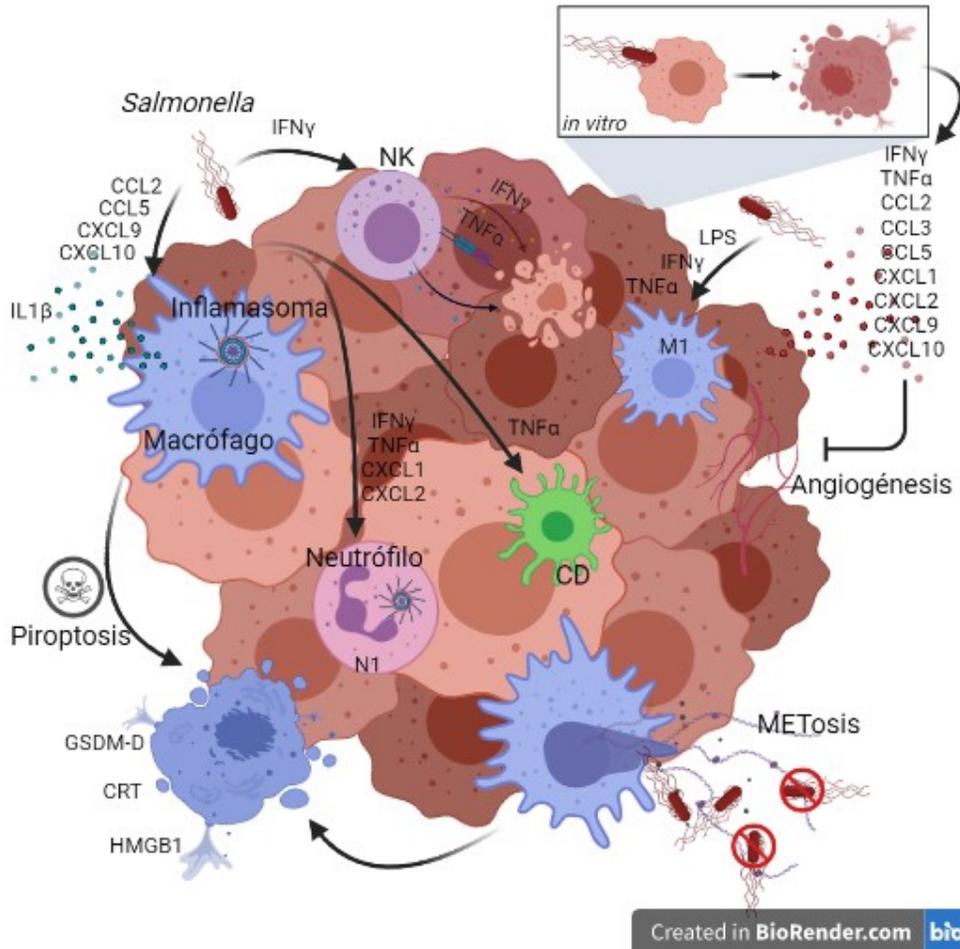


Figura 7.2. Representación esquemática de los mecanismos celulares y moleculares ejercidos por *Salmonella* LVR01 sobre células tumorales e infiltrantes que contribuyen a la efectividad de la inmunoterapia. Imagen creada por A. Mónaco con BioRender.

En su conjunto, hemos abordado distintos aspectos que hacen al efecto anti-melanoma de *Salmonella* LVR01. Creemos que los resultados aquí mostrados podrían contribuir al mejoramiento de las estrategias terapéuticas actuales para combatir esta enfermedad que afecta a toda la población mundial.

8. Bibliografía

1. Bertolotto, C., *Melanoma: from melanocyte to genetic alterations and clinical options*. Scientifica (Cairo), 2013. **2013**: p. 635203.
2. Alonso, S.R., et al., *A high-throughput study in melanoma identifies epithelial-mesenchymal transition as a major determinant of metastasis*. *Cancer Res*, 2007. **67**(7): p. 3450-60.
3. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 394-424.
4. CHLCC. *Situación epidemiológica del Uruguay en relación al cáncer*. 2019 [cited 27/09/2019]; Available from: http://www.comisioncancer.org.uy/uc_513_1.html.
5. Swetter, S.M., et al., *Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma*. *J Am Acad Dermatol*, 2019. **80**(1): p. 208-250.
6. Fucikova, J., et al., *Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy*. *Cell Death Dis*, 2020. **11**(11): p. 1013.
7. Coit, D.G., et al., *Cutaneous Melanoma, Version 2.2019, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*. *J Natl Compr Canc Netw*, 2019. **17**(4): p. 367-402.
8. 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.
9. 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.
10. Karbach, J., et al., *Phase I clinical trial of mixed bacterial vaccine (Coley's toxins) in patients with NY-ESO-1 expressing cancers: immunological effects and clinical activity*. *Clin Cancer Res*, 2012. **18**(19): p. 5449-59.
11. Gontero, P., et al., *The role of bacillus Calmette-Guerin in the treatment of non-muscle-invasive bladder cancer*. *Eur Urol*, 2010. **57**(3): p. 410-29.
12. Kim, J.C. and G.D. Steinberg, *The limits of bacillus Calmette-Guerin for carcinoma in situ of the bladder*. *J Urol*, 2001. **165**(3): p. 745-56.
13. Stewart, J.H.t. and E.A. Levine, *Role of bacillus Calmette-Guerin in the treatment of advanced melanoma*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011. **11**(11): p. 1671-6.
14. Benitez, M.L.R., et al., *Mycobacterium bovis BCG in metastatic melanoma therapy*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019. **103**(19): p. 7903-7916.
15. Toso, J.F., et al., *Phase I study of the intravenous administration of attenuated Salmonella typhimurium to patients with metastatic melanoma*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(1): p. 142-52.
16. Suresh, R. and D.M. Mosser, *Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology*. *Adv Physiol Educ*, 2013. **37**(4): p. 284-91.
17. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 805-20.
18. Netea, M.G. and J.W. van der Meer, *Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(1): p. 60-70.
19. Royle, M.C., et al., *Stimulation of Toll-like receptor 4 by lipopolysaccharide during cellular invasion by live Salmonella typhimurium is a critical but not exclusive event leading to macrophage responses*. *J Immunol*, 2003. **170**(11): p. 5445-54.
20. Feuillet, V., et al., *Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(33): p. 12487-92.
21. Deguine, J. and G.M. Barton, *MyD88: a central player in innate immune signaling*. *F1000Prime Rep*, 2015. **6**: p. 97.

22. Kawai, T. and S. Akira, *Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors*. Trends Mol Med, 2007. **13**(11): p. 460-9.
23. 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.
24. Malik, A. and T.D. Kanneganti, *Inflammasome activation and assembly at a glance*. J Cell Sci, 2017. **130**(23): p. 3955-3963.
25. Mahmud, M., M.K. Jing, and A. Idris, *Inflammasomes - A Mini-Review*. Current Immunology Reviews, 2016. **12**(1).
26. Sborgi, L., et al., *GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death*. EMBO J, 2016. **35**(16): p. 1766-78.
27. Shi, J., et al., *Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death*. Nature, 2015. **526**(7575): p. 660-5.
28. Kesavardhana, S. and T.D. Kanneganti, *Mechanisms governing inflammasome activation, assembly and pyroptosis induction*. Int Immunol, 2017. **29**(5): p. 201-210.
29. Lieberman, J., H. Wu, and J.C. Kagan, *Gasdermin D activity in inflammation and host defense*. Sci Immunol, 2019. **4**(39).
30. Yipp, B.G. and P. Kubes, *NETosis: how vital is it?* Blood, 2013. **122**(16): p. 2784-94.
31. Evavold, C.L., et al., *The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages*. Immunity, 2017. **48**(1): p. 35-44 e6.
32. Chen, K.W., et al., *Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps*. Sci Immunol, 2018. **3**(26).
33. Sollberger, G., et al., *Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps*. Sci Immunol, 2018. **3**(26).
34. Liu, X., et al., *Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores*. Nature, 2016. **535**(7610): p. 153-8.
35. Franklin, B.S., et al., *The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation*. Nat Immunol, 2014. **15**(8): p. 727-37.
36. Dick, M.S., et al., *ASC filament formation serves as a signal amplification mechanism for inflammasomes*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 11929.
37. Xia, X., et al., *The role of pyroptosis in cancer: pro-cancer or pro-"host"?* Cell Death Dis, 2019. **10**(9): p. 650.
38. Qiu, S., J. Liu, and F. Xing, *'Hints' in the killer protein gasdermin D: unveiling the secrets of gasdermins driving cell death*. Cell Death Differ, 2017. **24**(4): p. 588-596.
39. Franklin, B.S., E. Latz, and F.I. Schmidt, *The intra- and extracellular functions of ASC specks*. Immunol Rev, 2017. **281**(1): p. 74-87.
40. Franchi, L., *Role of inflammasomes in salmonella infection*. Front Microbiol, 2011. **2**: p. 8.
41. Zhao, Y., et al., *The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus*. Nature, 2011. **477**(7366): p. 596-600.
42. Fusco, W.G. and J.A. Duncan, *Novel aspects of the assembly and activation of inflammasomes with focus on the NLRC4 inflammasome*. Int Immunol, 2018. **30**(5): p. 183-193.
43. Reyes Ruiz, V.M., et al., *Broad detection of bacterial type III secretion system and flagellin proteins by the human NAIP/NLRC4 inflammasome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(50): p. 13242-13247.
44. Wen, H., E.A. Miao, and J.P. Ting, *Mechanisms of NOD-like receptor-associated inflammasome activation*. Immunity, 2013. **39**(3): p. 432-41.
45. Gong, T., et al., *Orchestration of NLRP3 Inflammasome Activation by Ion Fluxes*. Trends Immunol, 2018. **39**(5): p. 393-406.
46. Qu, Y., et al., *NLRP3 recruitment by NLRC4 during Salmonella infection*. J Exp Med, 2016. **213**(6): p. 877-85.

47. Broz, P., et al., *Redundant roles for inflammasome receptors NLRP3 and NLRC4 in host defense against Salmonella*. J Exp Med, 2010. **207**(8): p. 1745-55.
48. 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.
49. 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.
50. Franchi, L., *Role of inflammasomes in salmonella infection*. Front Microbiol. **2**: p. 8.
51. Monjaras Feria, J.V., et al., *Role of autocleavage in the function of a type III secretion specificity switch protein in Salmonella enterica serovar Typhimurium*. MBio, 2015. **6**(5): p. e01459-15.
52. Galan, J.E. and G. Waksman, *Protein-Injection Machines in Bacteria*. Cell, 2018. **172**(6): p. 1306-1318.
53. Galan, J.E., *Salmonella interactions with host cells: type III secretion at work*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 53-86.
54. Franchi, L., et al., *Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease*. Cell Microbiol, 2008. **10**(1): p. 1-8.
55. Hoffmann, C., et al., *In macrophages, caspase-1 activation by SopE and the type III secretion system-1 of S. typhimurium can proceed in the absence of flagellin*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12477.
56. Hersh, D., et al., *The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2396-401.
57. Hernandez, L.D., et al., *A Salmonella protein causes macrophage cell death by inducing autophagy*. J Cell Biol, 2003. **163**(5): p. 1123-31.
58. Hardt, W.D., et al., *S. typhimurium encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells*. Cell, 1998. **93**(5): p. 815-26.
59. Dunn, J.H., L.Z. Ellis, and M. Fujita, *Inflammasomes as molecular mediators of inflammation and cancer: potential role in melanoma*. Cancer Lett, 2012. **314**(1): p. 24-33.
60. Phan, T.X., et al., *Activation of inflammasome by attenuated Salmonella typhimurium in bacteria-mediated cancer therapy*. Microbiol Immunol, 2015. **59**(11): p. 664-75.
61. Kim, J.E., et al., *Salmonella typhimurium Suppresses Tumor Growth via the Pro-Inflammatory Cytokine Interleukin-1beta*. Theranostics, 2015. **5**(12): p. 1328-42.
62. 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.
63. Pangilinan, C.R. and C.H. Lee, *Salmonella-Based Targeted Cancer Therapy: Updates on A Promising and Innovative Tumor Immunotherapeutic Strategy*. Biomedicines, 2019. **7**(2).
64. Loeffler, M., et al., *IL-18-producing Salmonella inhibit tumor growth*. Cancer Gene Ther, 2008. **15**(12): p. 787-94.
65. McClelland, M., et al., *Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2*. Nature, 2001. **413**(6858): p. 852-6.
66. Frahm, M., et al., *Efficiency of conditionally attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium in bacterium-mediated tumor therapy*. mBio, 2015. **6**(2).
67. Felgner, S., et al., *Optimizing Salmonella enterica serovar Typhimurium for bacteria-mediated tumor therapy*. Gut Microbes, 2016. **7**(2): p. 171-7.
68. Felgner, S., et al., *aroA-Deficient Salmonella enterica Serovar Typhimurium Is More Than a Metabolically Attenuated Mutant*. mBio, 2016. **7**(5).
69. 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.
70. Gill, G.V. and A. Holden, *A malignant pleural effusion infected with Salmonella enteritidis*. Thorax, 1996. **51**(1): p. 104-5.

71. Raman, V., et al., *The motility regulator flhDC drives intracellular accumulation and tumor colonization of Salmonella*. J Immunother Cancer, 2019. **7**(1): p. 44.
72. Eisenstein, T.K., et al., *Immunotherapy of a plasmacytoma with attenuated salmonella*. Med Oncol, 1995. **12**(2): p. 103-8.
73. 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.
74. Sznol, M., et al., *Use of preferentially replicating bacteria for the treatment of cancer*. J Clin Invest, 2000. **105**(8): p. 1027-30.
75. Kaimala, S., et al., *Salmonella-mediated tumor regression involves targeting of tumor myeloid suppressor cells causing a shift to M1-like phenotype and reduction in suppressive capacity*. Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(6): p. 587-99.
76. Lee, C.H., et al., *T cell augments the antitumor activity of tumor-targeting Salmonella*. Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **90**(4): p. 1381-8.
77. Avogadri, F., et al., *Cancer immunotherapy based on killing of Salmonella-infected tumor cells*. Cancer Res, 2005. **65**(9): p. 3920-7.
78. Zetter, B.R., *Angiogenesis and tumor metastasis*. Annu Rev Med, 1998. **49**: p. 407-24.
79. Tu, D.G., et al., *Salmonella inhibits tumor angiogenesis by downregulation of vascular endothelial growth factor*. Oncotarget, 2016. **7**(25): p. 37513-37523.
80. 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.
81. Vola, M., et al., *TLR7 agonist in combination with Salmonella as an effective antimelanoma immunotherapy*. Immunotherapy, 2018. **10**(8): p. 665-679.
82. Vola, M., *Tesis de Maestría: Desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de melanoma utilizando Salmonella atenuada*, in *Desarrollo Biotecnológico*. 2015, Universidad de la República: Montevideo. p. 150.
83. Mónaco, A., *Tesis de Maestría: Salmonella como base para inmunoterapias contra melanoma*, in *Departamento de Desarrollo Biotecnológico*. 2015, Universidad de la República: Montevideo.
84. Grille, S., et al., *Salmonella Enterica serovar Typhimurium immunotherapy for B-Cell Lymphoma induces broad antitumor immunity with therapeutic effect*. Immunology, 2014. **143**(3): p. 428-37.
85. 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.
86. Bascuas, T., et al., *Salmonella Immunotherapy Improves the Outcome of CHOP Chemotherapy in Non-Hodgkin Lymphoma-Bearing Mice*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 7.
87. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6640-5.
88. 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.
89. 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.
90. Hautefort, I., M.J. Proenca, and J.C. Hinton, *Single-copy green fluorescent protein gene fusions allow accurate measurement of Salmonella gene expression in vitro and during infection of mammalian cells*. Appl Environ Microbiol, 2003. **69**(12): p. 7480-91.
91. Stepanovic, S., et al., *A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation*. J Microbiol Methods, 2000. **40**(2): p. 175-9.
92. Miller, M.A., et al., *Tumour-associated macrophages act as a slow-release reservoir of nano-therapeutic Pt(IV) pro-drug*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8692.

93. 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.
94. Obeid, M., et al., *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. *Nat Med*, 2007. **13**(1): p. 54-61.
95. Casares, N., et al., *Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death*. *J Exp Med*, 2005. **202**(12): p. 1691-701.
96. Sukkurwala, A.Q., et al., *Screening of novel immunogenic cell death inducers within the NCI Mechanistic Diversity Set*. *Oncoimmunology*, 2014. **3**: p. e28473.
97. Aoto, K., et al., *Immunogenic tumor cell death induced by chemotherapy in patients with breast cancer and esophageal squamous cell carcinoma*. *Oncol Rep*, 2018. **39**(1): p. 151-159.
98. Galluzzi, L., et al., *Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death*. *J Immunother Cancer*, 2020. **8**(1).
99. Ruhl, S. and P. Broz, *The gasdermin-D pore: Executor of pyroptotic cell death*. *Oncotarget*, 2016. **7**(36): p. 57481-57482.
100. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. *J Leukoc Biol*, 2004. **75**(2): p. 163-89.
101. Angiolillo, A.L., et al., *Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo*. *J Exp Med*, 1995. **182**(1): p. 155-62.
102. 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.
103. Haghnegahdar, H., et al., *The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma*. *J Leukoc Biol*, 2000. **67**(1): p. 53-62.
104. Owen, J.D., et al., *Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine beta and gamma proteins*. *Int J Cancer*, 1997. **73**(1): p. 94-103.
105. Doll, D., et al., *Differential expression of the chemokines GRO-2, GRO-3, and interleukin-8 in colon cancer and their impact on metastatic disease and survival*. *Int J Colorectal Dis*, 2010. **25**(5): p. 573-81.
106. Maghazachi, A.A., A. Al-Aoukaty, and T.J. Schall, *CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells*. *Eur J Immunol*, 1996. **26**(2): p. 315-9.
107. Liang, Z., et al., *CXCR4/CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **359**(3): p. 716-22.
108. Pham, O.H. and S.J. McSorley, *Protective host immune responses to Salmonella infection*. *Future Microbiol*, 2015. **10**(1): p. 101-10.
109. Fridlender, Z.G., et al., *Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN*. *Cancer Cell*, 2009. **16**(3): p. 183-94.
110. Fridlender, Z.G., et al., *Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils*. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e31524.
111. Lichtenstein, A. and J. Kahle, *Anti-tumor effect of inflammatory neutrophils: characteristics of in vivo generation and in vitro tumor cell lysis*. *Int J Cancer*, 1985. **35**(1): p. 121-7.
112. Di Carlo, E., et al., *The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions*. *Blood*, 2001. **97**(2): p. 339-45.
113. Kindzelskii, A.L. and H.R. Petty, *Early membrane rupture events during neutrophil-mediated antibody-dependent tumor cell cytotoxicity*. *J Immunol*, 1999. **162**(6): p. 3188-92.

114. Abi Abdallah, D.S., et al., *Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation*. *Int Immunol*, 2011. **23**(5): p. 317-26.
115. Westphal, K., et al., *Containment of tumor-colonizing bacteria by host neutrophils*. *Cancer Res*, 2008. **68**(8): p. 2952-60.
116. Spicer, J.D., et al., *Neutrophils promote liver metastasis via Mac-1-mediated interactions with circulating tumor cells*. *Cancer Res*, 2012. **72**(16): p. 3919-27.
117. Cools-Lartigue, J., et al., *Neutrophil extracellular traps in cancer progression*. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(21): p. 4179-94.
118. Najmeh, S., et al., *Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells via beta1-integrin mediated interactions*. *Int J Cancer*, 2017. **140**(10): p. 2321-2330.
119. Cools-Lartigue, J., et al., *Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis*. *J Clin Invest*, 2013.
120. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. *Science*, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
121. Mónaco, A., et al., *Salmonella Typhimurium triggers Extracellular Traps release in murine macrophages*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021. **11:639768**.
122. Garg, A.D., et al., *Pathogen response-like recruitment and activation of neutrophils by sterile immunogenic dying cells drives neutrophil-mediated residual cell killing*. *Cell Death Differ*, 2017. **24**(5): p. 832-843.
123. Guo, Q., et al., *New Mechanisms of Tumor-Associated Macrophages on Promoting Tumor Progression: Recent Research Advances and Potential Targets for Tumor Immunotherapy*. *J Immunol Res*, 2016. **2016**: p. 9720912.
124. Aras, S. and M.R. Zaidi, *TAMeless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis*. *Br J Cancer*, 2017. **117**(11): p. 1583-1591.
125. Yang, M., et al., *An obligatory anaerobic Salmonella typhimurium strain redirects M2 macrophages to the M1 phenotype*. *Oncol Lett*, 2018. **15**(3): p. 3918-3922.
126. Zheng, J.H., et al., *Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered Salmonella typhimurium secreting heterologous flagellin*. *Sci Transl Med*, 2017. **9**(376).
127. Buzzo, C.L., et al., *Epigenetic regulation of nitric oxide synthase 2, inducible (Nos2) by NLR4 inflammasomes involves PARP1 cleavage*. *Sci Rep*, 2017. **7**: p. 41686.
128. Jablonski, K.A., et al., *Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages*. *PLoS One*, 2015. **10**(12): p. e0145342.
129. Wynn, T.A. and K.M. Vannella, *Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis*. *Immunity*, 2016. **44**(3): p. 450-462.
130. Arina, A., et al., *Cellular liaisons of natural killer lymphocytes in immunology and immunotherapy of cancer*. *Expert Opin Biol Ther*, 2007. **7**(5): p. 599-615.
131. Taieb, J., et al., *A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance*. *Nat Med*, 2006. **12**(2): p. 214-9.
132. Wculek, S.K., et al., *Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy*. *Nat Rev Immunol*, 2019. **20**(1): p. 7-24.
133. Bottcher, J.P. and C. Reis e Sousa, *The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity*. *Trends Cancer*, 2018. **4**(11): p. 784-792.
134. Demoulin, S., et al., *Tumor microenvironment converts plasmacytoid dendritic cells into immunosuppressive/tolerogenic cells: insight into the molecular mechanisms*. *J Leukoc Biol*, 2013. **93**(3): p. 343-52.
135. Gerlini, G., et al., *Plasmacytoid dendritic cells represent a major dendritic cell subset in sentinel lymph nodes of melanoma patients and accumulate in metastatic nodes*. *Clin Immunol*, 2007. **125**(2): p. 184-93.

136. Aulik, N.A., K.M. Hellenbrand, and C.J. Czuprynski, *Mannheimia haemolytica and its leukotoxin cause macrophage extracellular trap formation by bovine macrophages*. Infect Immun, 2012. **80**(5): p. 1923-33.
137. Mohanan, S., et al., *Identification of macrophage extracellular trap-like structures in mammary gland adipose tissue: a preliminary study*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 67.
138. Wong, K.W. and W.R. Jacobs, Jr., *Mycobacterium tuberculosis exploits human interferon gamma to stimulate macrophage extracellular trap formation and necrosis*. J Infect Dis, 2013. **208**(1): p. 109-19.
139. Richardson, L.A., *How Salmonella survives the macrophage's acid attack*. PLoS Biol, 2015. **13**(4): p. e1002117.
140. Liu, P., et al., *Escherichia coli and Candida albicans induced macrophage extracellular trap-like structures with limited microbicidal activity*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e90042.
141. Doster, R.S., et al., *Macrophage Extracellular Traps: A Scoping Review*. J Innate Immun, 2018. **10**(1): p. 3-13.
142. Webster, S.J., et al., *Distinct cell death programs in monocytes regulate innate responses following challenge with common causes of invasive bacterial disease*. J Immunol, 2010. **185**(5): p. 2968-79.
143. King, P.T., et al., *Nontypeable Haemophilus influenzae induces sustained lung oxidative stress and protease expression*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0120371.
144. Hellenbrand, K.M., et al., *Histophilus somni causes extracellular trap formation by bovine neutrophils and macrophages*. Microb Pathog, 2013. **54**: p. 67-75.
145. Zhao, X., et al., *Biochanin A Enhances the Defense Against Salmonella enterica Infection Through AMPK/ULK1/mTOR-Mediated Autophagy and Extracellular Traps and Reversing SPI-1-Dependent Macrophage (MPhi) M2 Polarization*. Front Cell Infect Microbiol, 2018. **8**: p. 318.
146. Broz, P. and V.M. Dixit, *Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(7): p. 407-20.
147. Zhang, Y., et al., *Recognition and ubiquitination of Salmonella type III effector SopA by a ubiquitin E3 ligase, HsrMA1*. J Biol Chem, 2005. **280**(46): p. 38682-8.
148. Knodler, L.A., V. Nair, and O. Steele-Mortimer, *Quantitative assessment of cytosolic Salmonella in epithelial cells*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e84681.
149. Stevenin, V., et al., *Dynamic Growth and Shrinkage of the Salmonella-Containing Vacuole Determines the Intracellular Pathogen Niche*. Cell Rep, 2019. **29**(12): p. 3958-3973 e7.
150. Vanaja, S.K., et al., *Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation*. Cell, 2016. **165**(5): p. 1106-1119.
151. Golstein, P. and G. Kroemer, *Redundant cell death mechanisms as relics and backups*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1490-6.
152. Tait, S.W., G. Ichim, and D.R. Green, *Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 10): p. 2135-44.
153. Malireddi, R.K.S., S. Kesavardhana, and T.D. Kanneganti, *ZBP1 and TAK1: Master Regulators of NLRP3 Inflammasome/Pyroptosis, Apoptosis, and Necroptosis (PAN-optosis)*. Front Cell Infect Microbiol, 2019. **9**: p. 406.
154. Monaco, A. *Evaluación del rol de la flagelina en el efecto antitumoral de Salmonella enterica serotipo Typhimurium LVR01*. in XV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. 2014. Piriápolis, Uruguay.
155. Miroid, S., et al., *Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic Salmonella typhimurium strain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(17): p. 9845-50.
156. Egan, F., M. Barret, and F. O'Gara, *The SPI-1-like Type III secretion system: more roles than you think*. Front Plant Sci, 2014. **5**: p. 34.

157. Dale, C., T. Jones, and M. Pontes, *Degenerative evolution and functional diversification of type-III secretion systems in the insect endosymbiont Sodalis glossinidius*. *Mol Biol Evol*, 2005. **22**(3): p. 758-66.
158. Iniguez, A.L., et al., *Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2005. **18**(2): p. 169-78.
159. Schikora, M., et al., *An image classification approach to analyze the suppression of plant immunity by the human pathogen Salmonella Typhimurium*. *BMC Bioinformatics*, 2012. **13**: p. 171.
160. Jennings, M.E., et al., *Characterization of Salmonella type III secretion hyper-activity which results in biofilm-like cell aggregation*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e33080.
161. Lin, H.H., et al., *Activation of apoptosis by Salmonella pathogenicity island-1 effectors through both intrinsic and extrinsic pathways in Salmonella-infected macrophages*. *J Microbiol Immunol Infect*, 2020.
162. Hos, N.J., et al., *Type I interferon enhances necroptosis of Salmonella Typhimurium-infected macrophages by impairing antioxidative stress responses*. *J Cell Biol*, 2017. **216**(12): p. 4107-4121.
163. Paquette, N., et al., *Serine/threonine acetylation of TGFbeta-activated kinase (TAK1) by Yersinia pestis YopJ inhibits innate immune signaling*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(31): p. 12710-5.
164. Lu, R., et al., *Enteric bacterial protein AvrA promotes colonic tumorigenesis and activates colonic beta-catenin signaling pathway*. *Oncogenesis*, 2014. **3**: p. e105.
165. Lu, R., et al., *Salmonella Protein AvrA Activates the STAT3 Signaling Pathway in Colon Cancer*. *Neoplasia*, 2016. **18**(5): p. 307-316.
166. Lamkanfi, M., et al., *Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia*. *J Immunol*, 2010. **185**(7): p. 4385-92.
167. Yang, H., et al., *A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(26): p. 11942-7.
168. Apetoh, L., et al., *The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy*. *Immunol Rev*, 2007. **220**: p. 47-59.
169. Luo, C., et al., *Toll-Like Receptor 4 Signaling in High Mobility Group Box-1 Protein 1 Mediated the Suppression of Regulatory T-Cells*. *Med Sci Monit*, 2017. **23**: p. 300-308.
170. Thibaut, R., et al., *Bystander IFN-γ activity promotes widespread and sustained cytokine signaling altering the tumor microenvironment*. *Nature Cancer*, 2020. **1**: p. 302-314.
171. Enamorado, M., et al., *Enhanced anti-tumour immunity requires the interplay between resident and circulating memory CD8(+) T cells*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 16073.
172. Galvez-Cancino, F., et al., *Vaccination-induced skin-resident memory CD8(+) T cells mediate strong protection against cutaneous melanoma*. *Oncoimmunology*, 2018. **7**(7): p. e1442163.
173. Awad, F., et al., *Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation*. *PLoS One*, 2017. **12**(4): p. e0175336.
174. Wang, Y.C., et al., *Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses*. *Cancer Res*, 2010. **70**(12): p. 4840-9.
175. Guo, H., et al., *Targeting the Notch signaling pathway in cancer therapeutics*. *Thorac Cancer*, 2014. **5**(6): p. 473-86.
176. Hu, J.J., et al., *FDA-approved disulfiram inhibits pyroptosis by blocking gasdermin D pore formation*. *Nat Immunol*, 2020.
177. Nagarajan, K., et al., *Activation of Pyroptotic Cell Death Pathways in Cancer: An Alternative Therapeutic Approach*. *Transl Oncol*, 2019. **12**(7): p. 925-931.

178. Chen, K.W., et al., *The neutrophil NLRC4 inflammasome selectively promotes IL-1beta maturation without pyroptosis during acute Salmonella challenge*. Cell Rep, 2014. **8**(2): p. 570-82.
179. Emran, A.A., et al., *Do innate killing mechanisms activated by inflammasomes have a role in treating melanoma?* Pigment Cell Melanoma Res, 2020. **33**(5): p. 660-670.
180. Karan, D., *Inflammasomes: Emerging Central Players in Cancer Immunology and Immunotherapy*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 3028.
181. Kantono, M. and B. Guo, *Inflammasomes and Cancer: The Dynamic Role of the Inflammasome in Tumor Development*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1132.
182. Okamoto, M., et al., *Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1beta*. J Biol Chem, 2010. **285**(9): p. 6477-88.
183. Zaki, M.H., et al., *IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation*. J Immunol, 2010. **185**(8): p. 4912-20.
184. Park, H., et al., *Enhanced IL-18 expression in common skin tumors*. Immunol Lett, 2001. **79**(3): p. 215-9.
185. Miao, E.A., et al., *Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(7): p. 3076-80.
186. Pallen, M.J., S.A. Beatson, and C.M. Bailey, *Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective*. FEMS Microbiol Rev, 2005. **29**(2): p. 201-29.
187. Kayagaki, N., et al., *Noncanonical inflammasome activation by intracellular LPS independent of TLR4*. Science, 2013. **341**(6151): p. 1246-9.
188. Galan, J.E., et al., *Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells*. Annu Rev Microbiol, 2014. **68**: p. 415-38.
189. Broz, P. and D.M. Monack, *Molecular mechanisms of inflammasome activation during microbial infections*. Immunol Rev, 2011. **243**(1): p. 174-90.
190. Pawelek, J.M., et al., *Salmonella pathogenicity island-2 and anticancer activity in mice*. Cancer Gene Ther, 2002. **9**(10): p. 813-8.
191. Mantovani, A., et al., *Cancer-related inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 436-44.
192. Song, X.D., et al., *Advances in research on the interaction between inflammation and cancer*. J Int Med Res, 2019: p. 300060519895347.
193. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
194. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-99.
195. Karin, M. and F.R. Greten, *NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(10): p. 749-59.
196. Taniguchi, K. and M. Karin, *NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(5): p. 309-324.
197. Netea, M.G., J. Quintin, and J.W. van der Meer, *Trained immunity: a memory for innate host defense*. Cell Host Microbe, 2011. **9**(5): p. 355-61.
198. Netea, M.G., et al., *Defining trained immunity and its role in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(6): p. 375-388.
199. Berendsen, M.L.T., et al., *Maternal Priming: Bacillus Calmette-Guerin (BCG) Vaccine Scarring in Mothers Enhances the Survival of Their Child With a BCG Vaccine Scar*. J Pediatric Infect Dis Soc, 2019. **9**(2): p. 166-172.
200. Kaufmann, E., et al., *BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis*. Cell, 2018. **172**(1-2): p. 176-190 e19.

201. Netea, M.G., L.A.B. Joosten, and J.W.M. van der Meer, *Hypothesis: stimulation of trained immunity as adjunctive immunotherapy in cancer*. *J Leukoc Biol*, 2017. **102**(6): p. 1323-1332.
202. Priem, B., et al., *Trained Immunity-Promoting Nanobiologic Therapy Suppresses Tumor Growth and Potentiates Checkpoint Inhibition*. *Cell*, 2020. **183**(3): p. 786-801 e19.
203. Kleinnijenhuis, J., et al., *Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(43): p. 17537-42.
204. Christ, A., et al., *Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming*. *Cell*, 2018. **172**(1-2): p. 162-175 e14.
205. Buffen, K., et al., *Autophagy controls BCG-induced trained immunity and the response to intravesical BCG therapy for bladder cancer*. *PLoS Pathog*, 2014. **10**(10): p. e1004485.
206. Ifrim, D.C., et al., *Trained immunity or tolerance: opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors*. *Clin Vaccine Immunol*, 2014. **21**(4): p. 534-45.
207. Mandell, D. and J. Bennett, *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. 2010, Cambridge, UK: Elsevier.
208. Pokhrel, B.M., et al., *Distribution of antibody titer against Salmonella enterica among healthy individuals in nepal*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2009. **8**: p. 1.
209. Patki, R., S. Lilani, and D. Lanjewar, *Baseline Antibody Titre against Salmonella enterica in Healthy Population of Mumbai, Maharashtra, India*. *Int J Microbiol*, 2017. **2017**: p. 9042125.
210. Felgner, S., et al., *Engineered Salmonella enterica serovar Typhimurium overcomes limitations of anti-bacterial immunity in bacteria-mediated tumor therapy*. *Oncoimmunology*, 2018. **7**(2): p. e1382791.
211. Demers, M., et al., *Priming of neutrophils toward NETosis promotes tumor growth*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(5): p. e1134073.
212. Albregues, J., et al., *Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice*. *Science*, 2018. **361**(6409).
213. Park, J., et al., *Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps*. *Sci Transl Med*, 2016. **8**(361): p. 361ra138.
214. Hu, Q., et al., *Increased neutrophil extracellular traps activate NLRP3 and inflammatory macrophages in adult-onset Still's disease*. *Arthritis Res Ther*, 2019. **21**(1): p. 9.
215. Snoderly, H.T., B.A. Boone, and M.F. Bennewitz, *Neutrophil extracellular traps in breast cancer and beyond: current perspectives on NET stimuli, thrombosis and metastasis, and clinical utility for diagnosis and treatment*. *Breast Cancer Res*, 2019. **21**(1): p. 145.
216. Sabbione, F., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Stimulate Proinflammatory Responses in Human Airway Epithelial Cells*. *J Innate Immun*, 2017. **9**(4): p. 387-402.
217. Kahlenberg, J.M., et al., *Neutrophil extracellular trap-associated protein activation of the NLRP3 inflammasome is enhanced in lupus macrophages*. *J Immunol*, 2013. **190**(3): p. 1217-26.
218. Tall, A.R. and M. Westerterp, *Inflammasomes, neutrophil extracellular traps, and cholesterol*. *J Lipid Res*, 2019. **60**(4): p. 721-727.
219. Nakazawa, D., et al., *The responses of macrophages in interaction with neutrophils that undergo NETosis*. *J Autoimmun*, 2016. **67**: p. 19-28.
220. Zhang, Y., et al., *In Vitro Stimulation and Visualization of Extracellular Trap Release in Differentiated Human Monocyte-derived Macrophages*. *J Vis Exp*, 2019(153).

ANEXO 1. Trabajos derivados de esta Tesis

Publicaciones directamente asociadas a esta Tesis

Salmonella Typhimurium triggers Extracellular Traps release in murine macrophages. Amy Mónaco, Nicole Canales-Huerta, Jorge Jara, Steffen Härtel, José Alejandro Chabalgoity, María Moreno, Paola Scavone. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2021, doi: [10.3389/fcimb.2021.639768](https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.639768)

Salmonella antitumor effect requires inflammasome activation and macrophage recruitment to tumor microenvironment. Amy Mónaco, Sofia Chilibroste, Lucía Yim, José Alejandro Chabalgoity, María Moreno (submitted, *Cancer Immunology, Immunotherapy*, Submission id CIIM-D-21-00338)

Publicaciones asociadas al área de trabajo de esta Tesis

TLR7 agonist in combination with Salmonella as an effective antimelanoma immunotherapy. Magdalena Vola, Amy Mónaco, Thais Bascuas, Geraldine Rimsky, Caroline Isabel Agorio, José Alejandro Chabalgoity, María Moreno. *Immunotherapy* 2018 Jun;10(8):665-679. doi: [10.2217/imt-2017-0188](https://doi.org/10.2217/imt-2017-0188)

Preclinical evaluation of attenuated Salmonella as neoadjuvant intralesional therapy for chemotherapy-treated melanoma. Sofia Chilibroste, Amy Mónaco, María Clara Plata, Magdalena Vola, Caroline Agorio, José Alejandro Chabalgoity, María Moreno (submitted, *Journal of Investigative Dermatology*, Submission id JID-2021-0419)

Presentaciones orales dictadas

Rol del inflammasoma en el efecto anti-melanoma de Salmonella. I Congreso Nacional de Biociencias, Montevideo, Uruguay (2017)

Trampas extracelulares de macrófagos: un nuevo mecanismo inmune contra Salmonella. II Congreso Nacional de Biociencias, Montevideo, Uruguay (2019)

Presentaciones de poster en congresos

Salmonella, melanoma and inflammasome activation: unraveling networks. Amy Mónico, Lucía Yim, José Alejandro Chabalgoity, María Moreno.

XI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Inmunología - Inmunocolombia, Medellín, Colombia (2015)

Salmonella mediated anti-melanoma effect is dependent on caspase-1 activation. Amy Mónico, Lucía Yim, José Alejandro Chabalgoity, María Moreno.

XII Congress of the Latin American Association of Immunology, Cancún, México (2018)

Salmonella: un aliado en la lucha contra el cáncer. Victoria Pérez, Amy Mónico, Anaclara Pregliasco, Bruno D'Alessandro, María Moreno, Laura Betancor.

III Encuentro de Jóvenes Microbiólogos, Montevideo, Uruguay (2018)

Macrophage recruitment is essential for the antitumoral effect of Salmonella. Amy Mónico, Sofía Chilibroste, José Alejandro Chabalgoity, María Moreno.

XIII World Immune Regulation Meeting, Davos, Suiza (2019)

Macrófagos y su defensa frente a Salmonella: trampas extracelulares. Amy Mónico, María Moreno, José Alejandro Chabalgoity, Paola Scavone.

XLI SOMICH, Puerto Varas, Chile (2019)

Salmonella Typhimurium: one microorganism, many types of induced cell death. Amy Mónico, Lucía Yim, José Alejandro Chabalgoity, María Moreno.

Keystone Symposia Conference: "Why So Many Ways to Die? Apoptosis, Necroptosis, Pyroptosis and Beyond", Guarujá, San Pablo, Brasil (2019)

Evaluación del rol de LT CD8, NK y neutrófilos en el efecto anti-tumoral inducido por Salmonella en modelo murino de melanoma. María Clara Plata, Amy Mónico, Sofía Chilibroste, José Alejandro Chabalgoity, María Moreno

2do Encuentro Bienal de la SBBM, Montevideo, Uruguay (2020)

ANEXO 2. Proyectos relacionados con esta Tesis

Trasladando *Salmonella* a la clínica: evaluación de su potencial como terapia adyuvante para el tratamiento de cáncer. CSIC I+D Convocatoria 2018. Responsable: Dra. María Moreno

***Salmonella* y su actividad antitumoral: descifrando el código.** CSIC Iniciación Convocatoria 2017. Co-responsables: M.Sc. Amy Mónaco y Lic. Victoria Pérez

***Salmonella* en combinación con aptameros inhibidores de puntos de control del sistema inmune como nueva opción terapéutica para el tratamiento de melanoma.** ANII – Fondo Clemente Estable Convocatoria 2017. Responsables: Dra. María Moreno y Dra. Victoria Calzada

Derribando paradigmas: dacarbazina junto a *Salmonella* para el tratamiento de melanoma. Proyecto de investigación financiado por La Fundación La Roche-Posay América Latina Convocatoria 2014. Responsables: Dra. Magdalena Vola y Dra. María Moreno

ANEXO 3. Premios asociados a esta Tesis

EFIS-EJI Travel Grant (European Federation of Immunological Societies), premio basado en la calidad del resumen submitido al XIII World Immune Regulation Meeting, Suiza (2019)

Mejor póster en la categoría "Salud Humana y Animal" en el III Encuentro Nacional de Jóvenes Microbiólogos (2018)

Premio a la Mejor Publicación Reciente, otorgado por La Fundación La Roche-Posay América Latina, por el artículo científico "*TLR7 agonist in combination with Salmonella as an effective antimelanoma immunotherapy*" (2018)

AAI Young Investigator Award/ALAI-SMI International Travel Award, premio otorgado sobre la base del mérito científico a estudiantes doctorales y posdoctorales presentando sus resultados más actuales en el XII Congreso de la Asociación Latino Americana de Inmunología (2018)

The Bill and Melinda Gates Foundation Young Investigator Award, premio otorgado estudiantes de doctorado, pos-docs o inmunólogos recién graduados sugeridos por su respectiva Sociedad Nacional de Inmunología cuyo resumen haya sido aceptado para el IMMUNOCOLOMBIA 2015 (2015)

Premio al Mejor Proyecto de Investigación en Dermatología, otorgado por La Fundación La Roche-Posay América Latina en el marco del 10mo Concurso para Dermatólogos Investigadores, por el proyecto "*Derribando paradigmas: dacarbazina junto a Salmonella para el tratamiento de melanoma*" (2015)