A microscopic illustration showing a cluster of cells, likely representing a tumor model. The cells are depicted in various shades of grey and purple. Several yellow, rod-shaped bacteria, representing Salmonella Typhimurium, are shown both within the cell cluster and in the surrounding environment. A red, fibrous structure, possibly a blood vessel or connective tissue, is visible on the right side of the cluster.

“Caracterización de la invasión y del efecto antitumoral de cepas atenuadas de *Salmonella Typhimurium* en un modelo de cáncer de mama metastásico”

**Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas PEDECIBA
Orientación Biología Celular y Molecular**

Lic. Martín Masner

Orientador: Dra. María Gabriela Kramer

Co-orientador: Dr. Alejandro Chabalgoity

- 2015-

Laboratorio de Vacunas Recombinantes, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina

ÍNDICE

Índice	2
Resumen	5
1. Abreviaciones	6
2. Introducción	8
2.1. El desarrollo del cáncer como fenómeno multifactorial	8
2.1.1. El origen de la célula neoplásica	8
2.1.2. Crecimiento tumoral, vascularización y metástasis	9
2.1.3. El sistema inmune y el cáncer	12
2.2. Cáncer de mama: Epidemiología, Diagnóstico y Tratamiento	16
2.3. Las inmunoterapias contra el cáncer	17
2.3.1. Características y su actualidad en la clínica	17
2.3.2. Inmunoterapias antitumorales basadas en bacterias	19
2.4. <i>Salmonella</i> Typhimurium: del patógeno al agente antitumoral	22
2.4.1. Características generales	22
2.4.2. Potencial antitumoral	24
3. Hipótesis y objetivos	29
3.1. Objetivo general:	29
3.2. Objetivos específicos:	30
4. Materiales y Métodos	31
4.1. Cepas atenuadas de <i>Salmonella</i> y líneas celulares eucariotas usadas en el estudio.	31
4.2. Ensayos de invasión/replicación bacteriana mediante protección contra Gentamicina	31
4.2.1. Determinación de bacterias intracelulares por lisis y plaqueo.	34
4.2.2. Análisis por citometría de flujo de la invasión/replicación bacteriana	34
4.2.3. Visualización por microscopia de epifluorescencia del proceso de invasión/replicación de especímenes fijados	34
4.2.4. Determinación de la integridad y viabilidad celular en monocapas infectadas “vivas”	35
4.2.5. Localización subcelular y análisis de la progresión del fenómeno de invasión/replicación por microscopia de fluorescencia confocal.	35

4.3. Modelo murino de cáncer de mama metastásico 4T1 _____	36
4.4. Estudios de biodistribución de LVR01 en ratones en el modelo animal 4T1 _____	37
4.4.1. Biodistribución de LVR01 en ratones portadores de tumores _____	37
4.4.2. Biodistribución en ratones con enfermedad metastásica residual sin tumor primario _____	38
4.4.3 Distribución histológica por microscopia de fluorescencia _____	38
4.5. Determinación del efecto antitumoral de LVR01 en el modelo 4T1. _____	39
4.6. Evaluación de respuestas inmunes inducidas por LVR01 _____	39
4.6.1. Leucocitos presentes en tumor y ganglio drenante _____	39
4.6.2. Citoquinas circulantes en sangre _____	40
4.6.3. Respuesta serológica contra células tumorales _____	40
4.7. Análisis estadístico _____	41
5. Resultados _____	42
5.1 Estudios <i>in vitro</i> de la capacidad invasiva y replicativa de Salmonella thyphimurium atenuadas en células tumorales de cáncer mamario. _____	42
5.1.2. Cinética de recuperación de CFUs de LVR01 en ensayo de invasión/replicación _____	43
5.1.3. Cinética de LVR01GFP y SL3261GFP en ensayo de invasión/replicación medida por citometría de flujo _____	43
5.1.4. Evaluación de los efectos de la invasión/replicación de LVR01 por microscopia de epifluorescencia _____	46
5.1.5. Análisis de localización subcelular y de la progresión de la replicación intracelular de LVR01GFP mediante microscopia confocal. _____	50
5.2. Evaluación de la administración in vivo de STAs como agente antitumoral. _____	53
5.2.2. Biodistribución in vivo de la STA LVR01GFP en el modelo animal 4T1 _____	53
5.2.3. Distribución de LVR01 in vivo mediante microscopia de fluorescencia en cortes histológicos. _____	59
5.2.4. Efectos sobre la sobrevida y el crecimiento tumoral de la administración de LVR01 a animales portadores de enfermedad tumoral/ metastásica. _____	65
5.3. Respuesta inmune inducida por la administración de LVR01 intratumoral _____	68
5.3.1. Análisis de poblaciones inmunes presentes en tumor y ganglio _____	69
5.3.2. Niveles de IFN- γ presentes en suero _____	71
5.3.3. Presencia de anticuerpos que reconocen antígenos de células tumorales _____	71
6. Discusión _____	74

7. Conclusiones	96
8. Perspectivas	98
9. Agradecimientos	99
10. Bibliografía	100

RESUMEN

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en la mujer a nivel mundial. En Uruguay, año a año, miles de mujeres son diagnosticadas y aproximadamente 600 de ellas fallecen a causa de esta enfermedad. Los tratamientos actuales junto a las capacidades de diagnóstico precoz han mejorado la expectativa de vida de las pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, existen problemas como la recurrencia del tumor primario, la aparición de metástasis y la resistencia y/o toxicidad asociados al tratamiento. Estos retos en la clínica oncológica necesitan de nuevas opciones terapéuticas para poder combatir esta enfermedad eficazmente. Una de las barreras que dificultan las terapias contra el cáncer es la existencia de un estado de inmunosupresión inducido por el tumor. Décadas de investigación sobre la inmunobiología tumoral han dado lugar a diversos tipos de inmunoterapias para combatir este proceso, algunas de las cuales se utilizan actualmente en la clínica. Históricamente, una de las primeras inmunoterapias contra el cáncer, se basó en bacterias. Hoy en día, el éxito de bacterias atenuadas como el *Bacillus Calmette Guerin* como agente de tratamiento contra el cáncer de vejiga superficial, y los estudios con varios géneros bacterianos (como *Salmonella*) capaces de colonizar tumores, alienta al estudio de nuevas inmunoterapias basadas en bacterias. En este trabajo proponemos el uso de una cepa atenuada de *Salmonella* Typhimurium para combatir la enfermedad tumoral y metastásica, en un modelo murino de cáncer mamario. Hemos encontrado que la cepa LVR01 de *Salmonella* es capaz de infectar y destruir células *in vitro*, y se distribuye preferencialmente en los tumores *in vivo*. La administración en neo-adyuvancia (previo a la remoción quirúrgica del tumor) posee un efecto antitumoral manifiesto en un aumento significativo de la supervivencia de animales con enfermedad metastásica. La administración de esta bacteria es capaz de activar una respuesta inmune tanto humoral como celular movilizando células mieloides y linfoides a nivel de ganglio y tumor. Estos resultados, indican la conveniencia de tratamientos neo-adyuvantes con esta bacteria en conjunción con cirugías u otras terapias que potencien su efecto antitumoral.

1.ABREVIACIONES

ATP- Adenosín trifosfato

BD- Beckton Dickinson®

BSA- Seroalbumina Bovina

CD- *Cluster of Differentiation*

CFU- Unidad formadora de colonia

CTLA-4 - *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*

DAPI- 4',6-Diamidino-2-fenylindol

DAMP- *Danger Associated Molecular Pattern*

DMEM- Dulbecco's Modified Earle's Medium

DsRed- Proteína Fluorescente roja de *Discosoma sp.*

GFP- Proteína Fluorescente Verde de *Aequorea victoria*

HMGB1- *High-mobility group protein B1*

H₂O_d- Agua destilada

IL- Interleuquina

IT- Intratumoral

IP-Intraperitoneal

IV-Intravenoso

LB- Luria Broth (Medio de cultivo bacteriano)

LPS- Lipopolisacarido

MIC- *MHC class I polypeptide-related sequence*

MFI- Intensidad media de fluorescencia

OCT- *Optimal cutting temperature compound*

ON- *“Overnight” (12-18hs)*

PAMP- *Pathogen Associated Molecular Pattern*

PBS- Buffer fosfato salino

PFA- Paraformaldehido

ROI- Región de interés

SFB- Suero Fetal Bovino

SSTIII- Sistema de secreción del tipo III

STA- *Salmonella Typhimurium Atenuada*

TGF- β - Tumor growth factor Beta

WGA- Aglutininas de germen de Trigo

MDSC- *Myeloid Derived Supressor Cells*

NK- *Natural Killer*

NKT- *Natural Killer T cell*

T $\gamma\delta$ - Linfocito T gamma delta

T CD4- Linfocito T *“helper”*

T CD8- Linfocito T citotóxico

Treg- Linfocito T regulador

2. INTRODUCCIÓN

2.1. EL DESARROLLO DEL CÁNCER COMO FENÓMENO MULTIFACTORIAL

2.1.1. El origen de la célula neoplásica

El cáncer consiste en un grupo de enfermedades que tienen en común la proliferación descontrolada de un grupo de células de un individuo, que poseen la capacidad de diseminarse e invadir tejidos sanos [1]. Esta enfermedad usualmente se origina a partir de una única célula y el proceso de transformación de una célula normal a neoplásica puede darse en una enorme variedad de tipos celulares. Distintos mecanismos homeostáticos funcionan a distintos niveles para evitar la aparición de células cancerosas y la dificultad para sortearlos hace que el proceso de transformación se desarrolle típicamente a lo largo de décadas. El balance entre el grado proliferación y la muerte celular mantiene a los tejidos en correcto funcionamiento. [2]. La frecuencia de división celular está regulada por la maquinaria del ciclo celular la cual ejerce un control estricto, que compone la primera barrera contra el desarrollo de células tumorales. Hay genes que estimulan positivamente la proliferación celular (proto-oncogenes) cuando son activados de manera fisiológica, durante el crecimiento y la regeneración de los tejidos. Por otro lado también existen genes llamados “supresores de tumores” cuyos productos proteicos actúan controlando el estado de la célula, siendo capaces de detectar alteraciones y en algunos casos, pueden incluso destinarla a una muerte celular programada o apoptosis. En la aparición de una célula que se transforma a un fenotipo tumoral, se propone que es fundamental la acumulación de daños irreparables en los genes responsables de la regulación de la proliferación y muerte celular [3]. Estas mutaciones confieren un fenotipo alterado que aumenta la frecuencia de división celular (activación de oncogenes a partir de proto-oncogenes) y sin freno (inactivación de genes supresores de tumores), dando lugar a una neoplasia (masa de células proliferativas) [4].

Las células neoplásicas entonces adquieren un fenotipo de inestabilidad genética asociado a su potencial replicativo sin control. Esto profundiza los

cambios genotípicos a nivel de la población proliferante y da lugar a una diversidad de genotipos individuales. Estos genotipos, en tanto den lugar a fenotipos diferenciables y heredables, son sujeto de selección natural a nivel celular convirtiendo a la población cancerosa/tumoral en una entidad que evoluciona dinámicamente [5] [6]. Una vez que se pasa la primera barrera del freno al crecimiento celular, esta capacidad evolutiva de la masa tumoral le permite adaptarse y ganar funciones que permiten su desarrollo y la evasión de más mecanismos de defensa antitumoral.

2.1.2. Crecimiento tumoral, vascularización y metástasis

Durante el desarrollo de un tumor sólido, las células en continua replicación se agrupan en una forma usualmente esférica. A medida que el tumor crece en volumen, la distribución de nutrientes y la difusión de gases se hace desigual en las zonas del tumor [7]. La capa externa de hasta 1mm tiene un adecuado nivel de abastecimiento y las células continúan replicando normalmente, pero las células interiores, se encuentran en un entorno hipóxico, dando lugar a una tasa replicativa menor y a necrosis. Esta barrera al crecimiento creada en este entorno hipóxico es superada parcialmente cuando las células activan la respuesta por hipoxia, para restablecer el abastecimiento de nutrientes a la zona y el correcto intercambio gaseoso. En consecuencia se secretan mediadores solubles como el VEGF-1 (*vascular endothelial growth factor 1*) que actuando sobre las células endoteliales vasculares, estimulan la neo-vascularización en el entorno tumoral, resultando en el proceso de neo-angiogénesis. Inicialmente se activa el endotelio vascular, iniciando la remodelación del tejido que permita la llegada de los vasos por migración celular. Las células endoteliales proliferan y se disponen de manera desorganizada en el entorno tumoral, para después conectarse entre sí y con asociarse con células musculares lisas y pericitos, resultando en microvasculatura funcional [8]. Una vez que el tumor vascularizado se encuentra conectado íntimamente a la circulación sistémica, se aumenta la chance de que las células tumorales puedan invadir a otros sitios. Los tumores pueden invadir los tejidos circundantes mediante la remodelación de la matriz extracelular, la disrupción de la lámina basal y la migración celular.

La colonización por parte de células cancerosas de sitios distintos que distan del tumor primario se denomina metástasis. La metástasis puede dar lugar a nuevos tumores esparcidos por todo el cuerpo (a veces inoperables) y normalmente esta condición lleva a la muerte del individuo afectado [9]. Los eventos de metástasis no solo se ven influenciados por la capacidad invasiva y la diseminación por la vasculatura sino que también dependen de la interacción con las células en el sitio colonizado [10]. No todas las células que componen un tumor son iguales en su capacidad metastásica e incluso se propone que solo un conjunto específico puede dar lugar a nuevos tumores. A estas células se las denomina “células madre del cáncer” (*cancer stem cells* en inglés), ya que comparten ciertos marcadores con las células madre convencionales y son capaces de autorenovarse y dar lugar a células tumorales diferenciadas (no *stem cell*). Se les considera portadores de un potencial metastásico elevado, resistentes al tratamiento quimioterápico y responsables de las recaídas, ya que su potencial replicativo permite la generación de tumores a partir de un número menor de células [11].

Las células que inician un proceso tumoral se desarrollan en un microambiente de diversidad de tipos celulares no tumorales. La interacción con estas células puede influenciar positiva o negativamente el crecimiento tumoral. Los acontecimientos asociados a estas interacciones, responden a un orden esencialmente secuencial durante la progresión tumoral (ilustrado en la Figura 1). Las células tumorales como se ha mencionado durante el proceso de angiogénesis, envían señales a otros tipos celulares, desencadenando respuestas concretas. Otros tipos celulares con los que pueden presentar interacciones relevantes para el desarrollo tumoral, son con los fibroblastos y con las células del sistema inmune[12], [13][14].

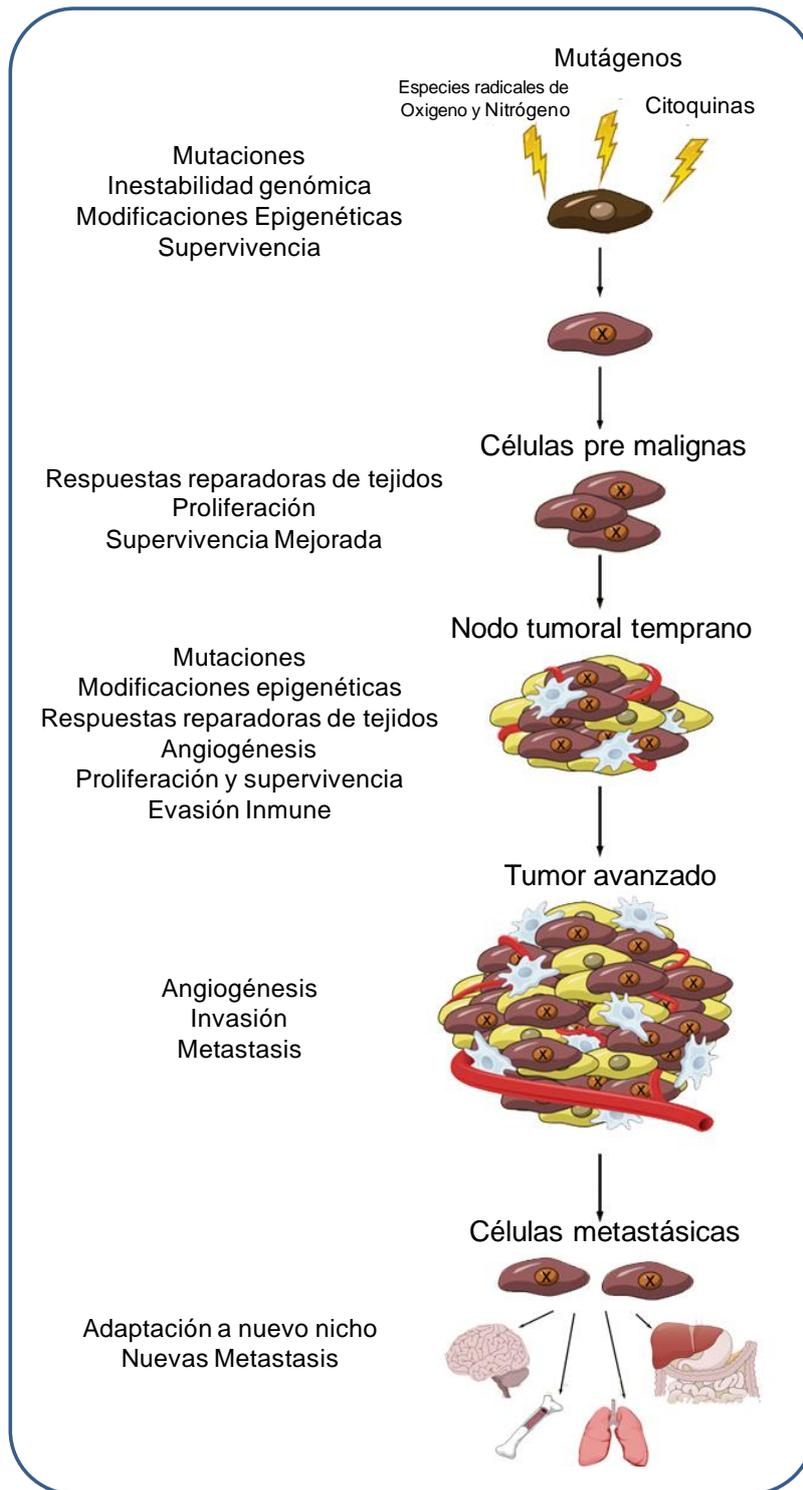


Figura 1. Factores involucrados en el desarrollo del cáncer. Factores ambientales y propios del organismo pueden promover la aparición de una célula tumoral. La asociación de esta célula con otros tipos celulares genera una interacción que modela el microambiente tumoral, promoviendo el crecimiento tumoral y ayudando a la evasión inmune del mismo. El crecimiento tumoral puede desencadenar respuestas angiogénicas, que sumadas a la capacidad invasiva puede resultar en un crecimiento invasivo local o incluso metástasis distantes a otros sitios. Adaptado de: Grivennikov, S. *et al* (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6), 883–99.][15]

2.1.3. El sistema inmune y el cáncer

El sistema inmune constituye otro mecanismo homeostático que es capaz de prevenir la aparición de tumores [16]. Este se enfrenta a la difícil misión de encontrar los pocos rasgos que permitan diferenciar a una célula tumoral del resto de las células presentes en el organismo. Para empezar, la identidad antigénica de la célula tumoral es la misma que la del individuo portador, siendo estas células naturalmente toleradas por el individuo. En tumores no generados por virus, las únicas alteraciones que puede detectar el sistema inmune adaptativo son aquellas que se generan por la expresión de antígenos específicos de tumor (presentes solamente en el tumor, por proteínas mutadas o alteradas) o asociados a tumor (de expresión diferencial en tumores, pero también presente a menor nivel en tejidos sanos). Sin embargo, usualmente las células transformadas se encuentran bajo cierto estrés metabólico que puede desencadenar señales reconocibles por el sistema inmune innato. Uno de los eventos desencadenados por el estrés celular puede ser la propia muerte de la célula, donde la apoptosis (clásicamente interpretada como anti inflamatoria) y la necrosis pueden exponer y/o liberar moléculas pro inflamatorias [17], [18], [19]. Como ejemplo los linfocitos como los NK (*natural killer*), NK-T (*natural killer T cells*) y los T- $\gamma\delta$, (linfocitos T *gamma delta*) son capaces de censar las proteínas MICA y MICB presentes en la superficie de las células pudiendo inducir inflamación o la muerte celular de una célula alterada [20][21]. Como resultado del estrés celular, acontece la exposición y/o liberación de proteínas y moléculas pequeñas típicamente intracelulares, como la HMGB1, la calreticulina, las *heat shock proteins* y el ATP, que también pueden ser interpretadas como señales de peligro que desencadenen inflamación y activación del sistema inmune [22]. La detección de antígenos tumorales y de señales de estrés celular asociado a la transformación permite que a lo largo de la vida de un individuo sano, numerosas micro-lesiones tumorales sean eliminadas, pero eventualmente una puede escapar a la inmunovigilancia y progresar a ser un tumor [16]. Esto se logra mediante mecanismos que evaden la acción del sistema inmune, como la modulación negativa de la presentación de antígenos tumorales (y/o signos de stress celular), la resistencia a la inducción de muerte celular, el envío de señales

inmunosupresoras y la inactivación funcional de linfocitos [3]. Una vez que desarrollan estos mecanismos, las células inmunes que llegan al ambiente tumoral son ineficientes en montar una respuesta efectora contra el tumor. Estos leucocitos infiltrantes al tumor pueden ser influenciados por las señales inmunosupresoras enviadas por las células cancerosas, convirtiéndose ellos mismos a un fenotipo inmunosupresor y generando un “velo inmunológico”[23]. No solo los macrófagos y fibroblastos que residen en la lesión tumoral pueden ser influenciados de manera de promover el desarrollo del tumor, sino que existe un reclutamiento activo de diversos tipos celulares, especialmente células mieloides y linfocitos [12]. Evidencia creciente apoya el rol de la relación entre las MDSCs (*myeloid derived supresor cells*) y los linfocitos Treg (linfocitos T reguladores) para el desarrollo y mantenimiento de la inmunosupresión. Las MDSCs son un grupo heterogéneo de células inmaduras derivadas de médula ósea que pueden inhibir las respuestas citotóxicas de las células T mediante interacciones de contacto, basándose en la liberación “a quemarropa” de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como en la expresión de las proteínas de membrana CTLA-4 y mTGF- β [24]. Típicamente se las divide en granulocíticas (G-MDSCs) y monocíticas (M-MDSCs), variando sus mecanismos de acción y su frecuencia relativa en distintos tipos de tumores. La presencia de MDSCs induce la diferenciación funcional de los linfocitos T *naive* a linfocitos Treg, los cuales poseen potentes mecanismos inmunosupresores sobre una amplia variedad de células inmunes. Estos linfocitos, a través del CD25 en su superficie (un receptor de alta afinidad de IL-2) pueden secuestrar la IL-2 necesaria para la activación y proliferación de linfocitos efectores, privándolos de los estímulos necesarios para sobrevivir e induciendo la apoptosis sobre ellos. La expresión de granzimas dota de capacidad citotóxica a los linfocitos Treg, que resulta en la inducción de apoptosis a los linfocitos efectores cercanos. Los Tregs presentan en membrana al CTLA-4 y mTGF- β y son capaces de liberar citoquinas anti-inflamatorias como la IL-35 y la IL-10 resultando en inhibiciones (contacto dependientes e independientes) funcionales a células presentadoras de antígeno así como a linfocitos efectores [25], [26]. El estudio de la inmunobiología tumoral (así como la relacionada con trasplantes y autoinmunidad) ha visto crecer la lista de

células inmunes con fenotipo inmunosupresor (representada gráficamente en la Figura 2), implicando a células NKT, células B reguladoras, células dendríticas inmaduras y otras [23]. Los numerosos mecanismos redundantes, independientes y sinérgicos de inmunosupresión crean un ambiente intrincado desde el punto de vista celular y molecular que es difícil de revertir, añadiendo una capa de complejidad adicional y representando un nuevo desafío en la terapia contra el cáncer.

En consecuencia un tumor se desarrolla a partir de una masa proliferativa de células, que ante un ineficaz sistema inmune, permite que las células cancerosas puedan expandirse e incluso esparcirse, mediante su capacidad invasiva, angiogénica y metastásica. Estos procesos comunes a la mayoría de los tumores malignos, pueden variar en el detalle a nivel molecular de tumor a tumor, e incluso durante la evolución de un tumor. La diversidad de mecanismos mediante los cuales los distintos tipos de tumores logran establecerse e invadir nuevos sitios, hacen necesario integrar la realidad molecular y celular para lograr un diagnóstico y tratamiento adecuado.

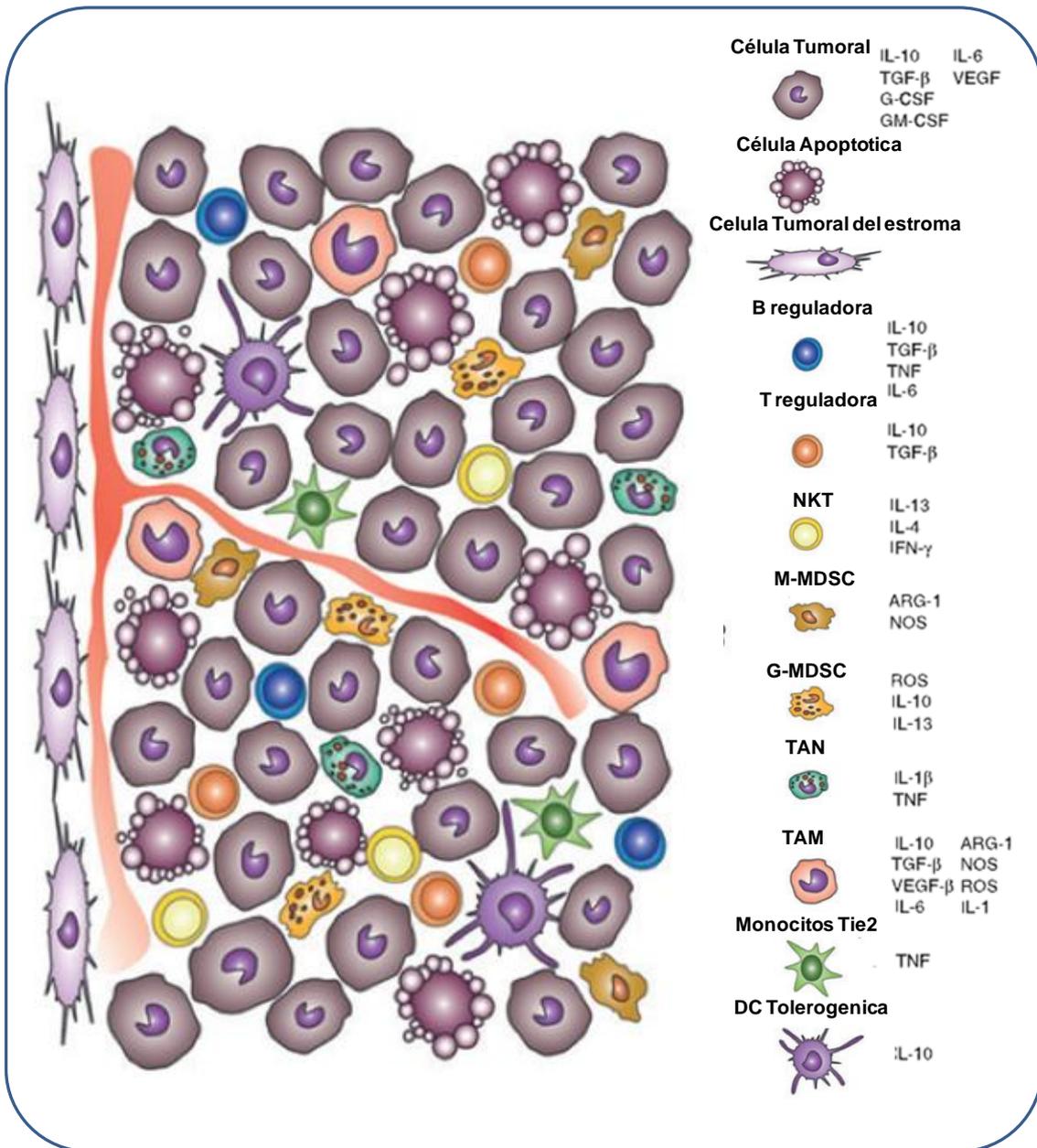


Figura 2. El microambiente tumoral inmunosupresor. Las células tumorales reclutan leucocitos e inducen su fenotipo inmunosupresor. De esta manera se integra una intrincada red de interacciones que resulta en una potenciada evasión inmune por parte del tumor. Se muestran los tipos celulares asociados a la inmunosupresión tumoral y su perfil de expresión/producción característica de moléculas, enzimas y citoquinas (TAN, neutrófilo asociado a tumor. TAM, Macrófago asociado a tumor. DC, célula dendrítica. ROS, especies radicales del oxígeno. NOS, especies radicales del nitrógeno. ARG-1 arginasa-1. G-CSF, Factor estimulante de colonias de granulocitos. GM-CSF, Factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos). Adaptado de: Lindau, D. et. al. (2013). The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology*, 138(2), 105–15.[23]

2.2. CÁNCER DE MAMA: EPIDEMIOLOGIA, DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO

El cáncer es una de las mayores causas de muerte en Uruguay siendo responsable de aproximadamente un 25% de las muertes por año [27]. Se calcula que una mujer tiene aproximadamente un 12% de chances de contraer cáncer de mama durante su vida, [28], constituyendo también el tipo de cáncer más frecuente en la población femenina. En Uruguay este cáncer es el de mayor incidencia y el causante de la mayor cantidad de muertes por cáncer en la mujer[27].

El control de la aparición y el seguimiento de la evolución del cáncer mamario se apoyan en una gama de herramientas diagnosticas clínicas y paraclínicas. Los programas de salud en general hacen hincapié en vigilar la aparición de tumoraciones y favorecer los diagnósticos tempranos de la enfermedad [29]. El examen físico en la clínica y la medidas de autoexaminación, así como de mamografías, son las técnicas de diagnostico de elección. Para obtener información complementaria en mamas donde se sospecha la presencia de un tumor y la mamografía no es clara, se emplean preferentemente las técnicas de ultrasonido y de resonancia magnética nuclear[28].

En caso de encontrar una masa tumoral, se puede realizar una biopsia que permita realizar estudios (histológicos y moleculares) de marcadores que permiten clasificar al tipo de tumor, el riesgo asociado y sus posibles tratamientos. Los marcadores más empleados los de receptores de estrógeno y progesterona y el de HER2 (Receptor de factor de crecimiento epidérmico 2). Complementariamente también se está empezando a emplear pruebas moleculares multigénicas que analizan desde unos pocos hasta algunas decenas de genes asociados a la progresión tumoral, invasiva y metastásica así como la resistencia al tratamiento [30].

La información obtenida de los exámenes diagnósticos permite adecuar la terapia al paciente. El tratamiento se determina en base cuan esparcido esta el tumor (si es encapsulado, invasivo local o con metástasis ganglionares y/o en sitios distantes) y a la presencia de los marcadores mencionados anteriormente. Los tratamientos estándar incluyen la

Mastectomía parcial o total, la remoción del ganglio centinela, la quimioterapia, la radioterapia, y terapias específicas que incluyen la hormonal y la dirigida contra HER2. Los receptores hormonales de estrógeno y progesterona aumentados en un tumor indican que el tumor posiblemente responda a la terapia hormonal, que consiste en el bloqueo de los receptores o en la disminución de los niveles de hormonas circulantes. Por otro lado, los niveles elevados de HER2 confieren al tumor de mayor agresividad, sin embargo los vuelven susceptibles a la terapia dirigida, mediante el uso de anticuerpos monoclonales o inhibidores específicos del receptor [31][32]. El anticuerpo Trastuzumab que reconoce el dominio extracelular de HER2, fue aprobado para el tratamiento de cáncer de mama avanzado que expresa dicho receptor (junto con quimioterapia). El efecto de este anticuerpo incluye mecanismos relacionados al bloqueo del receptor, pero al ser un anticuerpo humanizado también puede desencadenar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, convirtiéndolo en un agente inmunoterapéutico [33]. A pesar de los avances en el tratamiento (y diagnóstico), que ha logrado una disminución en la mortalidad de los pacientes, el cáncer de mama sigue presentando desafíos.

La aparición de recurrencias y metástasis así como los efectos tóxicos de los tratamientos representan un problema a resolver. En algunos casos, los pacientes responden inicialmente bien a la terapia, pero las células tumorales se vuelven resistentes, limitando las opciones terapéuticas y complicando el pronóstico del paciente [32]. Nuevas y diversas terapias experimentales están en desarrollo, algunas de las cuales están en fases avanzadas de ensayos clínicos.

2.3. LAS INMUNOTERAPIAS CONTRA EL CÁNCER

2.3.1. Características y su actualidad en la clínica

El concepto de que el sistema inmune es capaz de combatir (o promover) el desarrollo del cáncer no es nuevo, pero los avances sobre el estudio del rol del sistema inmune en el cáncer y las herramientas biotecnológicas a

disposición abren la puerta al desarrollo de novedosas formas de inmunoterapia[34][35][36]. El poder de una cura basada en el sistema inmune podría combinar características muy deseadas en la terapia antitumoral, como lo son: (a) la capacidad de generar respuestas antigénicas específicas (b) la circulación natural de células inmunes por el cuerpo capaces de ejercer su potencial efector en cualquier sitio (c) la posibilidad de desarrollar una cura a largo plazo basada en la memoria inmunológica.

El arsenal de agentes inmunoterapéuticos aprobados para su uso en la clínica oncológica abraza una amplia gama de opciones incluyendo: anticuerpos monoclonales contra antígenos tumorales (algunos radiomarcados), anticuerpos monoclonales con actividad inmunoreguladora, citoquinas, pequeñas moléculas inmunoreguladoras, “inmunotoxinas”, bacterias atenuadas, y terapia basada en células[37]. Una atractiva opción terapéutica que está en estudio en numerosos ensayos clínicos es la terapia génica basada en la expresión de genes inmunoestimuladores (a veces combinada con expresión de antígenos tumorales)[38].

Este conjunto de terapias, aunque prometedoras, se encuentran ante una multitud de obstáculos para poder llevarlas del laboratorio a la clínica. Entre estos se encuentran: la dificultad para relacionar los resultados obtenidos en modelos animales con la respuesta en humanos, la complejidad y la variedad de manifestaciones del cáncer, sus formas de evasión del sistema inmune y la ausencia de indicadores robustos de una respuesta inmune antitumoral eficaz. El propio formato de los ensayos clínicos debe ser adaptado para la correcta evaluación de los agentes inmunoterapéuticos, para una adecuada interpretación de las respuestas a nivel clínico.[37]. Con el grado de desarrollo actual de la medicina personalizada y las técnicas ómicas, la caracterización a nivel genómico e inmunológico del entorno tumoral puede ser la clave en definir los grupos de tratamiento que responden a estos tipos de terapia.

El reciente avance en las inmunoterapias, en especial aquellas para melanoma con Ipilimumab, (Anticuerpo monoclonal contra CTLA-4) y cáncer de próstata con Sipuleucel-T (vacuna a base de células dendríticas

autólogas) anima a los científicos y clínicos a evaluar el efecto de este tipo de terapias sobre otros tipos tumorales, como el cáncer de mama [33].

2.3.2. Inmunoterapias antitumorales basadas en bacterias

En el siglo XIX los médicos alemanes W.Busch y F.Fehlsien reportaron la remisión de tumores en pacientes que habían cursado una infección bacteriana accidental [39]. Busch fue el pionero en inocular con erisipela a un paciente portador de tumor y en apreciar la disminución del tamaño tumoral. Fehleisen siguió los pasos de Busch, repitiendo el experimento e identificando la bacteria responsable de la erisipela, el *Streptococcus pyogenes*. Por otra parte el norteamericano W.B.Coley también incursiono en el tratamiento de pacientes con cáncer usando bacterias vivas, donde se encontró con una “espada de doble filo”, observando regresiones así como muertes a causa de la infección inducida. Con la intención de disminuir los riesgos para el paciente, Coley empezó a usar una mezcla de las bacterias *Streptococcus* y *Serratia marcescens* muertas por calor. Esta mezcla tomo el nombre de “Las toxinas de Coley”, con la que trato cientos de pacientes con relativo éxito, reportando remisiones completas especialmente en sarcomas. En estudios retrospectivos sobre sus resultados, se pudo relacionar positivamente la intensidad de la reacción febril inducida por el tratamiento con la expectativa de vida de los pacientes, argumentando a favor del involucramiento de una reacción inmune como parte fundamental del efecto antitumoral [40]. Los resultados no fueron fácilmente reproducibles por otros científicos, algunos cuestionando la validez de la terapia. Fue entonces que tras la muerte de Coley, incluso después de cientos de pacientes y más de 70 años de reportes sobre los efectos de la terapia basada en la administración de “las toxinas”, la Administración General de Drogas y Alimentos de Estados Unidos clasifico como “Droga Nueva”. De esta manera estas fueron relegadas a usarse solo en ensayos clínicos, para eventualmente desaparecer casi por completo. Posteriormente el advenimiento de las técnicas más estandarizables como la radioterapia y la quimioterapia, así como el uso rutinario de antibióticos y

antiinflamatorios, desplazaron a las inmunoterapias basadas en bacterias compitiendo con ellas y antagonizando sus posibles efectos (por sus efectos secundarios inmunosupresores) [40]. Para ese entonces la esperanza de una cura contra el cáncer de amplio espectro y de bajo costo se desvanecía.

Sin embargo las perspectivas de una cura para el cáncer basada en bacterias, entusiasma a algunos investigadores y clínicos, siendo esta capaz de tener efecto contra una variedad de tumores y representando potencialmente una de las terapias menos costosas. El progreso en el área se continuo a nivel experimental en modelos animales, donde las bacterias anaerobias vivas se demostraron capaces de colonizar tumores sólidos [41]. Los estudios con clostridios (anaerobios obligatorios), asociaron la presencia bacteriana a las zonas necróticas de los tumores. Se observaron regresiones tumorales pero los efectos nocivos asociados a las toxinas podían resultar en enfermedad aguda y muerte del animal. Los clostridios ejercían su efecto especialmente sobre la zona necrótica, sin mayor efecto sobre las zonas periféricas de alta proliferación, dando lugar a remisiones. La administración de la bacteria se combino con radioterapia o quimioterapia, buscando un efecto terapéutico dual complementario sobre células poco accesibles y de baja tasa de proliferación (bacteria en zona hipóxica/necrótica) así como las de mayor tasa de proliferación (Radio/quimioterapia en periferia del tumor). Con el paso del tiempo, varios géneros bacterianos estudiados se mostraron capaces de distribuirse y proliferar específicamente en tumores, incluyendo a *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Salmonella*, *Mycobacterium*, *Lactobacillus* y *Listeria* entre otros [39], [42], [43]. Se cree que estas bacterias deben al menos parte de su efecto a sus capacidades intrínsecas como la movilidad (dispersión), la quimiotaxis (direccionamiento), la vida en anaerobiosis (selectividad) y la producción de toxinas (toxicidad). Ciertas propiedades de los ambientes tumorales son también aprovechadas por las bacterias para ejercer un efecto más selectivo. Dichas bacterias son capaces de llegar a los tumores por la presencia aumentada de vasos sanguíneos, y de permanecer en el ambiente tumoral gracias al nicho de inmunosupresión que normalmente se establece. La presencia de bacterias en dicho ambiente puede provocar inflamación, ya sea por su toxicidad propia o

gracias a la presencia de señales de peligro asociadas a patógenos (PAMPS) que se encuentran en las bacterias, resultando en la estimulación la inmunidad antitumoral)[41]. En la búsqueda de mejorar las bacterias empleadas en terapia antitumoral, se ha buscado reducir su toxicidad inespecífica modificando genes responsables de la patogenicidad. Es así que las bacterias estudiadas y/o usadas hoy en día presentan atenuaciones que alteran la a su metabolismo, su capacidad replicativa o ciertas toxinas. Aprovechando la capacidad de dichas bacterias para biodistribuirse en los tumores, a ciertas cepas se las está ensayando como vectores de genes terapéuticos antitumorales [44][45].

El traslado de los resultados experimentales en animales a la clínica oncológica ha sido de escaso éxito, con solo una aplicación de demostrada eficacia en humanos. El BCG, (*Bacillus Calmette Guerin*) cepa de *Mycobacterium Bovis* usada en la vacuna de tuberculosis, se usa para tratar cáncer de vejiga superficial (previamente sometido a cirugía). Los pacientes que sólo se someten a cirugía tienen cerca de un 70-80% de posibilidad de recurrencia (y 20% de progresión), mientras que si se le suministra BCG tras la cirugía tiene altas chances de generar una respuesta completa, reducir su recurrencia a un ~30% (según el estudio y protocolo terapéutico) y disminuir el riesgo de progresión [46][47]. El mecanismo propuesto es el de una respuesta inmune potente basada en la expresión de citoquinas (TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL8, IL-10, IL-12 e IL-18) inducida por la fagocitosis del bacilo y el reclutamiento de linfocitos CD8, CD4 y NK [47]. Es destacable que el acompañamiento del BCG a la cirugía es el tratamiento preferencial para este tipo de tumores. Los tratamientos incluyen modificaciones en la dosis (con la intención de disminuir la toxicidad) y en el mantenimiento de la inmunoterapia (para mantener y/o potenciar la respuesta) [47]. Ensayos clínicos recientes estudian el efecto combinado del BCG junto a la administración de interferón alfa (IFN- α), donde se aprecia una potenciación del efecto terapéutico [48]. Por otra parte se busca el efecto de terapias combinadas sobre otros tipos de tumores, como lo es la aplicación de la BCG (solo fragmentos de su pared celular) con radioterapia para tratar el cáncer de colon [41]. En Argentina se prepara un ensayo clínico de la “vacuna”

CSF470, basada en una combinación del BCG con células alogénicas irradiadas, sumado a GM-CSF para el tratamiento del melanoma [49].

2.4. *SALMONELLA* TYPHIMURIUM: DEL PATÓGENO AL AGENTE ANTITUMORAL

2.4.1. Características generales

Las bacterias del género *Salmonella* son capaces de infectar reptiles, aves y mamíferos, pudiendo causar infecciones asintomáticas, gastroenteritis o infecciones sistémicas [50]. En humanos se asocian a brotes de infecciones gastrointestinales relacionados con el consumo de comida contaminada. Dos factores mayores afectan el desenlace de una infección por *Salmonella*, el serotipo bacteriano (de los que hay más de mil) y el hospedero (especie, estado inmunológico, flora comensal)[51]. De esta interacción puede surgir una infección intestinal aguda localizada o una infección sistémica llamada “fiebre tifoidea”, que puede terminar en sepsis y muerte [52]. En humanos las bacterias de la especie *Salmonella enterica* pertenecientes al serovar Typhimurium, (comúnmente denominada *Salmonella* Thypimurium (*S.*Typhimurium)) usualmente causan enfermedad gastrointestinal, sin embargo en roedores pueden entrar en el torrente sanguíneo y producir fiebre tifoidea [51].

*S.*Typhimurium es un bacilo Gram-negativo, que posee una membrana externa cubierta de LPS que rodea a la membrana plasmática. Es un anaerobio facultativo, pudiendo vivir en ambientes normóxicos, hipóxicos y anaerobios [53]. La presencia de flagelos y sensores quimiotáticos dota a esta bacteria de movilidad y capacidad de orientación [53]. *S.*Typhimurium cuenta además con estructuras de similar complejidad a la del flagelo (emparentadas evolutivamente con este), que son los SSTIII. Estos funcionan como “microjeringas moleculares” que le permiten a *Salmonella* inyectar proteínas efectoras específicas al interior de una célula eucariota, pudiendo invadirla y mantenerse en el nicho intracelular [54].

Durante la infección de la mucosa intestinal, *Salmonella* puede invadir macrófagos, células epiteliales y otras células, siendo capaz de inducir apoptosis, así como un tipo de muerte celular programada llamada “pyroptosis” [55][56][57]. Esta muerte se induce ante la detección de componentes bacterianos en el entorno intracelular y resulta en una muerte característicamente pro-inflamatoria [58]. Más específicamente, la detección de componentes bacterianos (entre las que se encuentra la flagelina) por parte de ciertos receptores intracelulares citoplasmáticos, los NLRs (Nod Like Receptors) induce el reclutamiento de las proteínas del inflamósoma activando la caspasa-1 [58]. Esta caspasa activada controla el proceso de la pyroptosis, y procesa proteolíticamente a una diversidad de proteínas. Al igual que la apoptosis, la pyroptosis desencadena la activación de nucleasas que degradan los ácidos nucleicos, aunque en el caso de la pyroptosis el núcleo se condensa pero no se desintegra [59]. El procesamiento proteolítico inducido por la caspasa-1 tiene entre sus sustratos a las pro-IL1- β y pro-IL18, y provocando la liberación de sus formas maduras a través de poros en la membrana (también inducidos como parte del proceso)[60]. La formación de poros en la membrana celular, lleva a un flujo de iones y agua que hincha la célula y termina en la ruptura y diseminación del contenido intracelular (promoviendo la inflamación), contrastando con el modo ordenado de descomposición en vesículas cerradas que es característico de la apoptosis [60]. Este proceso induce una respuesta inflamatoria, que comprende el volcado del contenido intracelular, sumado a acción de la IL-1 β reclutando linfocitos e induciendo la expresión de otras citoquinas e IL-18 estimulando la producción de IFN- γ , la activación de linfocitos T y macrófagos. Este tipo de respuesta es fisiológicamente relevante para el hospedero, de modo de poder montar una respuesta inmune efectiva contra la bacteria, tal es así que ratones deficientes en caspasa-1 presentan susceptibilidad aumentada ante las infecciones con *S.Typhimurium* [52]. Cabe destacar que la presencia de diversos PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos, incluyendo LPS, flagelina, peptidoglicano, formilmetionina, etc) presentes en *Salmonella* pueden ser detectados por otros receptores como los TLR (*Toll Like Receptors*) y otros NLRs, induciendo otras vías de

inflamación que repercuten en el tipo de respuesta inmune contra esta bacteria [58].

2.4.2. Potencial antitumoral

Los tumores, al establecerse, van desarrollando barreras que pueden limitar la efectividad de los tratamientos, como lo son: la inmunosupresión, la hipoxia, el pH ácido, la vasculatura desorganizada, así como la diseminación y metástasis. Las características de *Salmonella* como agente terapéutico (representados esquemáticamente en la Figura 3), en cuanto a su biodistribución, efectos inmunoestimuladores, así como por su toxicidad directa, son ideales para hacer frente a estos desafíos y varias cepas atenuadas están siendo estudiadas y modificadas con fines antitumorales [61][62][63][44].

A mediados de los años noventa, se realizaron trabajos con cepas atenuadas de *Salmonella* capaces de colonizar tumores, y de ejercer un efecto antitumoral [64]. Tras la administración sistémica de estas bacterias, las tasas de acumulación tumoral eran de aproximadamente 1000 a 1 respecto a otros sitios de alta irrigación como el hígado, bazo y pulmón [64][65][66]. Las razones de la biodistribución preferencial por los tumores de estas cepas han implicado diversos factores, algunos intrínsecos a la bacteria (vida en anaerobiosis, quimiotaxis y movilidad) y otros relacionados con la propia biología tumoral (arquitectura vascular de los tumores, sistema inmune deprimido, limpieza diferencial) [67][53][68][69]. *Salmonella* no sólo es capaz de colonizar tumores primarios, sino que también puede alcanzar a los distantes sitios metastásicos, inclusive metástasis de tamaño microscópico, abriendo las puertas para las terapias sistémicas antitumorales [53][70].

Esta capacidad de colonizar con alto grado de especificidad los entornos tumorales, sumado a la relativa facilidad de manipulación genética de esta bacteria, llevó al uso de *S.Typhimurium* como vector de agentes antitumorales [44][61][45]. Las aplicaciones varían desde la expresión de: antígenos tumorales; citoquinas inmunoestimuladoras; proteínas

inductoras de muerte celular; enzimas convertidoras de pro-drogas; y genes reporteros [44][61][45]. Numerosas cepas atenuadas de *S.Typhimurium* han sido empleadas en terapia antitumoral. Las distinciones entre cepas se basan en su origen, y también en las atenuaciones que portan, que habitualmente son en genes de vías metabólicas (que limitan el potencial replicativo) o en genes relacionados con la toxicidad inespecífica. Las cepas A1 y A1-R (autotróficas para los aminoácidos leucina y arginina) inicialmente mostraron potencial *in vitro* en líneas celulares tumorales humanas [71]. Cuando se emplearon estas bacterias como monoterapia, en tumores de origen humano trasplantados en ratones *nude*, se reportaron remisiones tumorales totales (sin ser tóxicos para el ratón)[72]. Posteriormente la cepa A1-R fue utilizada en modelos murinos de tumores singénicos en cepas inmunocompetentes, donde se registraron efectos antitumorales y antimetastásicos, que resultaron en extensiones de la sobrevivencia de los animales[72][73].

Una de las cepas atenuadas más estudiadas hasta el momento es la VNP20009 que lleva una delección en el gen *purl* (requerido en la síntesis de purinas) y en el gen *msbB* (dando lugar a un LPS truncado, disminuyendo el riesgo del shock séptico) [65]. Esta bacteria demostró acumularse en tumores y ser menos tóxica, y se la relaciono *in vitro* con la inducción de muerte de la célula tumoral infectada [66][65][74]. Su éxito como agente antitumoral en modelos experimentales de melanoma llevó a la conducción de ensayos clínicos [75][76]. Los resultados en humanos con melanoma metastásico distaron de la eficacia que se reportó para los modelos murinos, sin embargo se demostró que esta bacteria era tolerada adecuadamente por seres humanos y que era capaz de llegar a los tumores[76]. El plan más reciente del uso de *S.Typhimurium* atenuadas como terapia antitumoral en humanos llega de parte de otro grupo de investigación desde el *Masonic Cancer Center, University of Minnesota*, empleando la cepa χ 4550 portadora de un plásmido para la expresión de IL-2, pero aun está en fase de reclutamiento [77].

En un trabajo enfocado en las propiedades intrínsecas de *S.Typhimurium* como agente inmunoterapéutico, se postulo un nuevo mecanismo que llevaba a la muerte de las células tumorales infectadas [78]. La infección

de células tumorales por parte de *Salmonella*, dotaba antigénicamente a dichas células con epítopes T de la propia bacteria, lo cual permitía a la célula tumoral ser reconocida por linfocitos T específicos contra *Salmonella* como si fuera una célula infectada[78]. En este estudio también se reportó un aumento de la respuesta inmune contra antígenos tumorales y una mejora en la supervivencia de los animales tratados. En otra publicación relacionada se ahonda sobre los mecanismos responsables de la inmunoterapia basada en *S.Typhimurium*. La infección por *Salmonella* induce la expresión de uniones comunicantes o GAP que promueven la presentación cruzada de antígenos tumorales en células dendríticas, resultando en respuestas citotóxicas antitumorales responsables de la eliminación de lesiones metastásicas [79].

En el Laboratorio de Vacunas Recombinantes del Instituto de Higiene, se han conducido estudios sobre las propiedades antitumorales de cepas atenuadas de *S.Typhimurium*, con especial énfasis en su potencial como agentes de inmunoterapia en modelos de melanoma y linfoma [80][81]. En el modelo de melanoma se mostró la capacidad de la cepa de *S.Typhimurium* SL3261 (atenuación en *aroA*, auxotrófica para aminoácidos aromáticos) para colonizar y replicar en los tumores, generando un retraso en el crecimiento tumoral [80]. El efecto de la *Salmonella* SL3261 portadora de plásmidos codificantes de IL-4 o IL-18 resultó en un aumento de la supervivencia de los animales, una reducción en el volumen tumoral y un aumento de la respuesta inmune [80].

En el modelo de linfoma murino con células A20, los experimentos *in vitro* mostraron un aumento de moléculas co-estimuladoras en las propias A20 tras la infección con la cepa LVR01 (atenuación en *aroC*, auxotrófica para aminoácidos aromáticos). Los experimentos *in vivo* con ratones portadores de linfomas se correspondieron con una mayor supervivencia del grupo tratado con LVR01. Esta respuesta se reflejó en un aumento de células inmunes infiltrantes al tumor (células T citotóxicas y neutrófilos principalmente) y una mayor expresión de citoquinas como el IFN- γ . En este mismo estudio se ensayó la terapia combinada usando *Salmonella* y depósitos de IL-2, que resultó en una mayor activación del sistema inmune así como un mejor efecto terapéutico [81].

El cuerpo de publicaciones creciente postula a *S. Typhimurium* como un agente prometedor en las terapias antitumorales, versátil tanto en su manipulación para diversas aplicaciones, como por su amplio tropismo por diferentes tipos de tumores.

Figura 3. Posibles mecanismos antitumorales inducidos por *S.Typhimurium*. El diagrama muestra las rutas principales de acción antitumoral de *Salmonella*, sus posibles interacciones y bucles de retroalimentación. Se establecen los vínculos entre la toxicidad directa y aquella asociada al sistema inmune. (A) Competencia por nutrientes en el entorno tumoral (y posible acción de toxinas), pudiendo enlentecer el crecimiento o incluso inducir muerte de las células tumorales.(B) Detección directa de PAMPs bacterianos por células del sistema inmune, que desencadena la liberación de citoquinas, resultando en un reclutamiento de leucocitos capaces de iniciar respuestas efectoras antitumorales. (C) (I) La capacidad invasiva de *Salmonella* puede inducir respuestas de estrés celular, interpretadas como señales de daño detectables por el sistema inmune. (II) Por otro lado, este mismo proceso puede dar lugar al traspaso de determinantes antigénicos desde la *Salmonella* hacia la célula invadida, pudiendo ser reconocida como una célula infectada y extraña. La inducción de uniones gap en la célula invadida también pueden favorecer la presentación de antígenos tumorales a células presentadoras de antígeno. Estos dos procesos pueden desembocar en la eliminación antígeno dependiente de células tumorales. (III) *Salmonella* puede inducir la muerte celular de la célula infectada, induciendo apoptosis o pyroptosis. De estas maneras se pueden liberar antígenos tumorales, así como nuevas bacterias que pueden volver a infectar otras células. En el proceso de la pyroptosis se liberan citoquinas pro-inflamatorias que pueden desencadenar el reclutamiento y activación de células inmunes.(D) Varios mecanismos influyen en, o convergen al reconocimiento de antígenos tumorales y la activación de respuestas con actividad citotóxica antígeno dependiente, y antígeno independiente.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que en la clínica los tumores de mama habitualmente son sometidos a cirugía, que las metástasis presentan el mayor reto terapéutico y que cepas atenuadas de *Salmonella Typhimurium* son capaces de distribuirse y replicar en entornos tumorales (primarios y metastásicos) e iniciar respuestas inmunes antitumorales, proponemos que la administración de estas bacterias en neo-adjuvancia (previo a la remoción quirúrgica del tumor) podría generar una respuesta antitumoral que pueda extenderse hacia los sitios de metástasis (una vez removido el tumor), mejorando la sobrevida contra la enfermedad metastásica.

3.1.OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la capacidad invasiva y replicativa de cepas atenuadas de *S. Typhimurium* en líneas celulares y evaluar su potencial antitumoral en un modelo de cáncer mamario metastásico.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1- Caracterizar la capacidad invasiva y replicativa *in vitro* de las cepas atenuadas de *Salmonella* Typhimurium SL3261 y LVR01 disponibles en el laboratorio.
- 2- Reproducir un modelo murino de cáncer mamario metastásico basado en la implantación ortotópica de células tumorales en ratones inmunocompetentes.
- 3- Estudiar la distribución de las bacterias atenuadas administradas en ratones portadores de tumores y *a nivel histológico* en los tumores.
- 4- Evaluar el efecto terapéutico de la administración local y sistémica de *Salmonella* en ratones con tumores y enfermedad metastásica.
- 5- Caracterizar la respuesta inmune inducida por la administración de las bacterias a nivel celular y humoral.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. CEPAS ATENUADAS DE *SALMONELLA* Y LÍNEAS CELULARES EUCARIOTAS USADAS EN EL ESTUDIO.

Las cepas atenuadas de *Salmonella* Typhimurium empleadas en este estudio portan mutaciones en las vías de metabolismo de aminoácidos aromáticos. La LVR01 y la SL3261 llevan deleciones en los genes *aroC* y *aroA*, respectivamente. Se contó a su vez con las variantes LVR01GFP y SL3361GFP que expresaban constitutivamente la proteína fluorescente verde (GFP) desde el transgén insertado en el cromosoma bacteriano. Estas variantes ya habían sido desarrolladas en el marco de un trabajo anterior, y fueron cedidas amablemente por L.Yim y L.Veiga del Laboratorio de Vacunas Recombinantes del Instituto de Higiene. Para preparar los stocks de trabajo que se usaron para todos los ensayos, se picaron los stocks primarios para hacer cultivos ON en LB, entonces las cepas fueron re-cultivadas desde estos cultivos hasta una DO de 1,5 y se congelaron en glicerol 17% a -80 grados. Las bacterias portadoras del gen GFP también poseen un gen de resistencia al Cloranfenicol y fueron cultivadas en presencia de 17µg/ml del antibiótico en todas las fases de crecimiento.

Las líneas celulares eucariotas usadas en este trabajo fueron la 4T1 (tumor mamario murino, cepa BALB/c), NMU (tumor mamario de rata, cepa Sprague-Dawley), MCF7 (tumor mamario humano) y la J774A.1 (macrófagos/monocitos murinos, cepa BALB/c). Todas las líneas fueron cultivadas en DMEM “High Glucose” con glutamina estable (PAA®) y 10% SFB (PAA®), y mantenidas a 37°C en una estufa humidificada, con una presión de CO₂ del 5%. Todas las líneas fueron obtenidas de ATCC® (Excepto la NMU que fue amablemente cedida por Teresa Freire de la cátedra de Inmunobiología de Facultad de Medicina) y son libres de mycoplasma (según técnica de microscopia con DAPI).

4.2. ENSAYOS DE INVASIÓN/REPLICACIÓN BACTERIANA MEDIANTE PROTECCIÓN CONTRA GENTAMICINA

Se cultivaron las células eucariotas en placas de 24w, a una densidad de un millón de células por pocillo, en un volumen total de 0,5ml y se dejaron reposar durante 4 hs o más hasta completar la adherencia. Se agregó STAs en una relación de 10 bacterias por célula eucariota completando el volumen del ensayo a 1ml. Se realizó una centrifugación a 400g durante 5 min a temperatura ambiente *y se incubó la placa a 37°C en la estufa de CO₂* durante una hora para permitir la invasión. A continuación se realizó una centrifugación seguida de un suave lavado con PBS. Inmediatamente después de esto, se incubó con 1ml de DEMEM 10% SFB con 100µg/ml del antibiótico Gentamicina (incapaz de atravesar membrana plasmática eucariota), con el fin de eliminar las bacterias extracelulares. Este periodo fue usualmente de 1, 24 o 48 hs. Este ensayo principal fue revelado de maneras alternativas y complementarias en información como se visualiza en la figura 4 y se detalla a continuación.

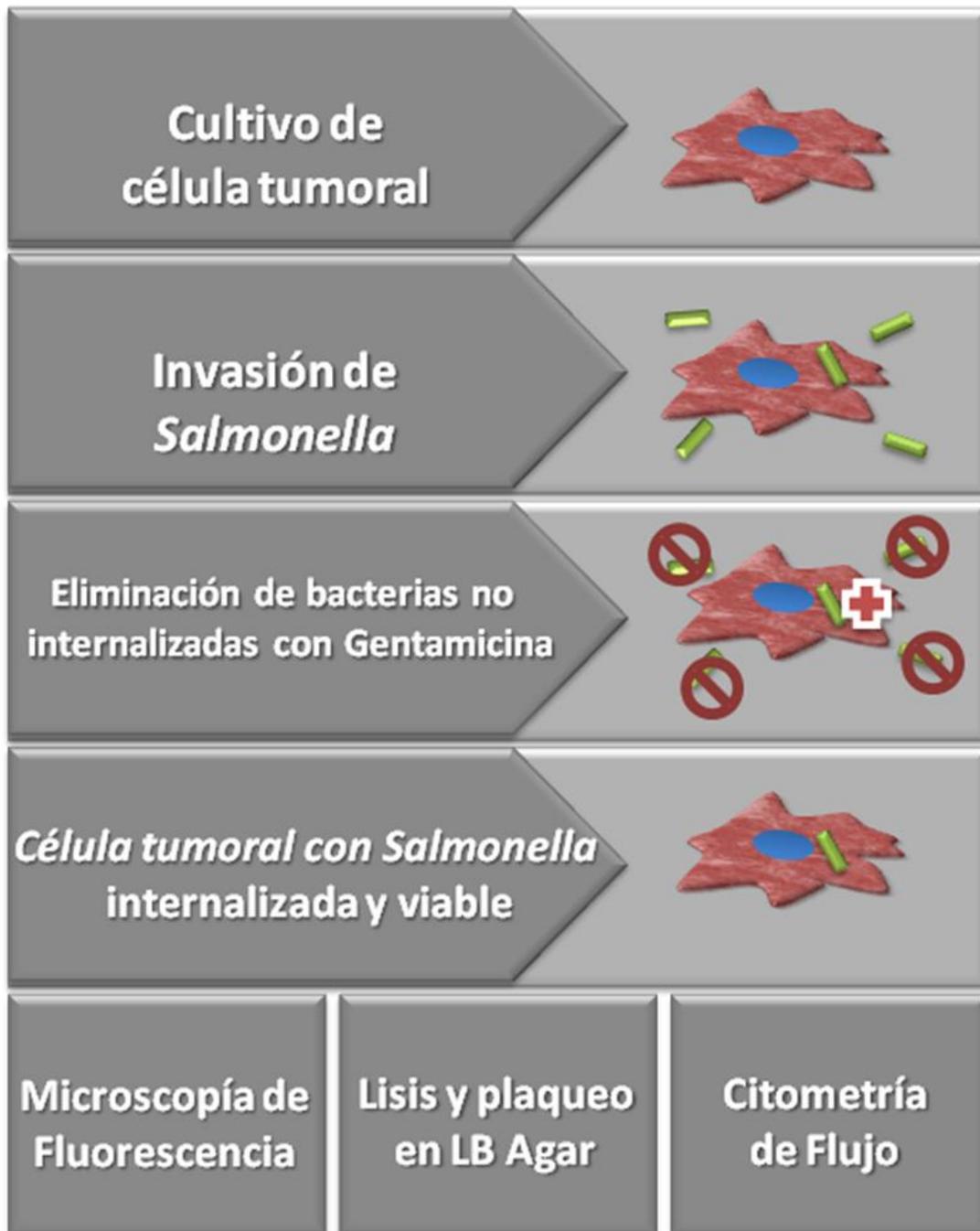


Figura 4. El ensayo de invasión como base experimental para el estudio de la interacción *Salmonella*-Célula Tumoral In Vitro. Células tumorales en cultivo son invadidas por STAs, durante un periodo de incubación de una hora. Este se sigue de la eliminación de las bacterias no internalizadas por la acción de la gentamicina. Después del tiempo necesario de incubación, el cultivo celular presenta células invadidas por bacterias que pueden ser estudiadas mediante: Lisis y Plaqueo, Citometría de Flujo o Microscopia de Fluorescencia.

4.2.1 Determinación de bacterias intracelulares por lisis y plaqueo.

Tras el periodo de incubación con gentamicina, se continuó con centrifugaciones alternadas con suaves lavados con PBS para la remoción de la gentamicina así como del exceso de bacterias no-internalizadas. Para la liberación de las bacterias internalizadas, se incubó 5 min con Tritón 100-X 0.1% en H₂O permitiendo la lisis de las células eucariotas. La suspensión de bacterias generada se plaqueó en gotas de 20µl en LB agar y se incubó ON en una estufa a 37°C. Los conteos de colonias provenientes de la placa permiten estimar el número medio de bacterias intracelulares al tiempo ensayado, y se reporta como un porcentaje relativo al inóculo inicial de bacterias (% de recuperación). Se realizaron para cada condición, dos replicas biológicas plaquedas para 3 o 4 diluciones distintas. Todos experimentos se realizaron por duplicado en ocasiones distintas.

4.2.2 Análisis por citometría de flujo de la invasión/replicación bacteriana

Para revelar el proceso de invasión/replicación por citometría de flujo de las variantes de STAs que expresan GFP, las monocapas que habían sido incubadas con gentamicina, fueron centrifugadas/lavadas 3 veces y cosechadas con tripsina durante 5 min. A la suspensión celular obtenida se le agregó DMEM 10% SFB y fue centrifugada para obtener un pellet celular que se resuspendió en PFA 4% en PBS para la fijación y esterilización de la muestra. Tras 20 min de fijación a temperatura ambiente, se realizaron dos ciclos de centrifugación/lavado en PBS y una centrifugación final con resuspensión en el volumen de PBS final para evaluar el nivel de fluorescencia GFP en el citómetro de flujo FACS CANTO II (BD). Se reportaron los valores de porcentaje de células infectadas y de intensidad media de fluorescencia de las células infectadas. Se analizaron 10000 eventos por condición, con muestras biológicas por duplicado. Se muestran dos experimentos representativos realizados en distintas fechas.

4.2.3. Visualización por microscopia de epifluorescencia del proceso de invasión/replicación de especímenes fijados

Las monocapas infectadas con STAs que expresan GFP, con una progresión de 2hs (1de invasión + 1 de gentamicina), 24hs y 48hs fueron fijadas con PFA 4% durante 20 min. Una vez concluida la fijación, se hicieron 3 lavados suaves de 3 min con PBS. A continuación se agrego DAPI (Invitrogen) a una concentración de 300nM en PBS, el cual fue incubado durante 5 min. Después de esta tinción, se retiro la solución de DAPI y se realizaron 3 lavados suaves con PBS. Se siguió con la observación inmediata de los preparados al microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon® Ti-S), registrando contraste de fases (escala de grises), fluorescencia verde (GFP) y fluorescencia azul (DAPI). Se realizaron composiciones graficas que mezclan los dos canales de fluorescencia con la imagen obtenida de contraste de fases.

4.2.4. Determinación de la integridad y viabilidad celular en monocapas infectadas “vivas”

A las 24hs de infección con LVR01GFP, las monocapas fueron examinadas al microscopio intactas (sin fijar ni lavar) al microscopio, y después se procedió con la incubación con Ioduro de Propidio durante 5 min (Sigma, concentración final 500nM). Las muestras fueron llevadas inmediatamente al microscopio y fotografiadas en contraste de fases, fluorescencia roja (Ioduro de Propidio) y fluorescencia verde (GFP).

A las 12-16 hs se realizo captura de video de las células infectadas con LVR01GFP, con la intención de capturar el movimiento intracelular de las bacterias en ese estado de progresión de la infección. En este experimento también se llevo a cabo una tinción vital con Ioduro de propidio para excluir la movilidad de bacterias dentro de células muertas.

4.2.5. Localización subcelular y análisis de la progresión del fenómeno de invasión/replicación por microscopia de fluorescencia confocal.

Para obtener una mejor calidad óptica que permitiese el análisis de localización subcelular de la LVR01GFP por microscopia confocal, en vez de realizar el ensayo sobre material plástico, este se realizo sobre cubres limpios y estériles que fueron colocados dentro de placas de 6w por la

duración del ensayo. Se crecieron las células a la mitad de la densidad (para obtener una imagen más clara), pero a igual multiplicidad de infección. A las 2, 12, 24 y 48hs se obtuvieron las muestras, que fueron sometidas a un proceso de suaves lavados, seguidos de fijación en PFA4% y una tinción con Faloidina conjugada a Alexa-555 (Invitrogen, 5 unidades/ml, 15min) mas DAPI (5min). El citoesqueleto de F-actina es más denso en la zona que subyace a la membrana plasmática, por ende la tinción del citoesqueleto de F-actina con faloidina fluorescente, permitió marcar los límites celulares y la visualización por microscopia confocal del los preparados teñidos de esta manera es un método valido para la confirmar el carácter intracelular de la infección por LVR01GFP. Para este estudio se uso el microscopio confocal espectral modelo LEICA® TCS SP5 II, y para la adquisición y análisis de imágenes se contó con el software Leica® LAS AF (Para la composición de imágenes tridimensionales se empleo el software de procesado 3D IMARIS). Se analizaron 8 campos al azar por tiempo ensayado (40-80 células por campo), en búsqueda de células infectadas con bacterias intracelulares. Se calculo la mediana del porcentaje de células infectadas en función del tiempo. Sumado a esto, se dividieron los estadios de infección para cada célula infectada en categorías según el numero de bacterias intracelulares que presentaban (1-3, 4-10, 11-20, etc). Con estas categorías se realizo el cálculo para cada tiempo, de la mediana de bacterias por célula infectada (se tomaron los valores menores dentro de cada categoría para cada célula), para cada campo examinado.

4.3. MODELO MURINO DE CÁNCER DE MAMA METASTÁSICO 4T1

Siguiendo el protocolo descrito en [82], hembras BALB/c de aproximadamente 8 semanas de edad fueron anestesiadas con Ketamina/Xilacina e inyectadas intramamariamente (en la 4ta almohadilla de grasa mamaria del lado derecho, a través del pezón) con una suspensión de 70000 células 4T1 (en 50ul de DMEM). Se realizo el seguimiento de los ratones y se monitoreo el crecimiento tumoral midiendo dos ejes ortogonales con un calibre de mano y se calculo el volumen tumoral con la formula de la elipsoide: $(\text{eje mayor}) \times (\text{eje menor})^2 \times \frac{1}{2}$. Los animales alcanzando dimensiones tumorales de 20mm en algún

eje o presentando signos de malestar severo fueron sacrificados. Con los tiempos de muerte se construyeron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y se estableció la diferencia entre las curvas por el método log-Rank.

En algunos casos se realizaron cirugías para la remoción del tumor primario (y ganglio drenante, inguinal), las cuales fueron ejecutadas con el animal anestesiado y termostatizado. Para mejorar la recuperación post operatoria, se les añadió paracetamol al agua de beber (0,5mg/ml) durante 24hs.

La presencia de metastasis se corrobora mediante ensayos de sobrevida y autopsias de los animales inoculados con 4T1, a los que se les realizo cirugias a distintos tiempos entre los 10 y los 15 días.

4.4. ESTUDIOS DE BIODISTRIBUCIÓN DE LVR01 EN RATONES EN EL MODELO ANIMAL 4T1

4.4.1. Biodistribución de LVR01 en ratones portadores de tumores

Se inyectó LVR01GFP (2×10^7 CFU en 50 μ L) por vía Intratumoral (IT), intraperitoneal (IP) e Intravenosa (IV) a ratones portadores de tumores 4T1 de 10 días de evolución. A los días 2, 5 y 14 post inoculación bacteriana, se sacrificaron 3 animales por grupo y se obtuvieron los tumores primarios, bazo, hígados y pulmones. Estas muestras fueron recogidas de forma aséptica y se colocaron en una bolsa estéril que permitía su disgregación mecánica. A las muestras pesadas y disgregadas, se les añadió un volumen de H₂O con la intención de producir una lisis osmótica de las células eucariotas y liberar las bacterias que puedan haber quedado en el interior celular. Se procedió a un segundo paso de disgregación mecánica y se plaquearon distintas diluciones de los homogenizados en agar incorporado. El conteo absoluto de CFUs se relaciono con cada dilución, día y órgano y se relativizaron al peso de la muestra, dando lugar a valores de densidad bacteriana en CFUs/gramo de tejido. Se muestran los resultados de dos experimentos equivalentes separados en el tiempo.

4.4.2. Biodistribución en ratones con enfermedad metastásica residual sin tumor primario

Ratones BALB/c con tumores 4T1 de 10 días de evolución, recibieron una inyección IT de 2×10^7 CFU de LVR0GFP, a los 15 días de crecimiento tumoral, se les realizó una cirugía para remover el tumor primario y llegado el día 19 se le administró por las vías sistémicas (IV o IP) 2×10^7 CFU en 50 μ L de LVR01GFP. Se sacrificaron 3 ratones por grupo para los días 2, 5 y 14 post inoculación bacteriana (la última). Se realizaron los plaques del contenido bacteriano de cada tejido como se describe arriba. En este caso fue un solo experimento con 3 ratones por día por condición.

4.4.3 Distribución histológica por microscopia de fluorescencia

Para poder observar la distribución que adoptan las bacterias dentro de los tumores, se congelaron tumores enteros embebidos en OCT y se sumergieron en N₂ líquido, seguido de un almacenamiento a -80 °C. Estos bloques congelados se cortaron al espesor de 5 μ m en el criostato, y fueron fijados con PFA 4%, permeabilizados con Tween 20 durante 15 min a 37°C, bloqueados con BSA 1% durante 30 min y teñidos para detectar la presencia de la LVR01 y estructuras celulares (con series de 3 lavados con PBS entre cada paso). La fluorescencia de la LVR01GFP no fue suficiente para separarla de la autofluorescencia del tejido. Para visualizar a la bacteria se empleó una tinción indirecta utilizando un anticuerpo contra el LPS de *Salmonella Typhimurium* (*Salmonella O antiserum poly A* Conejo, BD) y un conjugado fluorescente contra este anticuerpo (de Cabra contra conejo, conjugado a Alexa-555, Invitrogen). Para visualizar las membranas celulares, se utilizó tinción con WGAs (Invitrogen, Molecular Probes®) conjugadas a fluoróforos (en variedades Oregon Green 488, Alexa®488 y Alexa®350), estas lectinas son proteínas de unión a carbohidratos presentes en las membranas celulares eucariotas. En un tercer canal se seleccionó el DAPI como contratinción para ver los núcleos o anticuerpos contra GR1 que es un marcador de neutrófilos/MDSC. En algunos casos se empleó una LVR01 que era capaz de expresar la proteína fluorescente DsRed.

Para llevar a cabo las tinciones, todas las incubaciones con anticuerpos fueron de 45 min, las incubaciones con lectinas de 15 min, y la tinción con DAPI de 10 min.

4.5. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE LVR01 EN EL MODELO 4T1.

A ratones BALB/c de aproximadamente 8 semanas de edad, se le inyectaron las células 4T1 en la 4ta mama derecha. Se separan los ratones en grupos de tratamiento que reciben una combinación de inyecciones IT o IV de LVR01 y/o cirugía. Se realizaron mediciones del volumen tumoral en los animales portadores de tumores, y el seguimiento del estado del animal para realizar curvas de supervivencia como se menciona más arriba. Los resultados corresponden a grupos experimentales compuestos de 8 ratones.

4.6. EVALUACIÓN DE RESPUESTAS INMUNES INDUCIDAS POR LVR01

4.6.1. Leucocitos presentes en tumor y ganglio drenante

Ratones BALB/c portadores de tumores 4T1 se trataron intratumoralmente con LVR01 o PBS y fueron sometidos a cirugía, para la remoción de su tumor primario y ganglio drenante. Estos tejidos se preservaron en medio de cultivo estéril en placas de 24w, dentro de un contenedor lleno de hielo. Los tumores fueron cortados en pequeños pedazos de 1-2mm con tijeras y disgregados mecánicamente usando *cell strainers* de 70µm (BD). Los ganglios fueron presionados entre dos portas y su contenido filtrado en *cell strainers* de 70nm. La densidad celular de las suspensiones se conoció usando un contador automático de células (Countess® Automated Cell Counter, Invitrogen) sembrando 10^6 células por tinción, en una placa de 96w de fondo cónico. Se realizaron tinciones utilizando dos combinaciones de anticuerpos conjugados fluorescentes, una para células linfoides (CD45-PE, CD49b-FITC, CD19-APC, CD8-PerCp.Cy7, CD3-PerCPCy5, CD4-APC.Cy7) y otro para células mieloides (CD45-PE, F4/80-FITC, CD11c-APC, CD11b-PerCPCy5.5, Ly6-G-APC-Cy7). Todos los anticuerpos usados fueron comprados a BD. Las muestras teñidas fueron fijadas en PFA 2%, lavadas y se adquirieron

inmediatamente u O/N. Se adquirieron las muestras usando el citómetro de flujo FACS CANTO II, que permite hacer detección simultánea de 6 canales de fluorescencia. Se excluyeron los dobletes y el *debris* celular del análisis por medio de *gating* y se colectaron 100000 eventos por muestra. Se realizaron tinciones simples para ajustar los niveles de intensidad de los láseres y la compensación. Los resultados muestran dos experimentos independientes compuestos por 4 muestras para el caso de los tumores, y de 6 muestras de (4 ratones simples y 2 *pools* de 2 ratones) para las muestras de ganglio.

4.6.2. Citoquinas circulantes en sangre

Ratones BALB/c con 13 días de progresión tumoral recibieron LVR01 IT y fueron intervenidos quirúrgicamente al día 16. Este grupo así como su control sin bacteria fueron sangrados por punción submandibular (100-200µl de sangre) a los 10, 14, y 25 días de evolución tumoral. Se realizó la obtención de suero por coagulación 2 hs a temperatura ambiente o 30 min a 37°C, seguida de una incubación en hielo de 30 min y una posterior centrifugación a 14000 RPM en una centrifuga de mesada refrigerada a 4°C. Se aspiró por pipeteo el suero y se procedió a un segundo paso de centrifugación para eliminar cualquier rastro de coágulos. Los sueros fueron conservados a -80 y mantenidos en hielo fuera del congelador durante la manipulación. Se empleó un kit de ELISA de captura de IFN-γ murino (BD), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras ensayadas fueron 4 sueros por grupo por día.

4.6.3. Respuesta serológica contra células tumorales

Para evaluar una posible respuesta por anticuerpos capaz de unirse a antígenos tumorales, se enfrentaron los sueros de los animales tratados a extractos de células tumorales 4T1. Brevemente, se sensibilizaron las placas con un sonicado de células 4T1 filtradas diluido en PBS (50ul de una 0.75µg/ml) incubándolas ON a 4°C. Se aplicaron una serie de 3 lavados con PBS Tween 0,05% de 2 min cada uno, seguidos de un bloqueo con PBS BSA 1% 1h a 37°C. Una vez concluido el bloqueo, se realizaron 3 lavados en PBS Tween 0,05%. Posteriormente se realizaron diluciones de los

sueros de los ratones tratados en PBS Tween 0,05% BSA 1% y se los incubo ON a 4°C. Al culminar la incubación con los sueros, se hicieron otros 3 lavados con PBS Tween 0,05% y se incubo con un anticuerpo a-IgG de ratón conjugado a biotina (Southen Biotech) durante una hora

4.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis fueron efectuados usando hojas de cálculo de Excel en conjunción con representación grafica y análisis estadístico en el software GraphPad 5.0. Se utilizo test de *Student* para comparar una variable entre dos grupos de pequeño tamaño muestral. Se empleo *one way* ANOVA para comparaciones de una variable entre varias muestras, y el post test de Bonferonni para comparar entre muestras individuales dentro de la comparación multiple. El test de *two way* ANOVA se empleo al analizar distintos grupos de datos en los que se analizaron dos variables simultáneamente, este se acoplo al post test de Bonferonni para comparaciones puntuales dentro de la comparación multiple. Para analizar datos de sobrevivida, se crearon curvas de Kaplan Maier que fueron sometidas al análisis de Log-Rank. Para rechazar la hipótesis nula de los test empleados, se utilizo el umbral de un p valor menor a 0.05. Cuando se observaron diferencias que no fueron significativas, pero que marcaban una distinción entre grupos ($0,05 < p \text{ valor} < 0,12$), se utilizo el termino de tendencia.

5. RESULTADOS

5.1 ESTUDIOS *IN VITRO* DE LA CAPACIDAD INVASIVA Y REPLICATIVA DE *SALMONELLA THYPHIMURIUM* ATENUADAS EN CÉLULAS TUMORALES DE CÁNCER MAMARIO.

Para comparar la capacidad de las cepas de *Salmonella* atenuadas LVR01 y SL3261 para ingresar en células tumorales de cáncer de mama, se realizaron ensayos de invasión *in vitro* según de detalla en la sección 4.2 de materiales y métodos. En una primera instancia se compararon las variantes de LVR01 y SL3261 sin modificar, respecto a las que expresaban GFP en su capacidad para invadir a células de tumor mamario 4T1 (Figura 5.A), con la intención de ver si el transgén afectaba o no a la invasividad. Las diferencias no fueron significativas entre las variantes parentales y sus respectivas variantes GFP+ tanto para LVR01 como para SL3261. Esta similitud permitió el uso de las variantes GFP+ en sustitución de las parentales para los experimentos *in vitro*. Por otra parte las cepas LVR01 y LVR01GFP fueron superiores en su invasividad a las cepas SL3261 y SL3261GFP. A continuación, se evaluó el potencial invasivo de LVR01GFP y SL3261GFP sobre un panel más amplio de líneas celulares, incluyendo las líneas de tumor mamario NMU (rata), y MCF7 (humano) así como la línea de macrófago/monocito murina J774A.1. Como se muestra en la figura 5.B, a las 2 hs post infección, la recuperación de CFUs de LVR01 GFP rondaba el 8% del inóculo inicial, para todas las líneas celulares ensayadas. Las diferencias entre LVR01GFP y SL3261GFP para las líneas 4T1 y NMU fueron estadísticamente significativas. La línea MCF7 fue invadida por LVR01GFP a niveles similares con los obtenidos en las otras líneas mamarias, rondando el 8%. Por otra parte la STA SL3261GFP solo mostro una invasividad comparable estadísticamente a LVR01GFP en célula fagocítica J774A.1, mientras que en las líneas celulares mamarias solo mostro una recuperación de alrededor de un 2%. Ambas STAs fueron capaces de invadir líneas tumorales mamarias y líneas fagocíticas. En base a la invasividad superior de LVR01GFP sobre las líneas mamarias, esta se estudió más profundamente en los aspectos de su cinética de invasión y replicación.

5.1.2. Cinética de recuperación de CFUs de LVR01 en ensayo de invasión/replicación

Para evaluar la progresión de los cultivos infectados con LVR01GFP, se infectaron monocapas de células 4T1, NMU, MCF7 y J774A.1 y se recuperaron las bacterias intracelulares por lisis a distintos tiempos, siendo estos a las 2, 24 y 48hs post infección. En ensayos preliminares, se encontró que la gentamicina a 100ug/ml fue la mínima concentración que mantuvo el medio de cultivo libre de bacterias viables durante la duración del ensayo (48hs), asegurando que los eventos de invasión se limitaran a la incubación inicial. El patrón de recuperación de CFUs que describe la figura 5.C, fue similar para las líneas 4T1 y NMU. A las 2hs el valor fue de un 8% aproximado. A las 24hs, se observó cierta variación con una tendencia hacia valores menores. Ya para las 48hs post infección, la recuperación estaba en su punto más bajo, alcanzando valores tan bajos como un 1%. En la línea MCF7 se aprecia un aumento del porcentaje inicial de 8% aproximado a cerca de un 15% a las 24hs, seguido de una caída a las 48hs. En la línea J774A.1 el valor inicial de alrededor de un 5%, bajo drásticamente a niveles casi indetectables a las 24 y 48hs. En todas las líneas celulares los niveles de recuperación de bacterias viables disminuyen al cabo de 24 o 48hs. Al observar variaciones tanto crecientes como decrecientes en la carga bacteriana en los distintos cultivos infectados, podemos hablar de replicación bacteriana (por lo menos en la cepa MCF7) y muerte de las bacterias intracelulares (en todas las líneas). Una limitación de este método es que en caso de que una célula invadida pierda la integridad de su membrana a causa de su muerte, las bacterias intracelulares entran en contacto con la gentamicina, perdiendo su viabilidad y siendo invisibles al ensayo por no formar colonias. Fueron necesarios ensayos complementarios para analizar el detalle de la cinética de replicación bacteriana intracelular y el destino de las células infectadas.

5.1.3. Cinética de LVR01GFP y SL3261GFP en ensayo de invasión/replicación medida por citometría de flujo

Las variantes GFP+ de las STAs nos permitían revelar el ensayo de invasión mediante técnicas de citometría, que resultarían en información

cuantitativa sobre el porcentaje de células infectadas y la intensidad de GFP de las células infectadas (proporcional al número de bacterias intracelulares). Brevemente, células 4T1 o NMU que fueron infectadas con LVR01GFP o SL3261GFP, fueron analizadas por citometría de flujo al cabo de 2, 24 o 48hs. Tras la digestión con tripsina para obtener la suspensión de células invadidas, se realizaron intensos y repetidos lavados a fin de disminuir el remanente de bacterias potencialmente adheridas pero no internalizadas, que pudieran interferir en el análisis. Como la fluorescencia de las STAs con GFP no es suficiente para generar un histograma con dos picos separados entre células sin invadir e invadidas, se trazó una línea sobre el hombro que generan las “GFP+” que incluye a la mayoría de las GFP+ en las muestras infectadas y una minoría de células no infectadas en los controles (Fig 5.D.I). El este valor presente en las muestras control fue restado a todas las muestras, para considerar el porcentaje de células GFP+. La cinética de LVR01GFP graficada en la figura 5.D.II indica que en ambas líneas celulares el porcentaje de células GFP+ empezó cerca del 8% a las 2hs. Este baja por debajo del 4% a las 24hs y llegando a su mínimo a las 48hs donde la proporción fue de menos de un 2%. La intensidad media de fluorescencia (MFI) (relativa a la porción de *background* “GFP+” del control sin infectar) fue ligeramente superior al *background* (110% aproximadamente) a las 2hs. Esta se alzó a valores cercanos al 185% en células 4T1 y a 140% en células NMU para las 24hs, sugerentes de una alta carga de LVR01GFP. Al cabo de 48hs la intensidad media de fluorescencia fue intermedia entre los valores de las 2hs y las 24hs. En los histogramas de 24 y 48hs, se observaron numerosos picos menores de altos niveles de fluorescencia que se separaban del pico/hombro principal. Los niveles decrecientes de células infectadas con LVR01, se acompañaron del incremento de señal de GFP+, indicando una asociación de la acumulación bacteriana intracelular con la desaparición de las células infectadas. El experimento análogo con SL3261 GFP muestra una proporción inicial de células GFP+ inferior al 2% que baja a las 24hs y llega a niveles apenas detectables al cabo de 48hs. Los niveles de MFI de SL3261GFP a las 24 (4T1) o 48hs (NMU) muestras incrementos leves. En este caso la invasividad es muy baja y los resultados son menos claros, pero igual se aprecia una reducción en el número de células infectadas y

un incremento en la intensidad de fluorescencia. El potencial invasivo y replicativo de LVR01GFP fue superior al de SL3261GFP, concordando con los resultados previos obtenido mediante plaqueo. La caída en el porcentaje de células invadidas por LVR01GFP se acompañó de un incremento en la señal de GFP. La aparición de pequeños picos de altas intensidades de fluorescencia a las 24 y 48hs separados del hombro principal de GFP+ sugiere que no en todas las células infectadas hay números similares de LVR01GFP. Para establecer si la acumulación intracelular de LVR01GFP induce la muerte de la célula infectada, es necesaria la observación por microscopia de fluorescencia de especímenes infectados.

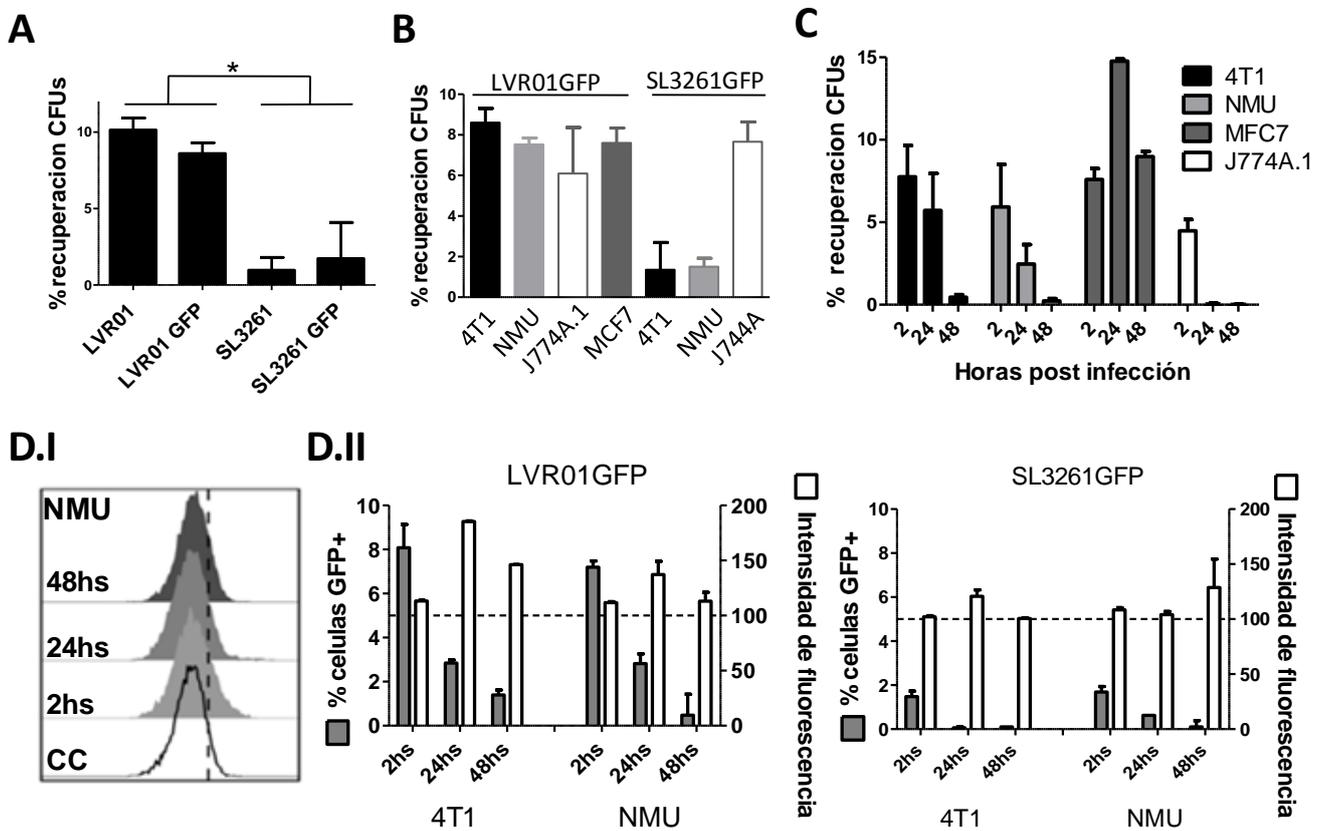


Figura 5. Capacidad Invasiva y replicativa de STAs sobre células de cáncer mamario. (A) Comparación de invasividad entre variantes de STAs GFP+ y parentales sobre células 4T1. Las variantes GFP muestran capacidades similares a las variantes parentales. Ambas cepas de LVR01 presentan una mayor recuperación que las cepas de SL3261. (estadísticamente significativo según el tests *one way* ANOVA y post test de Bonferroni, con $p < 0.05$) **(B) Capacidad Invasiva de LVR01GFP y SL3261GFP en un panel de líneas celulares.** Al tiempo de 2hs post infección, la lisis y el plaqueo de los cultivos invadidos con STAs mostro a la cepa LVR01GFP con una capacidad invasiva similares en las cuatro líneas celulares ensayadas. Esta fue entre 5 y 10 veces mayor que la de SL3261GFP para las líneas celulares mamarias. En la línea fagocítica J774A.1 la capacidad invasiva es similar en ambas cepas. Se muestra el desvío estándar de 2 experimentos de dos replicas experimentales cada uno. **(C) Cinética de recuperación de CFUs de LVR01GFP en ensayo de invasión/replicación.** Cultivos invadidos de 4T1, NMU,

MCF7 y J774A.1 fueron lisados y plaqueados a los tiempos de 2, 24 y 48hs post infección. Un perfil similar de recuperación en función del tiempo se obtuvo para 4T1 y NMU, donde el porcentaje inicial ronda el 8%, y este bajo variablemente a las 24hs, para registrar el mínimo de alrededor de un 1% a las 48hs. En MCF7 se eleva el número de bacterias recuperadas a las 24hs, decayendo las 48hs. En la línea J744A la recuperación a 24 y 48hs es casi nula. Se muestra el desvío estándar de 2 experimentos de dos replicas experimentales cada uno **(D) Citometría de flujo de células invadidas**. Células 4T1 y NMU invadidas fueron cosechadas con tripsina a los tiempos de 2, 24 y 48hs y examinadas por su expresión de GFP mediante citometría de flujo. (D.I) Se muestra una superposición de histogramas de intensidad de GFP para la línea NMU a los tiempos ensayados. La fluorescencia de las células invadidas por LVR01GFP (ni por SL3261GFP) no fue suficiente para separarlas del pico de autofluorescencia basal. Sin embargo se detectaron “hombros” en el histograma que se usaron como guía para trazar un umbral (línea discontinua) que “separaba” las células GFP+ de las negativas.(D.II) Para las células invadidas por LVR01GFP la fracción de células GFP+ (barras grises eje izquierdo) en ambas líneas ronda el 8%, a las 2hs y este bajo a aproximadamente a la mitad de su valor a las 24hs, llegando a un mínimo de un 1-2% a las 48hs. En las dos líneas celulares La intensidad media de fluorescencia relativa (barras blancas eje derecho), comenzó en un 110%, aproximado al as 2hs, llegando al máximo a las 24hs en un 180% en 4T1 y en un 150% en NMU indicando acumulación de LVR01GFP intracelulares. Este valor bajo ligeramente a las 48hs en 4T1 y NMU. Las células invadidas por SL3261GFP fueron menores al 2% en promedio a las 2hs, y fueron mínimas a tiempos mayores. La intensidad media de fluorescencia se incremento levemente a tiempos tardíos. La línea punteada denota el 100% de intensidad de fluorescencia relativa (fluorescencia igual al control sin infectar). Las barras de error muestran el desvío estándar de un experimento representativo con 2 replicas biológicas. *, **significativo a p valor de 0,05**.

5.1.4. Evaluación de los efectos de la invasión/replicación de LVR01 por microscopia de epifluorescencia

Para poder observar el detalle a nivel celular de los eventos que ocurren durante el progreso de la invasión y replicación de LVR01GFP en células tumorales mamarias, se recurrió a técnicas de microscopia de epifluorescencia revelando el ensayo de invasión a distintos tiempos. El primer experimento (figura 6.A) consistió en la observación de ejemplares de las monocapas invadidas fijados y teñidos con DAPI a las 2, 24 y 48hs. A las 2hs, la presencia de bacterias en las células invadidas no supera las 4 bacterias por célula (una suposición ya que mediante esta técnica pueden confundirse con células adheridas superficialmente) y no se relaciona con un estado de deterioro celular. La localización aparenta ser frecuentemente citoplasmática y perinuclear. Al tiempo de 24hs se encontraron células densamente infectadas, que presentaban decenas de LVR01GFP en su interior. La localización de la bacteria a este tiempo se mantuvo dentro del citoplasma, excluyendo al núcleo. En algunos casos las células densamente infectadas se presentaban de forma más redondeada o deformada y presentaban formas nucleares alteradas o ausencia de núcleo. Tras 48 de infección, una gran parte de las células

densamente infectadas se encontraban con un mayor tamaño y estado de deterioro, incluyendo la desaparición completa de núcleo, al punto que parecían destruidas, dispersando su contenido bacteriano en sus inmediaciones. En base a estos resultados se pudo comprobar visualmente el carácter progresivo de la acumulación bacteriana intracelular y su asociación con cambios morfológicos de la célula infectada.

Con la intención de establecer la relación entre la invasión/replicación bacteriana, el deterioro y la muerte celular, se llevaron a cabo tinciones vitales con yoduro de propidio en monocapas de 4T1 y NMU invadidas con LVR01GFP a las 24hs post invasión (Fig 6.B). Previo a realizar la tinción vital con yoduro de propidio, al observar los cultivos infectados se encontraron células densamente infectadas con LVR01GFP que perdieron adherencia a la monocapa. Algunas de estas células mantenían su aspecto esférico y estaban repletas de bacterias que parecían dispersarse a partir de alguna ruptura en la membrana. Bajo esta observación los lavados se realizaron con la máxima delicadeza intentando preservar el mayor número de estos especímenes. Cuando centramos la atención en las células densamente infectadas (Fig 6.B.IV), se pueden apreciar características particulares. Estas se tiñen de yoduro de Propidio (Fig 6.B.III), pero de manera granular y menos intensa que otras células muertas (no infectadas) en su cercanía. La célula infectada sobresale de la monocapas que la contiene (Fig 6.B.I / Fig 6.B.II), como se aprecia en los distintos enfoques. La célula también adquiere bordes redondeados y presenta un aspecto granuloso. La rapidez de tinción de las células necróticas no infectadas fue casi inmediata, no como en el caso de las células densamente infectadas, que alcanzaron su máximo estable entre los 5 y 10 min (e incluso algunas no se tiñeron). Estos resultados nos permiten establecer que la replicación de LVR01GFP se asocia al deterioro y muerte de la célula infectada.

A las 24hs, la densidad bacteriana intracelular generalmente no permitía individualizar las bacterias presentes en el interior celular. Por esta razón se observaron cultivos vivos de 4T1 y MCF7 infectados sin tinción adicional en el periodo de 12-16hs post infección con LVR01 GFP esperando encontrar la densidad bacteriana en una condición intermedia

que permita obtener más información sobre su estado. En algunas células densamente infectadas se pudo apreciar la movilidad de las bacterias en el interior celular, con velocidades similares a la de la misma cepa libre en solución (registradas en capturas de video “ GFP 10FPS 90sec-3sec.AVI “ adjuntado, donde se condensan 90 segundos de captura en 3 segundos de video). Posteriormente se pudo comprobar que las células infectadas donde se observaba movilidad bacteriana eran viables, al ser capaces de excluir al yoduro de propidio. La movilidad intracelular de la cepa LVR01GFP observada en algunas células infectadas sugiere diferentes estados para las bacterias intracelulares, que pueden ser tanto móviles como no móviles.

Por otro lado, se realizaron tinciones vitales con yoduro de propidio sobre células J774A.1 infectadas con LVR01GFP (y sin infectar). Ante la caída abrupta en recuperación bacteriana apreciada a las 24hs en la cinética de plaques (Fig5.C), se planteo hacer tinciones vitales a las J774A.1 infectadas a las 12-16hs. A este tiempo se observo una muerte masiva de células, donde se apreciaba una densidad celular disminuida respecto a los controles, abundante *debris* celular y una proporción remanente de células que se teñían con yoduro de propidio (6.B.V-VI) en un aproximado 20-30%. También se observo cierta acumulación bacteriana intracelular en varias de estas células (6.B.VI-VIII). Los controles sin infectar a este tiempo, casi no presentaban células muertas (entorno de 2%). Las células en proceso de muerte, abandonaban su aspecto redondeado para presentar un citoplasma deformado y granuloso, que parecía desintegrarse, a juzgar por el abundante *debris* celular. En las células sobrevivientes a las 24hs (fig 6.B.IX y 6.B.X), algunas de ellas presentaban rastros de ADN en el citoplasma en pequeños focos, pero no mostraban fluorescencia alguna de GFP. La infección de J774A.1 por parte de LVR01GFP se asocio con muerte celular al cabo de 12-16, concordante con la desaparición de bacterias viables recuperables en los plaques.

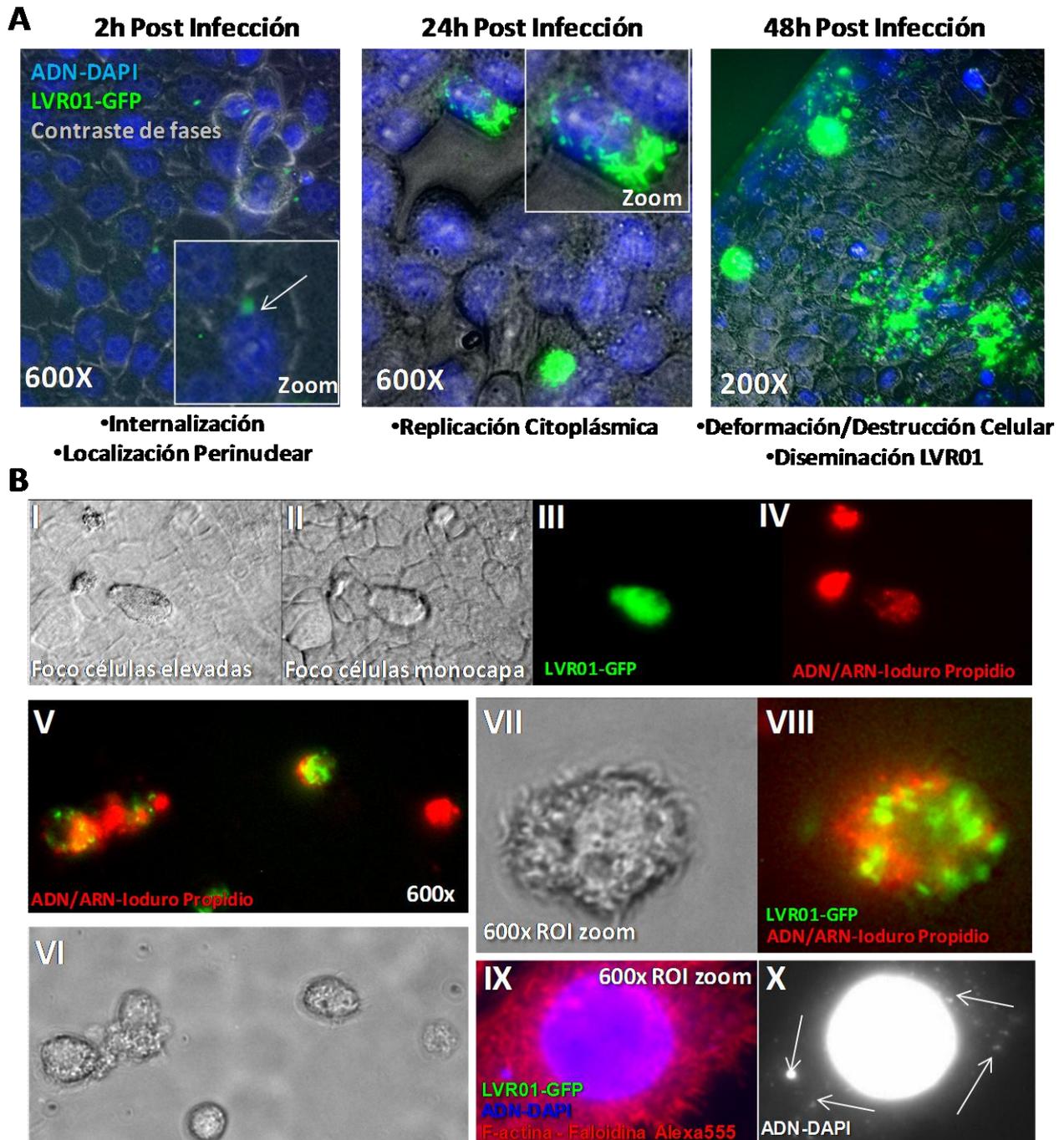


Figura 6. Efectos de la invasión/replicación de LVR01GFP vistos al microscopio de epifluorescencia. (A) Estadios de infección de las células invadidas. Monocapas de 4T1 invadidas con LVR01GFP (verde) fueron reveladas a las 2, 24 y 48hs, mediante fijación con PFA y una tinción con DAPI (azul). A las 2 hs las bacterias parecen localizarse cerca del núcleo y típicamente no sobrepasan las 4 bacterias por célula. La presencia bacteriana no se asocia a ningún cambio morfológico en este tiempo. Ya para las 24hs, se observan células densamente infectadas de distribución aparentemente citoplásmica y que excluyen al núcleo. Algunas de estas células se muestran redondeadas e incluso pueden llegar a mostrar formas nucleares alteradas o su total ausencia. Para las 48hs post infección, la mayoría de las células redondeadas y densamente infectadas presentaba hinchazón y un estado de deterioro que llegaba a la destrucción de la célula y la liberación del contenido bacteriano al entorno. **(B) Tinción vital con Ioduro de propidio en cultivos infectados con LVR01GFP**

Cultivos celulares de 4T1 de 24hs de invasión/replicación, fueron teñidos con Ioduro de Propidio (Rojo) y observados al microscopio de epifluorescencia. La célula que se muestra centrada en la imagen, corresponde a una densamente infectada (LVR01GFP de color verde en III), que se tiñe tenue y granularmente de Ioduro de propidio (IV) comparado con otras células muertas no infectadas. Si se enfoca la célula en contraste de fases (I) se aprecia cierto granulado y se observa que esta se posiciona por encima de la monocapa (enfocada en II). En V y VI se muestra el estado de un cultivo de J774A.1 infectado con LVR01 al cabo de 16hs. En estos cultivos existe una muerte masiva de las células según su tinción por IP, que en algunos casos se asocia con acumulación bacteriana intracelular (ampliado en VII y VIII). A las 24hs, las J774A.1 sobrevivientes no tiene rastros de LVR01GFP (IX), pero sí de ADN en su citoplasma (flechas en X). En esta última tinción se ve en verde a LVR01GFP, en rojo el citoesqueleto de F-actina marcado con faloidina-Alexa555 y en azul de ADN marcado con DAPI.

5.1.5. Análisis de localización subcelular y de la progresión de la replicación intracelular de LVR01GFP mediante microscopia confocal.

Las imágenes obtenidas mediante microscopia de epifluorescencia, aportaron información valiosa acerca del efecto de LVR01GFP sobre células tumorales mamarias 4T1 y NMU. Sin embargo, son las técnicas de microscopia de fluorescencia confocal las que se necesitan para confirmar el carácter intracelular de LVR01GFP, su localización fina y para realizar el conteo fino del número de bacterias por célula. Para lograr la calidad óptica necesaria de la muestra, se crecieron las células eucariotas en cubres de vidrio y sobre ellos se realizó la invasión manteniendo la misma MOI pero disminuyendo la densidad de células eucariotas a la mitad. La invasión fue revelada a las 2, 12, 24 y 48hs. Las muestras fueron fijadas y posteriormente teñidas con DAPI para marcar ADN y con Faloidina-Alexa555 que marca el citoesqueleto de F-actina y ayuda a delimitar los bordes celulares. Una vez llevados al microscopio confocal, se puede observar en la figura 7.A.I los planos ortogonales que permitieron confirmar la localización intracelular de la LVR01GFP. En 7.A.II se observa una reconstrucción 3D de una célula NMU infectada de 8hs, donde se aprecia el crecimiento intracelular bacteriano, también en cercanía al núcleo. La bacteria se encontró claramente dentro del interior de los límites de la tinción del citoesqueleto de actina y se posicionó en cercanía con el núcleo de la LVR01GFP internalizadas.

El proceso de invasión/replicación observado en células individuales al microscopio confocal, fue dividido arbitrariamente en categorías (1-3, 4-10, 11-20, 21-50, 50+) según el número de bacterias intracelulares como se muestra en la figura 7.B. Los cultivos infectados presentan cantidades crecientes de LVR01GFP a tiempos mayores. Este proceso de acumulación bacteriana se acompañó (en sus fases avanzadas, 50+) de cambios en el citoesqueleto (redondeo y menor grado de tinción), desprendimiento de la célula respecto a la monocapa y alteraciones en la morfología nuclear.

Mediante la observación de campos al azar a los tiempos de infección ensayados, se realizaron conteos de células infectadas y se les asignó a cada una de ellas a una de las categorías descritas. Con estos datos se construyeron curvas de porcentaje de células infectadas en función del tiempo y de cantidad de LVR01GFP por célula infectada (7.C). El conteo de LVR01GFP por célula infectada fue un poco mayor en NMU que en 4T1 por la duración del ensayo. Sin embargo LVR01GFP se comportó de manera similar en ambas líneas celulares en términos de cinética de replicación. En ambas líneas celulares el aumento en el conteo de bacterias intracelulares por célula infectada se acompañó de una disminución del porcentaje de células infectadas (7.C.I y 7.C.II). Si dividimos a las células infectadas en categorías para cada tiempo ensayado (7.C.III y 7.C.IV), las células densamente infectadas aparecen ya a las 12 hs y su pico se ubica a las 24hs, seguido una marcada disminución a las 48hs, que condice con la disminución abrupta en porcentaje de células infectadas. Es de notar que no todas las células infectadas parecen alcanzar el estado densamente infectado a la vez y que algunas incluso no llegan a hacerlo en la duración del ensayo. Los experimentos por microscopía confocal, permitieron corroborar el carácter intracelular de la replicación y su localización citoplasmática, las alteraciones asociadas a la replicación, y la existencia de células en distintos estadios de infección a lo largo del ensayo. Además se cuantificó el número de bacterias por célula, que se incrementó con el paso de las horas, asociándose a una caída en el número de células infectadas a tiempos tardíos, (concordando con los datos obtenidos de la invasión revelada por citometría de flujo, figura 5.D.II) asociando la replicación intracelular con la desaparición/muerte de las células infectadas.

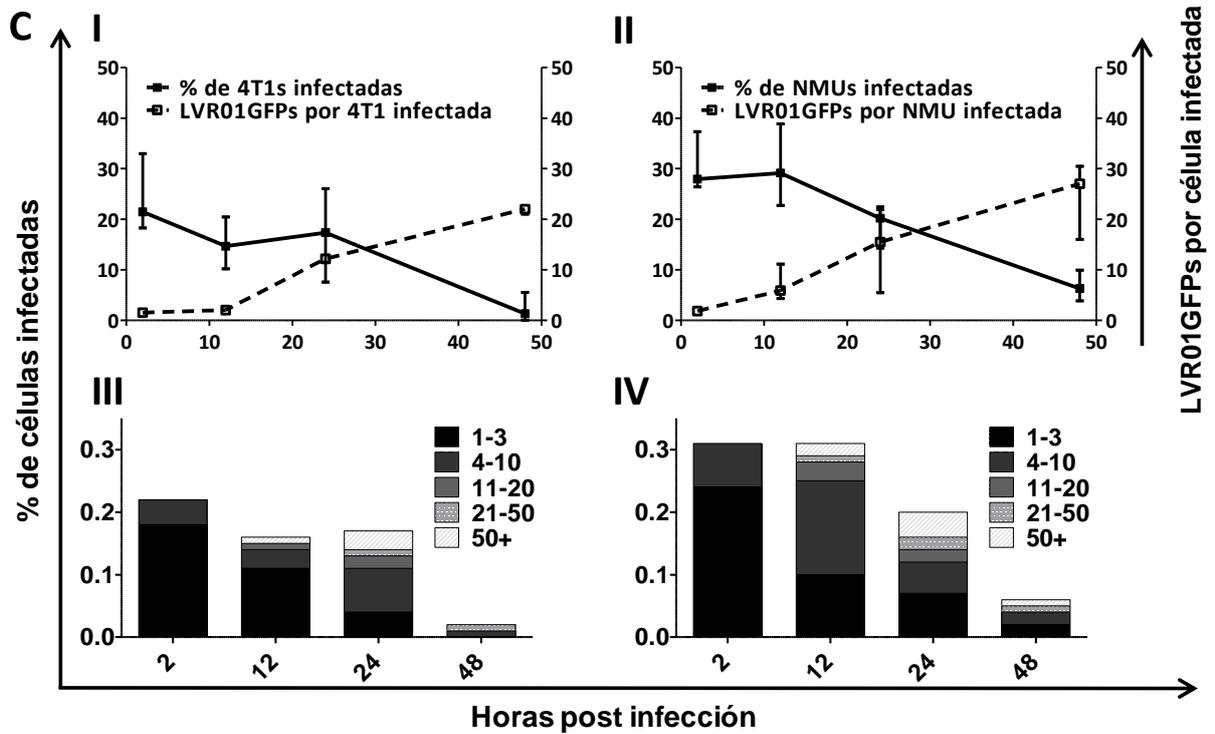
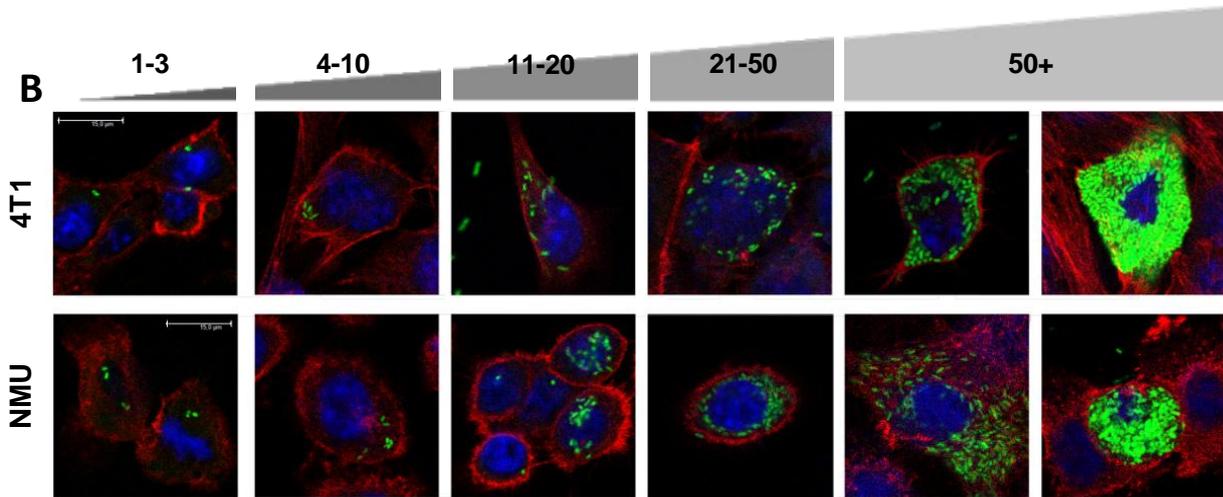
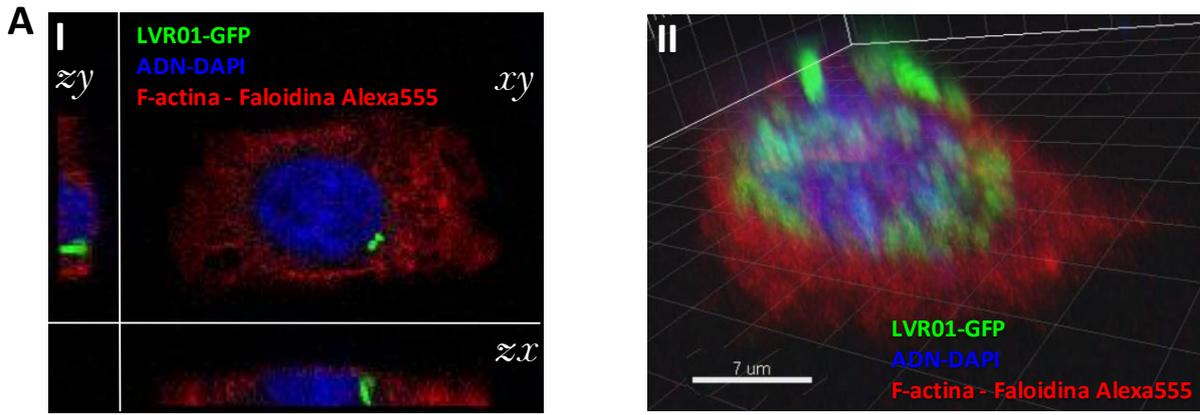


Figura 7. Invasión y replicación de LVR01 analizada por técnicas de microscopia de fluorescencia confocal.

(A) Localización intracelular de LVR01GFP. En (I) Se aprecia a la LVR01GFP que al cabo de 2hs post invasión se sitúa en el interior de una célula 4T1 cercano al núcleo. La localización se puede confirmar en los tres planos ortogonales que se muestran (xy, zx y zy). En II se aprecia una reconstrucción 3D de una célula NMU a las 8hs post invasión, donde también se aprecian numerosas bacterias perinucleares. **(B) División de estadios de la infección intracelular de las 4T1 y NMU por parte de LVR01GFP.** Los números sobre gradiente discontinuo indican los rangos de presencia bacteriana intracelular que en los que se categorizaron a las células infectadas. Se muestran imágenes representativas de los estadios de infección para las células 4T1 y NMU encontrados a lo largo de 48hs de infección. **(C) Dinámica de invasión/replicación de LVR01GFP.** Mediante la observación de campos al azar, se realizó un conteo y la categorización de las células infectadas con LVR01GFP. Con estos datos se construyeron curvas de porcentaje de células infectadas en función de los tiempos analizados (líneas continuas, sobre ejes verticales derechos en C.I y C.II, se grafica la mediana de 8 campos para los tiempos de 2, 12, 24 y 48hs). También se muestra una línea punteada que describe la tendencia de la mediana del número de bacterias por célula en función del tiempo. En ambas líneas celulares los valores crecientes de replicación bacteriana se acompañan de una disminución del número de células infectadas, el cual es mas claro a las 48hs y especialmente sobre la línea celular NMU (C.II). En las figuras C.III para la línea celular 4T1 y en C.IV para la línea celular NMU, se analizó la pertenencia a categorías de infección ajustada al porcentaje de células invadidas,. Se muestran graficas de barras apiladas, donde los tonos más claros corresponden a categorías de mayor concentración bacteriana. En las dos líneas celulares ensayadas, la aparición de células densamente infectadas (categoría 50+) se reporta en a las 12hs, haciéndose más numerosas a las 24hs y decayendo a las 48hs.

5.2. EVALUACIÓN DE LA ADMINISTRACIÓN IN VIVO DE STAS COMO AGENTE ANTITUMORAL.

5.2.2. Biodistribución in vivo de la STA LVR01GFP en el modelo animal 4T1

Con la intención de entender el proceso de distribución de la LVR01GFP in vivo, se administro esta bacteria a animales portadores de tumores mamarios 4T1. Como se muestra en la figura 8, LVR01GFP fue administrada mediante las vías Intratumoral (IT), intraperitoneal (IP) e intravenosa (IV). A los 2, 5 y 14 días post inoculación con la STA LVR01GFP, se sacrificaron ratones y se extrajeron tumor, bazo, hígado y pulmón. Se prepararon lisados con H₂O de estos órganos y tumores, los cuales se plaquearon en agar incorporado. El conteo de colonias presentes en cada muestra permitió estimar la presencia de LVR01GFP para cada sitio y día ensayado, este número se relativizo al peso del órgano o tumor del cual procedía para dar lugar a valores de densidad bacteriana (CFUs de LVR01GFP/gramo de órgano). Por otro lado se grafico la recuperación total de bacterias, siendo el número absoluto resultante de la suma de las bacterias presentes en todos los órganos.

Como se observa en la figura 10.A.I la administración de la STA LVR01GFP resulta en la acumulación diferencial de las mismas hacia los tumores. Los valores se sitúan entre los 10^8 - 10^9 CFU/g para los tumores, lo cual es similar en todas las vías de administración (diferencias no significativas por test *one way* ANOVA) y a todos los tiempos ensayados. Esta concentración fue unas en promedio unas 100-1000 veces superior a las encontradas para otros los otros órganos El rango al día 14 fue variable entre 100 y 10000, con los hígados presentando mas bacterias que los bazos y estos mas que pulmones (para todas las vías de administración). Las vías IP e IV resultaron más efectivas en alcanzar a Bazo, hígado y pulmón. La concentración bacteriana en estos sitios decayó aproximadamente un orden de magnitud desde el día 2 a 14 para todas las vías. Cuando se grafica el número absoluto de CFUs recuperadas por ratón (relativizadas al inóculo inicial, mostrado en 10.A.II), se aprecia que todas las vías resultan en una acumulación total inicial similar. Esta se sitúa entre cercano al 100-200% para todos los casos. Al día 5 la vía intratumoral muestra una recuperación de bacterias que ronda el 300-400%, que llega a alcanzar valores superiores al 400% al día 14. Este aumento en las bacterias recuperadas no fue tan marcado en las vías IP e IV, las que presentaron valores generalmente menores y más variables para estos tiempos. No hubo una relación estadísticamente significativa que distinguiera entre los tipos de administración, mientras que si era significativa la diferencia entre los distintos días de administración dentro de cada grupo (Tests estadísticos *Two way* ANOVA, y Bonferonni). En todos los casos, las bacterias correspondientes al tumor representaban un aproximado 95-99% del total de las bacterias recuperadas.

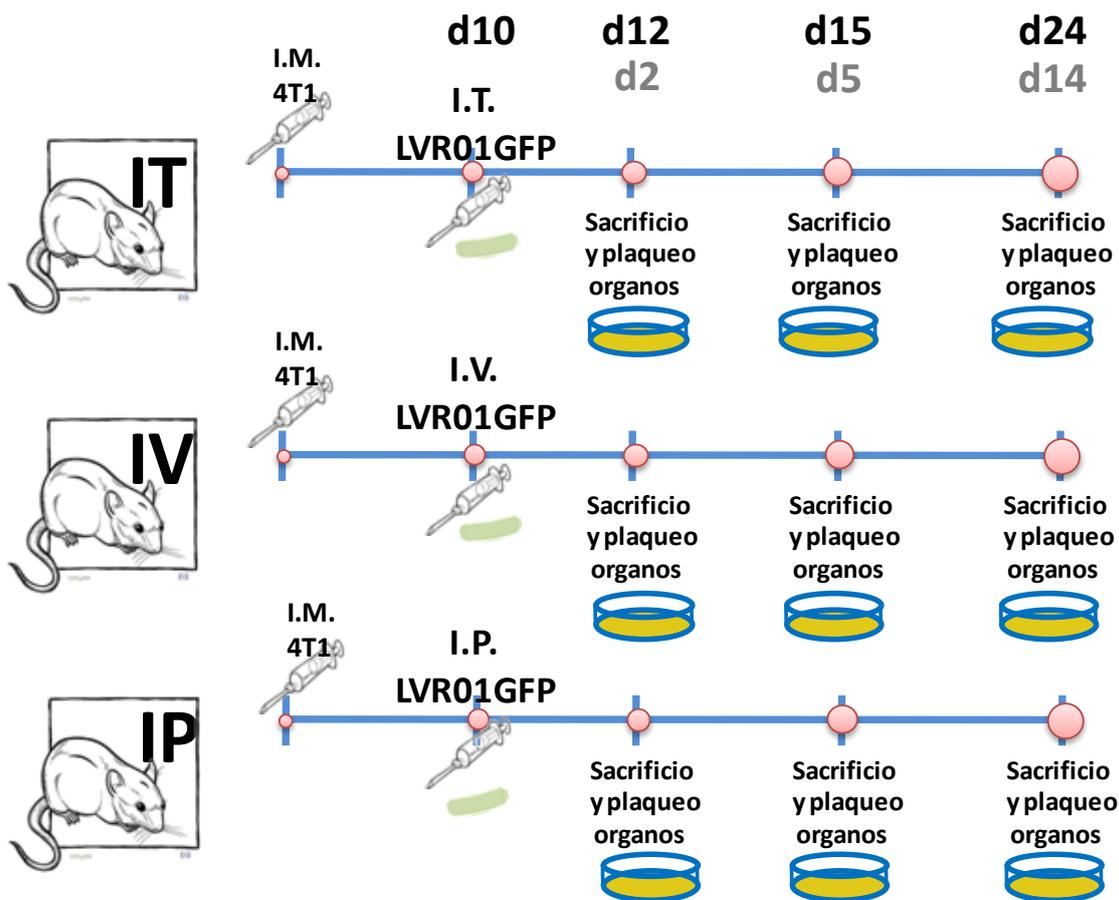


Figura 8. Biodistribución de LVR01GFP en animales portadores de tumores. Ratones BALB/c de 8 semanas, fueron inoculados con 4T1 Intramamaria, y a los 10 días se le administro LVR01GFP por vía IT IV o IP. A los 2 5 y 14 días se sacrificaron animales y se plaqueo en LB agar incorporado el contenido bacteriano presentes en homogenizados de Tumor, Bazo, Hígado y Pulmón. Se realizaron dos ensayos con 3 ratones por grupo cada uno.

En un segundo experimento de biodistribución, se evaluó como afectaba la presencia del tumor a la distribución de la bacteria LVR01GFP. A ratones portadores de tumores, se les administro a los 10 días LVR01GFP vía IT, seguido de una cirugía de remoción del tumor al día 15 y de una administración sistémica de LVR01GFP al día 19 (figura 9). A los 2, 5 y 14 días post administración sistémica de LVR01GFP se realizaron plaqueos de lisados provenientes de los bazos, hígados y pulmones de estos animales. Como se muestra en la figura 10.B.I, la vía IP es más eficaz en llegar a bazo y pulmón, mientras que la IV llega más al hígado. En todos los casos, la concentración bacteriana baja sensiblemente en estos órganos con el paso del tiempo. Esta bajada se ver reflejada en el recuento total de CFUs por animal (figura 10.B.II) que empieza siendo a lo sumo un 20% (IP) o 10%

(IV) al día 2 y ya para el día 5 y 14 los niveles están muy por debajo del 1% del inóculo inicial.

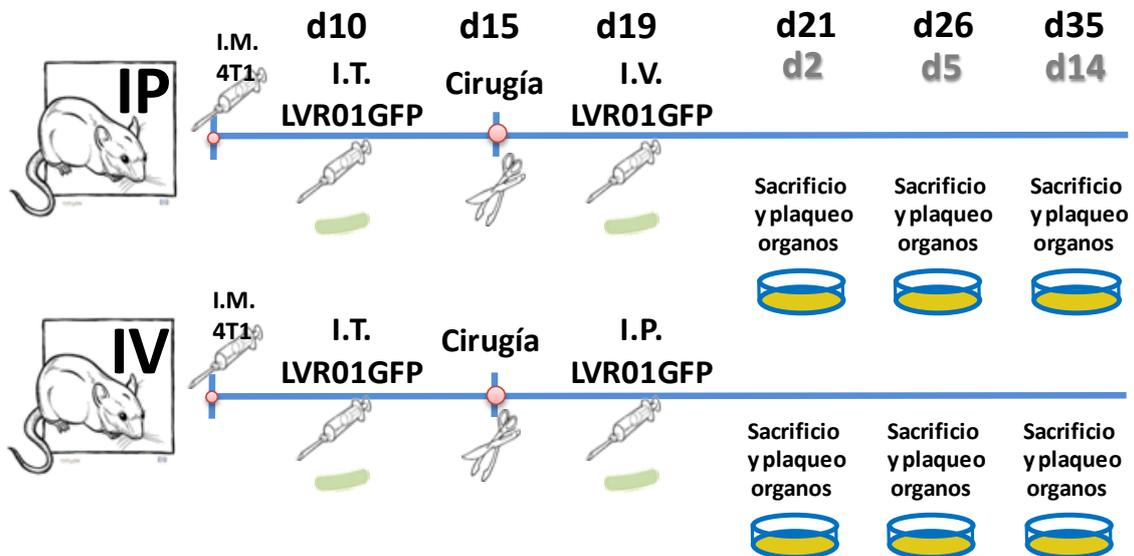
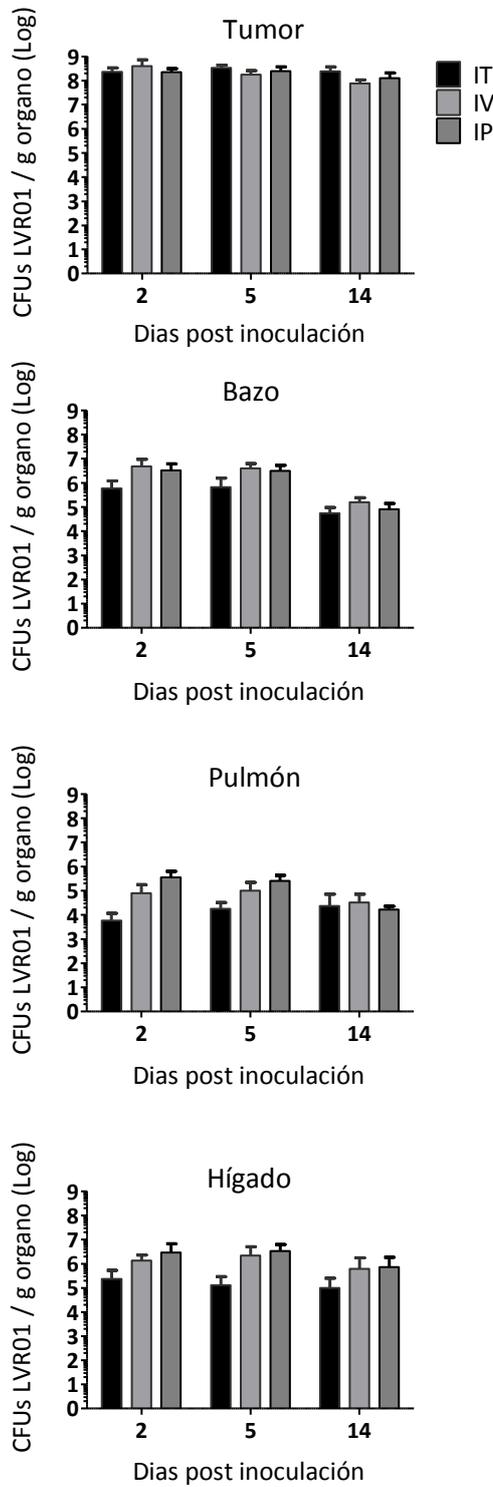


Figura 9 Biodistribución de LVR01GFP en ratones con cirugía de remoción de tumor primario 4T1. Ratones BALB/c de 8 semanas, inoculados con 4T1 Intramamaria, recibieron inicialmente una dosis IT de LVR01 y al día 15 se sometieron a cirugía para remover el tumor primario. Cuatro días después se le administró LVR01GFP por las vías sistémicas IV o IP. A los 2, 5 y 14 días post inoculación bacteriana (sistémica) se sacrificaron animales y se plaqueó en LB agar incorporado el contenido bacteriano presentes en homogenizados de Bazo, Hígado y Pulmón.

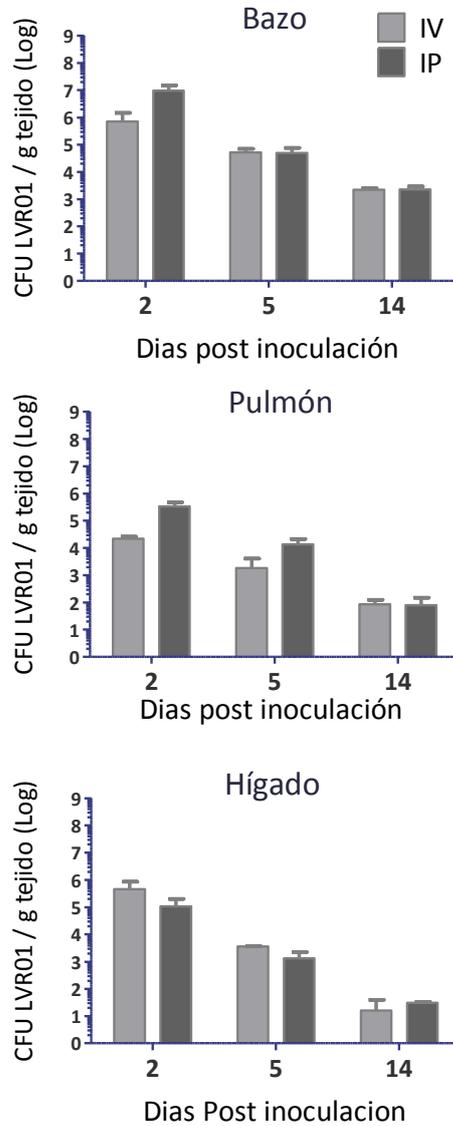
En ambos ensayos de biodistribución, en animales con tumor y en animales sometidos a cirugía, se detectó una hepatomegalia al día 14 post administración de aproximadamente un 30-80% en los animales tratados con LVR01GFP respecto a animales sin tratar. También se registró un incremento adicional en el tamaño de los bazo de los animales portadores de tumores que recibieron salmonella respecto a animales portadores de tumores sin bacterias. Como referencia, los ratones portadores de tumores (sometidos o no a tratamiento con LVR01) presentaron un crecimiento sostenido del bazo durante el tiempo del estudio que alcanzó hasta 6 veces el peso de un bazo normal, mientras que aquellos sometidos a cirugía tuvieron una reducción de masa hasta alcanzar una medida comparable a la de un ratón naive. El patrón de distribución diferencial de la LVR01GFP en animales portadores de tumores indica una preferencia de la bacteria por las zonas tumorales. La vía intratumoral es la que presenta mayor especificidad por el tumor, y mayor acumulación de bacterias en función del tiempo. Tanto la

administración de la bacteria como la cirugía modifican a largo plazo el tamaño de órganos como el hígado y el bazo. La ausencia de tumor resulta en una menor recuperación bacteriana total inicial tras la administración de LVR01GFP vía IV o IP, y esta cantidad decae aceleradamente.

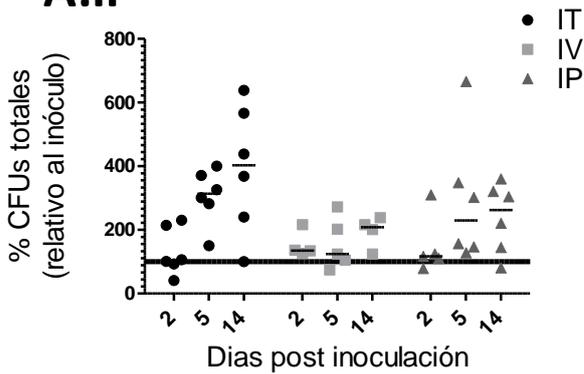
A.I



B.I



A.II



B.II

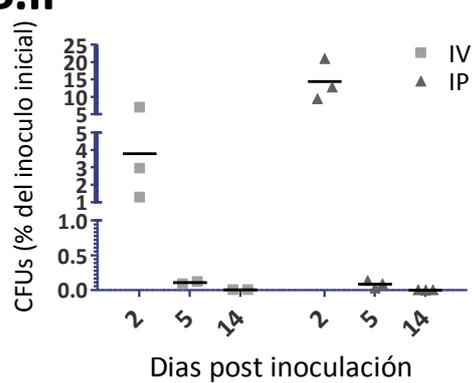


Figura 10. Biodistribución de la STA LVR01GFP mediante plaqueo de órganos. (A.I) Concentraciones de LVR01GFP según órgano y vía de inoculación en animales portadores de tumores. Ratones portadores de tumores fueron inoculados con 2×10^7 LVR01 vía Intratumoral (IT) o Intravenosa (IV) o intraperitoneal (IP) al día 10 post inyección de 4T1. Se sacrificaron animales, se disgregaron mecánicamente los órganos y se paquearon en LBA diluciones de los órganos a día 2, día 5 y día 14 para evaluar la biodistribución de LVR01. La acumulación de bacterias en tumor ronda los $10^8 - 10^9$ CFU/g y es similar para las tres vías y para los tres tiempos ensayados. En bazo, pulmón e hígado, LVR01 se encuentra entre 100 y 1000 veces menos concentrada. La rutas IP e IV son las más eficaces en alcanzar a estos órganos. La concentración bacteriana en estos sitios disminuye con el tiempo aproximadamente un orden de magnitud. **(A.II) Recuento del número absoluto de bacterias por animal portador de tumor.** Se grafica la recuperación total de CFUs sumando todos los órganos para cada vía de administración a cada tiempo. La recuperación se relativiza al inoculo inicial, representado en la barra negra a la altura de 100%. En todos los casos a los 2 días se recupera un número similar o mayor al inoculo inicial. En el caso de la vía IT, al día 5 post inoculación se encuentra un mayor número absoluto de bacterias, que escala a aproximadamente un 300%-600% al día 14. Ni la vía IP ni IV muestran un crecimiento tan importante, y los valores son mas variables. En todos los ratones, aproximadamente un 90-99% de las bacterias encontradas se localizan en los tumores, independientemente de la vía de administración. **(B.I) Concentración de LVR01GFP en bazo hígado y pulmón en animales sometidos a cirugía.** Animales que recibieron una dosis IT de LVR01GFP al día 10 y después fueron sometidos a cirugía al día 15 e inyectados con LVR01GFP (IP o IV) al día 19 fueron sacrificados a los 2 5 y 14 días post inyección de bacteria. Los plaqueos de los órganos obtenidos muestran una mayor capacidad de llegar a Bazo y pulmón de por la vía IP. Se registra una caída en las CFUs/g para todos los órganos y vías conforme avanza el tiempo. **(B.II) Recuento del número absoluto de bacterias en animales sometidos a cirugía.** Se recuperan un numero de aproximadamente 15-20% (IP) o 1-10% de bacterias respecto al inoculo inicial al día 2. Este disminuye por debajo del 1% al día 5 y es casi 100 veces menos a la recuperación inicial al día 14.

5.2.3. Distribución de LVR01 in vivo mediante microscopia de fluorescencia en cortes histológicos.

Se realizaron tinciones sobre cortes histológicos de tumores que recibieron LVR01 para estudiar la distribución de la bacteria y sus efectos a un nivel de detalle celular/tisular. Tras la administración intratumoral, las bacterias se encontraron sobre la ruta de inyección (11.A.I) así como en los bordes del tumor (11.A.II). Por la vía intraperiotoneal, LVR01 al cabo de 24hs también llego a la periferia (11.B.I) y el interior del tumor (11.B.II), sin cubrir todos los espacios. A las 72hs de la administración intratumoral, los sitios donde se encontraba mayor cantidad de *Salmonella* (12.C y D) se asociaban con una desorganización del tejido, que no se observa zonas con escasa o nula presencia bacteriana (12.A y B). Las tinciones de tumores inyectados con LVR01 muestran figuras similares a las encontradas in vitro asociadas con replicación bacteriana a las 24hs (, figuras 13.A.I y 13.A.II, y detalle en en 13.A.III y en 13.B.I), cercanas a estas bacterias se encontraban células con núcleos característicos de células

mieloides/granulocitos (flechas en 13.B.II). Un número variable de figuras densamente infectadas se observó según el campo. La presencia de bacterias en el sitio de inyección se relacionó con el reclutamiento de células GR1+ como se muestra en la figura 14.A. Sobre el borde del tumor (14.B) se observa que en el límite externo se ubican varias células GR1+ las cuales están en íntimo contacto con la LVR01GFP, mientras que en 14.C.I y en 14.C.II vemos aéreas sin presencia bacteriana y un bajo número de células GR1+. Estas observaciones nos permiten establecer que LVR01 es capaz de establecerse en tanto en la periferia como en el interior del tumor de una manera no homogénea. Las zonas que presentan bacteria se asociaron a una desorganización del tejido y al reclutamiento de células mieloides, que no se apreciaron en zonas sin bacteria. Se observaron figuras similares a las obtenidas en los experimentos de replicación in vitro, sugiriendo que esta bacteria también es capaz de replicar intracelularmente in vivo.

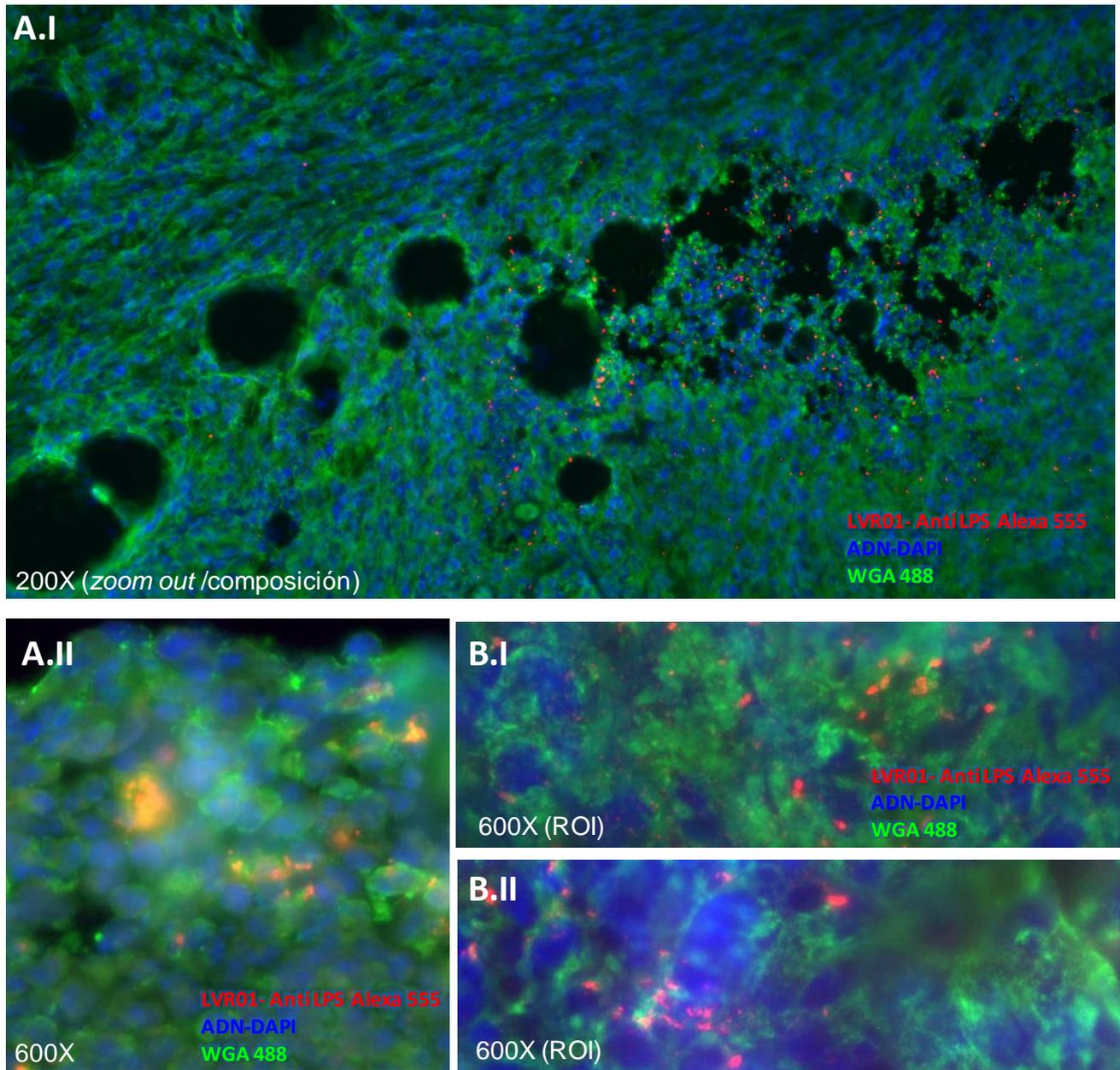


Figura 11. Biodistribución de LVR01 en cortes histológicos de tumores a las 24hs de administración IT o IP (A) Por la vía IT las ubicaciones de mayor concentración bacteriana a las 24hs son el sitio de la inyección (A.I) donde se aprecian bacterias asociadas a una lesión del tejido y los bordes del tumor (A.II). La bacteria no se distribuye homogéneamente por esta vía, con zonas sin bacteria y zonas de alta concentración bacteriana. **(B)** Cuando LVR01 se administra por vía IP, esta se distribuye en la periferia (I) y en el interior del tumor (II) al cabo de 24hs. En este caso también se aprecio un patrón de “parches” con zonas con y sin bacteria. La tinción corresponde a LVR01 en rojo (AntiLPS Alexa 555), ADN en Azul (DAPI) y membranas celulares en verde (WGA 488).

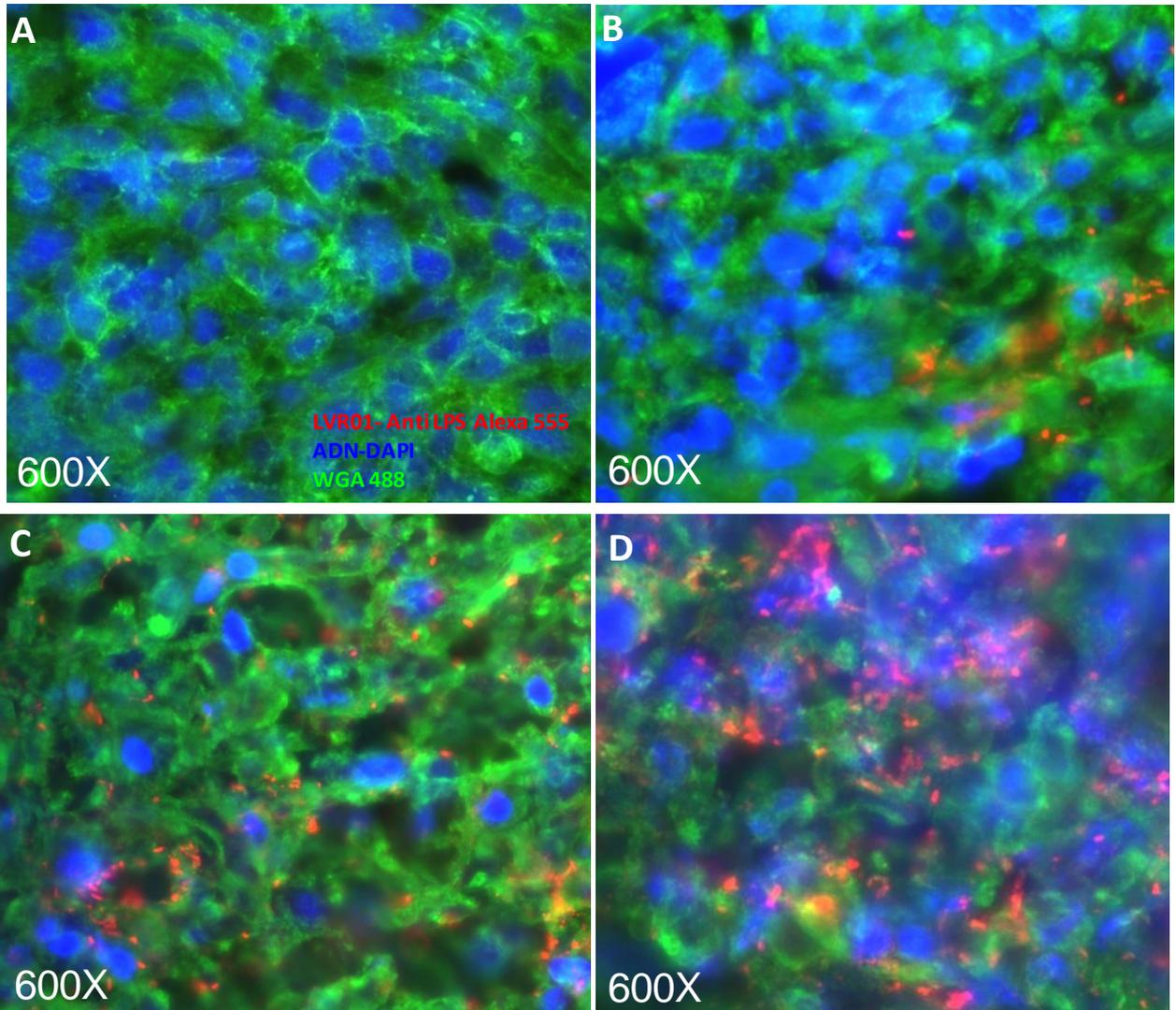


Figura 12. Estructura de los tejidos infectados con LVR01 IT a las 72hs. Se muestran zonas colonizadas (B, C y D) y sin colonizar (A) de tumores tratados con LVR01 IT al cabo de 72hs de la administración intratumoral. Los sitios asociados a una mayor presencia de LVR01 (C y D) se presentan desorganizados, con morfologías celulares/nucleares menos claras. Mientras que los que no presentan bacteria (A) y los que presentan un número bajo (B) no muestran ese aspecto. La tinción corresponde a LVR01 en rojo (AntiLPS Alexa 555), ADN en Azul (DAPI) y membranas celulares en verde (WGA 488).

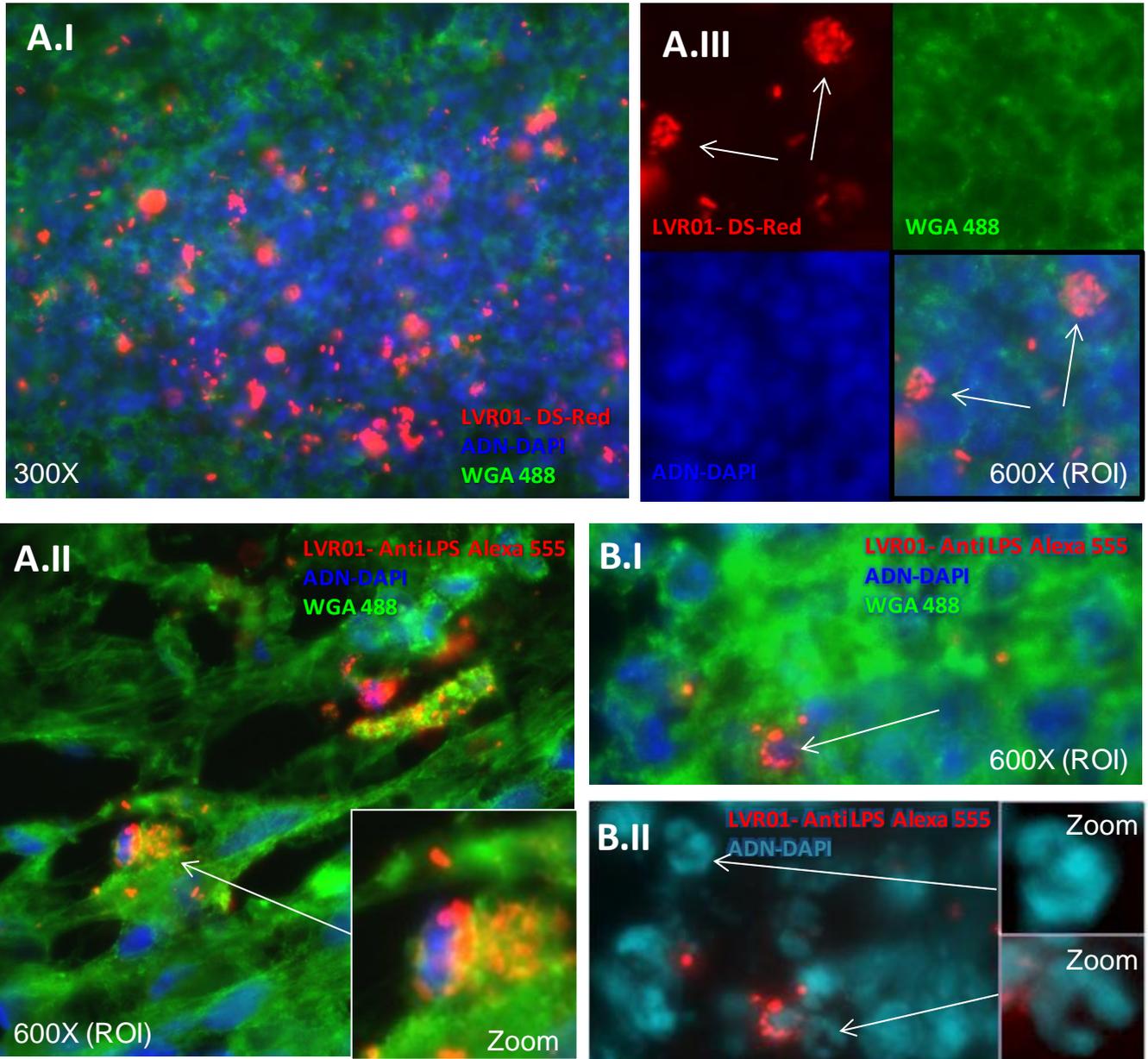


Figura 13. Patrón de distribución de *Salmonella* en las zonas infectadas. (A) Al cabo de 24hs de la inyección IT de LVR01, esta se encontró interdispersa y en algunos casos formando acúmulos dentro de células tumorales similares a los que encontramos en los experimentos *in vitro* (zona infectada en I y II y detalle de la célula infectada en II y III). **(B) Infiltración mieloide asociadas a los sitios de infección de LVR01.** Se observaron los núcleos de las células en zonas que presentan LVR01 a las 24hs post administración IT de la bacteria. En la cercanía de una célula infectada con varias bacterias (flecha en I), se encuentran algunas células cercanas al sitio de infección poseen el núcleo con morfología característica de granulocitos u otras células mieloides (mejor apreciadas en II y II Zoom). En las imágenes de A.I y A.III el rojo corresponde a DS-Red expresado por LVR01, el azul al ADN teñido con DAPI y el verde a las membranas teñidas con WGA. La tinción de las figuras A.II y B.I corresponde a LVR01 en rojo (AntiLPS Alexa 555), ADN en Azul (DAPI) y membranas celulares en verde (WGA 488). En B.II se muestra solamente a LVR01 en rojo (AntiLPS Alexa 555), y el ADN en Cyan (DAPI) para una mejor visualización de los núcleos que en B.I.

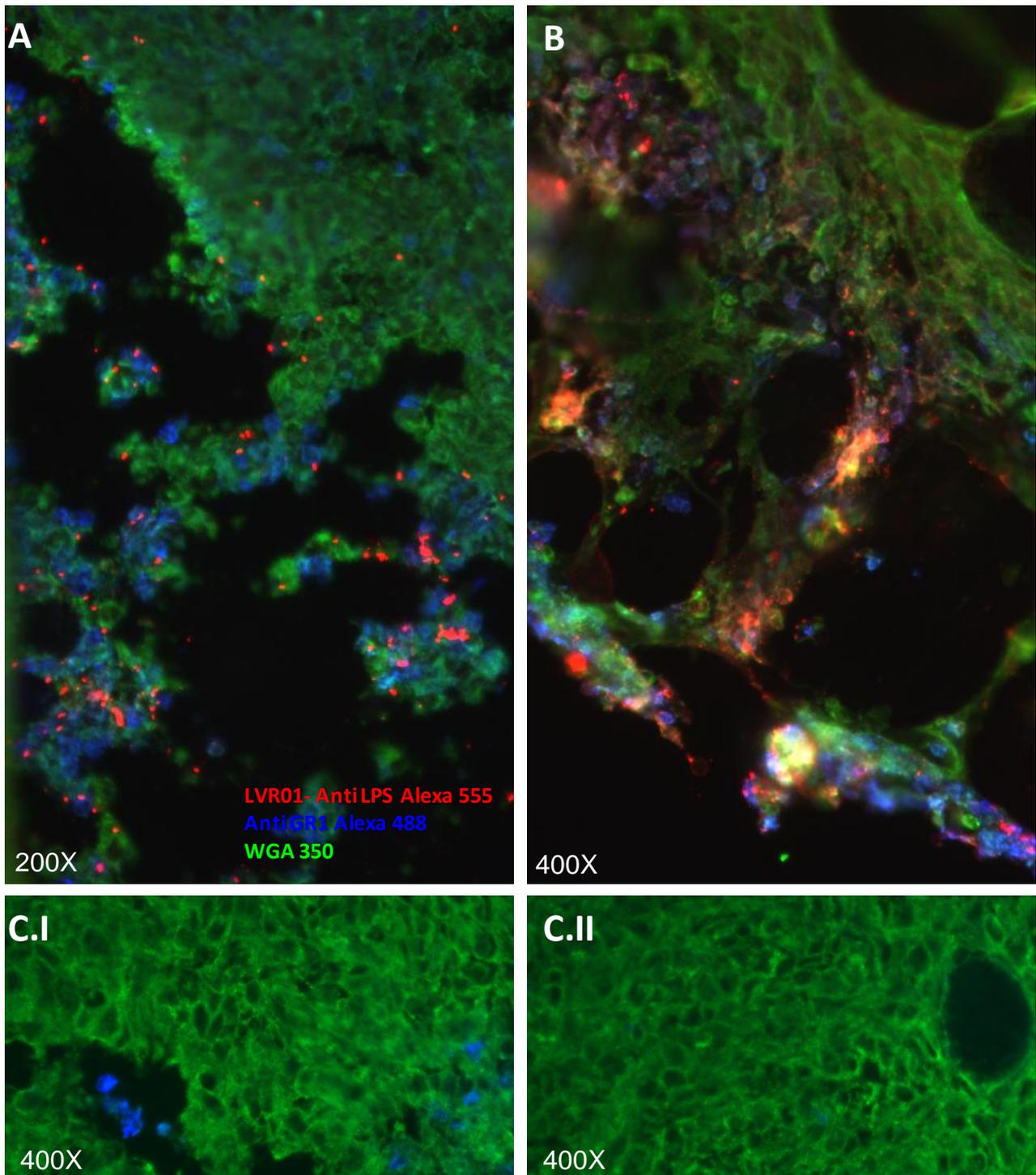


Figura 14. Reclutamiento de células GR1+. A las 24hs de la administración IT de LVR01, se encuentran infiltrados mayores de células GR1+ en los sitios con mayor cantidad de bacterias (sitio de inyección en A y periferia del tumor en B) respecto a otros sitios sin bacterias (C.I y C.II). El rojo corresponde a LVR01 teñida con un anticuerpo anti LPS conjugado a Alexa555, el azul marca el antígeno de membrana GR1 y el verde a las membranas celulares marcadas con WGA 350.

5.2.4. Efectos sobre la sobrevida y el crecimiento tumoral de la administración de LVR01 a animales portadores de enfermedad tumoral/ metastásica.

Previo a evaluar el efecto terapéutico de LVR01 en animales con cáncer mamario, se estableció la importancia de la enfermedad metastásica en el modelo 4T1. Ensayos preliminares nos permitieron confirmar que el proceso de colonización metastásica en animales portadores de tumores ya se inicia para el día 10, y que para el día 15 todos los ratones poseen metástasis pulmonares. La carga metastásica al día 35 en ratones portadores de tumor y en los controles cuyo tumor fue extirpado al día 15 son muy similares. De hecho, como se observa en la figura 16.B la diferencia en sobrevida en ratones portadores de tumor (CT) y los sometidos a cirugía (CC) no es significativa (con medianas de tiempo de sobrevida de 35 y 40,5 días para CT y CC respectivamente), y todos mueren al cabo de 35-60 días. Las autopsias de los animales muertos revelaron en todos los caso numerosos focos metastásicos visibles en los pulmones (típicamente entre 15 y 50, cada una de 1mm de diámetro aprox) y ocasionalmente metástasis en ganglios, corazón, hígado o bazo. Estos ensayos preliminares confirmaron el rol determinante de la enfermedad metastásica en la sobrevida de los ratones portadores de tumores 4T1 y en aquellos sometidos a cirugía. En base a estos resultados se estableció la ventana temporal para tratar a la enfermedad tumoral y metastásica, situada entre los 10-15 días (inicio de proceso metastásico) y los 35 días (cercano a la muerte de los animales sin tratar).

Para la evaluación del efecto de LVR01 en el modelo tumoral 4T1, Ratones BALB/C fueron inoculados con 4T1 y se sometieron a distintos tratamientos descritos en la figura 15. Como se muestra en la figura 16.A la inyección intratumoral de una dosis de LVR01 IT al día 10 post inoculación de 4T1 mostro una tendencia a la disminución del tamaño tumoral respecto a ratones control portadores de tumor, pero esta no resulto ser estadísticamente significativa ($p=0,1004$ en el test de *Student* comparando los grupos al día 31). El seguimiento de los ratones tratados permitió construir curvas de Kaplan Meier para el análisis de la sobrevida (figura 16.B). Una dosis de LVR01 IT, como tratamiento único, no resulto

en un aumento de la sobrevida, con este grupo presentando una mediana de 43,5 días de sobrevida. Las curvas de sobrevida muestran diferencias significativas solo para los casos en los que realizo cirugía y se administro más de una vez a LVR01 (ITCIV e IT2CIV en fig 16.B). El grupo LVR01 ITCIV muestra una mejora significativa en la sobrevida (con una mediana de 47 días), pero todos los animales mueren al cabo de 65 días. En el caso de la triple dosis de LVR01 (IT día 10, IT día 13 cirugía e IV día 21) el retraso en la muerte fue notorio (con una mediana de sobrevida de 59 días) y este grupo reporto los únicos sobrevivientes del ensayo, siendo estos un aproximado 35% de los ratones que sobrepaso los 180 días. En este grupo un ratón que murió cercano al día 100 tuvo que ser sacrificado por una metástasis a nivel que estaba provocando una deformación a nivel del cráneo. La autopsia de este espécimen permitió ubicar esta metástasis a nivel de los huesos craneanos, sin embargo los pulmones, ganglios, hígado, bazo y corazón permanecían libres de metástasis visibles. En el resto de las autopsias en los animales de todos los grupos, siempre se pudo asociar el deceso a la presencia de metástasis pulmonares visibles. En resumen, el tratamiento con LVR01 resulto en un efecto antitumoral moderado y en una extensión de la sobrevida de ratones con enfermedad metastásica, dependiente del número de dosis administradas.

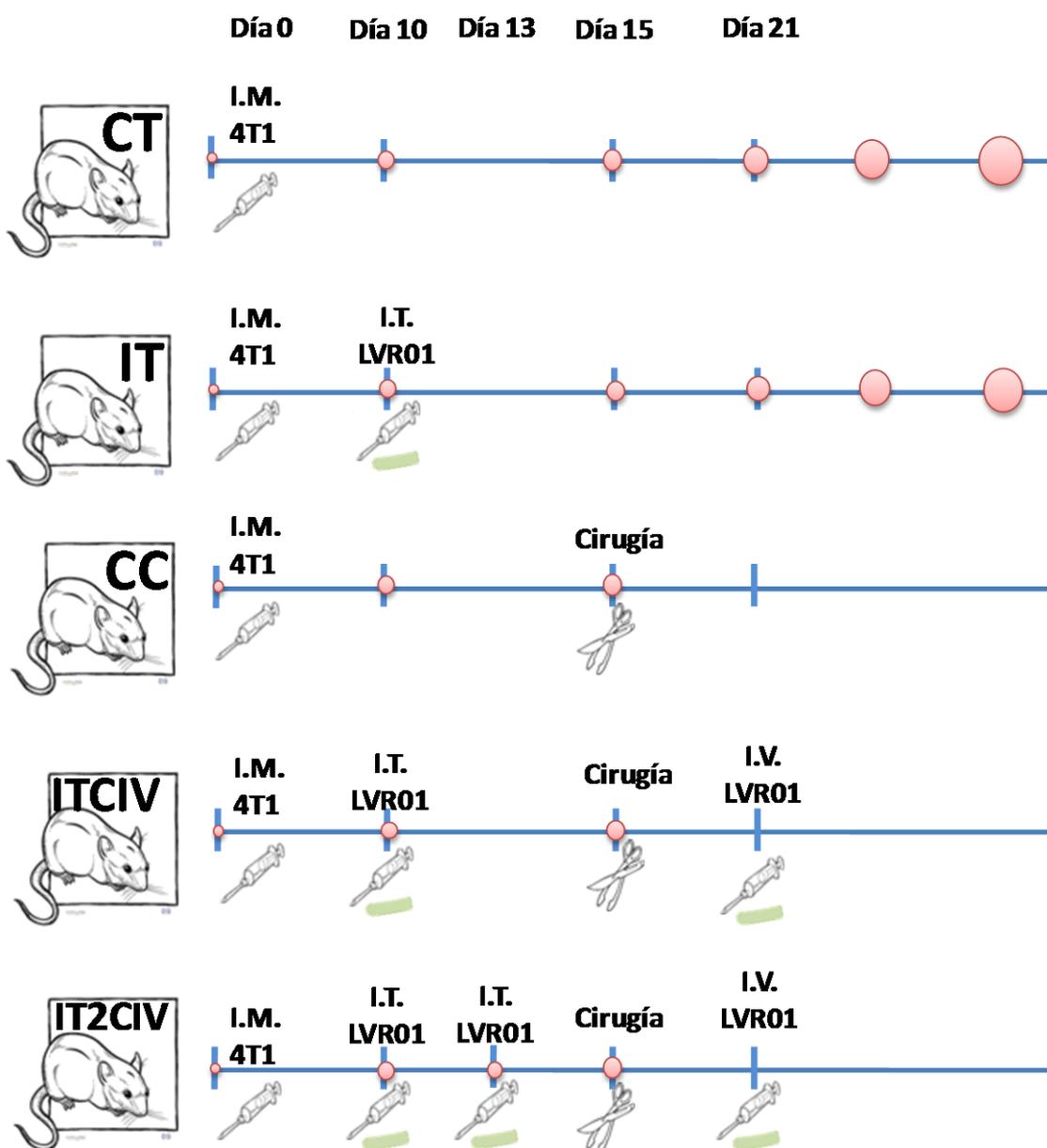


Figura 15. Efecto de la administración de STA y/o cirugía sobre la sobrevida de ratones con tumor 4T1. Ratones BALB/c de 8 semanas inoculados con 4T1 Intramamaria, fueron sometidos a una combinación de cirugía y administración de LVR01GFP. Se realizaron 5 grupos de tratamiento como se observa en la figura. En el caso del grupo CT y IT, se realizaron medidas del volumen tumoral hasta el día 35 aproximadamente. Se realizó el seguimiento de los ratones (8 o 9 por grupo), y se construyeron curvas de sobrevida.

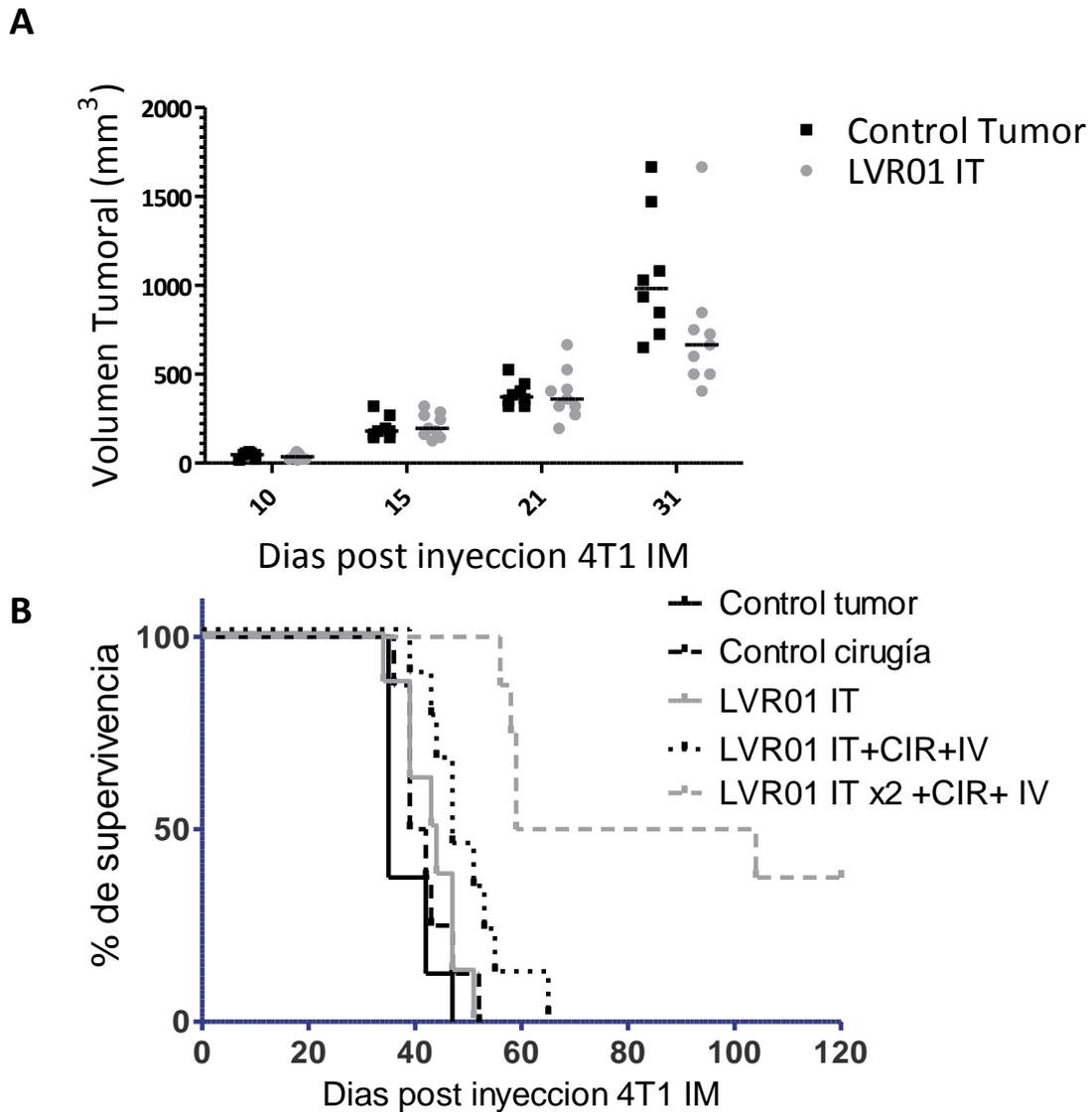


Figura 16. Evaluación de LVR01 como agente antitumoral. (A) Efectos sobre el crecimiento tumoral. En ratones portadores de tumores, se inyectó al día 10 de crecimiento tumoral LVR01 por vía IT o PBS y se realizaron mediciones de tamaño tumoral. El retraso en el crecimiento tumoral del grupo tratado con LVR01 no fue significativo, pero marcó una tendencia al día 31. **(B) Efecto de LVR01 en la supervivencia de ratones con cáncer de mama metastásico.** Ratones portadores de tumores fueron sometidos a una terapia combinada de inyección de LVR01 (vía IT o IV) y cirugía para la remoción del tumor primario. Se realizó el seguimiento de los ratones y construyeron curvas de Kaplan Meier en función de la supervivencia. La cirugía o la bacteria como tratamiento único, no extendió significativamente la supervivencia de los ratones. Sin embargo, la administración de más de una dosis de LVR01 en conjunción con cirugía sí consigue una mejora en la supervivencia de los animales. El grupo LVR01 IT2CIV, que recibe tres dosis de LVR01 y cirugía, presenta el retraso de la muerte más importante e incluso se llega a reportar una aproximada 35% de ratones libres de enfermedad que sobreviven más de 180 días.

5.3. RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN DE LVR01 INTRATUMORAL

Con motivo de entender el posible rol de la respuesta inmune en el tratamiento con LVR01, se estudiaron las células mieloides y linfoides presentes en tumor y ganglio post administración IT de la bacteria, así como los niveles de IFN- γ en suero y la respuesta inmune humoral contra las células 4T1 a distintos tiempos (Figura 17).

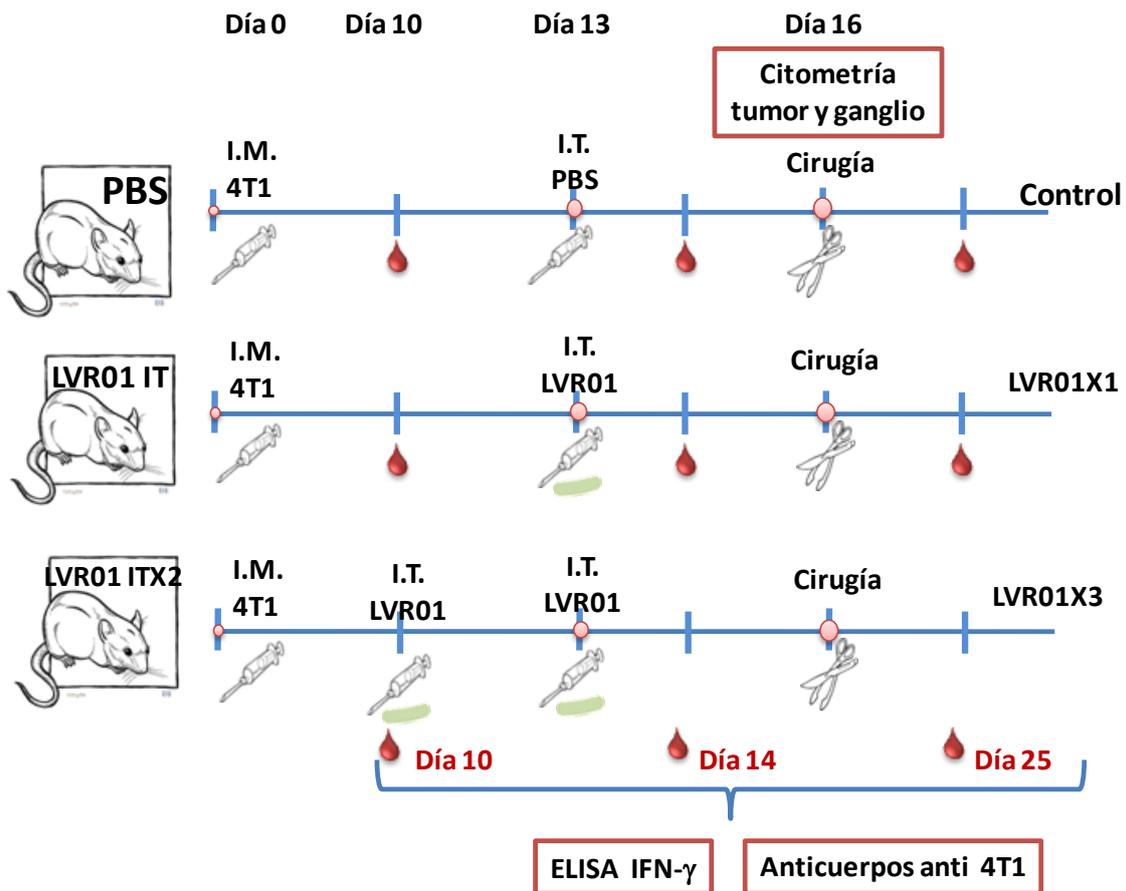


Figura 17. Evaluación de respuesta inmune antitumoral inducida LVR01 IT. Ratones BALB/c portadores de tumores 4T1, fueron inoculados al día 13 de crecimiento tumoral con LVR01 IT o PBS, y sometidos a cirugía al día 16. Los tumores y ganglios obtenidos durante la cirugía fueron procesados para evaluar la presencia de leucocitos por técnicas de citometría. Paralelamente, se realizaron sangrados a los días 10, 14 y 25, de los cuales se obtuvo el suero. Dichos sueros se analizaron en busca del contenido de IFN- γ mediante la técnica de ELISA. Por otra parte se estudio la capacidad de los anticuerpos presentes en estos sueros de reconocer a antígenos tumorales de las células 4T1.

5.3.1. Análisis de poblaciones inmunes presentes en tumor y ganglio

Ratones portadores de tumores, fueron inyectados con PBS o LVR01 IT (una o dos dosis), y sus tumores y ganglios drenantes examinados en búsqueda de las células inmunes, mediante citometría de flujo (esquema experimental en figura 17). Se removió con extremo cuidado el tumor mamario y su tejido adiposo asociado, donde se encontraba el ganglio inguinal drenante, a veces casi integrado al tumor (difícil de localizar y aislar) y se realizó la disgregación mecánica de los tumores y ganglios. Por esta técnica se obtuvieron presentados elevados porcentajes leucocitos (células CD45+) infiltrantes en tumores de alrededor de un % 40 sobre las células totales, y junto a un nivel importante de debris celular en todos los grupos. Para permitir una lectura más clara se relativizaron los porcentajes de los distintos tiempos celulares respecto al total de células CD45+ de cada muestra. Como se aprecia en la figura 18.A.I, aquellos tumores tratados con LVR01 presentaron una tendencia al aumento de células Ly6G+ CD11b+ (posiblemente MDSCs o neutrófilos), que fue estadísticamente significativa al para el grupo LVR01 IT. También se reportó un aumento significativo en los niveles de CD49+ (NK) en el grupo LVR01 IT X 2, respecto a los otros grupos. Las células dendríticas según su marcación con CD11c+ y CD11c+ presentaron un aumento en el grupo tratado con dos dosis de LVR01. Las células F4/80+ CD11b+ (Macrófagos), presentaron una tendencia decreciente en los ratones tratados con LVR01 IT (una o dos dosis), que fue estadísticamente significativa en el grupo LVR01 IT X 2. Los ganglios (18.A.II) del grupo LVR01 IT presentaron un mayor número de células F4/80+ CD11b+ (que coincide con el menor nivel de estos en el tumor), sin embargo en el grupo LVR01 IT X 2 se encontraron niveles bajos como en el control PBS. Los niveles de células dendríticas en los ganglios del grupo LVR01ITX2 fueron mayores a los otros grupos, sin embargo no se encontraron diferencias entre grupos en el porcentaje relativo de células NK en los ganglios. A nivel de linfocitos, en el grupo LVR01 IT X 2 se aprecia una disminución significativa de linfocitos B (CD19+), y una tendencia al aumento de linfocitos T (CD3+), en especial los CD8+ aunque esta no es significativa respecto a los otros grupos. Estos resultados sugieren una movilización a tiempos tempranos de principalmente células inmunes mieloides en el tumor, y de células linfoides a nivel de ganglio drenante.

5.3.2. Niveles de IFN- γ presentes en suero

Se extrajo el suero correspondiente al día 10 (pre tratamiento), día 14 (24hs post tratamiento) y día 25 (12 días post tratamiento), de animales portadores de tumores tratados con LVR01X1 (una dosis intratumoral y cirugía) LVR01X3 (dos dosis intratumorales, cirugía y una tercer dosis intravenosa) o Control (PBS y cirugía). Se separo el grupo LVR01X3 en sobrevivientes y no sobrevivientes en busca de diferencias entre los subgrupos, vale recordar que en grupo LVR01X1 no hay sobrevivientes. Mediante técnica de ELISA se determinaron los niveles de IFN- γ presentes en los sueros que se muestran en la figura 18.B. Animales naive sin tumor ni tratamiento poseen niveles por debajo del umbral de detección. Los animales control portadores de tumor pero que no recibieron LVR01 tienen niveles muy bajos o indetectables de esta citoquina. Por otro lado el IFN- γ detectado en suero al día 14 registra un aumento en algunos ratones tratados especialmente en el grupo de los sobrevivientes de LVR01X3 y el grupo LVR01X1, mientras que en los no sobrevivientes del grupo LVR01X3 se detectan niveles más bajos. Al cabo del día 25, los niveles de IFN- γ en sangre se hacen menores en los grupos tratados tanto en los sobrevivientes de LVR01X3 como LVR01X1, y estos presentan niveles comparables entre si, y mayores a los niveles de los no sobrevivientes del grupo LVR01X3. Más allá de que haya diferencias sustanciales entre sobrevivientes y no sobrevivientes dentro del grupo LVR01X3, los niveles de IFN- γ del grupo LVR01X1 impiden una correlación simple a nivel general entre supervivencia y los niveles de esta citoquina. En conclusión el análisis del contenido de IFN- γ en sangre muestra que esta citoquina aumenta en respuesta al tratamiento con LVR01.

5.3.3. Presencia de anticuerpos que reconocen antígenos de células tumorales

Con intención de evaluar la respuesta por anticuerpos IgG contra antígenos de células 4T1, se realizo una serología contra un extracto de células 4T1 en cultivo usando los sueros del día 25 (figura 18.C). Los niveles de reconocimiento de antígenos tumorales de 4T1 son mínimos entre los sueros de animales control. El tratamiento con LVR01 aumenta

los niveles de reactividad en LVR01X3 y LVR01X1. En el subgrupo de los no sobrevivientes de LVR01X3, es donde se registran los mayores niveles de IgG anti 4T1. Los niveles de los animales sobrevivientes del grupo LVR01X3 y los de LVR01X1 son similares, y solo se encuentra una diferencia significativa entre el grupo de no sobrevivientes LVR01X3 y el control (test de *Student*). En resumen una dosis de LVR01 aumenta la respuesta inmune humoral contra antígenos tumorales, pero esta no parece correlacionarse de manera directa con la supervivencia en todos los grupos.

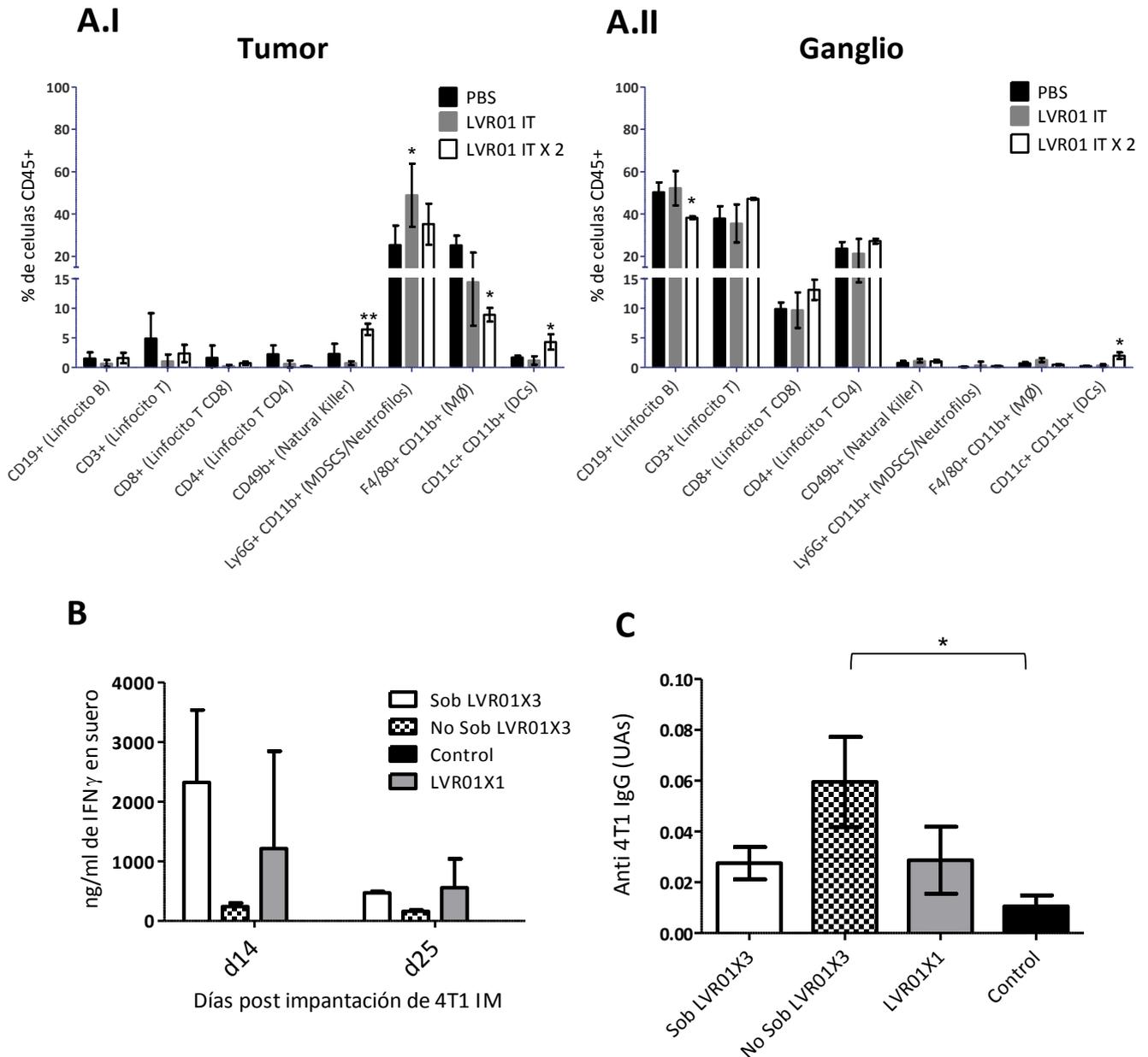


Figura 18. Respuesta inmune inducida por LVR01 intratumoral. (A.I) Células inmunes infiltrantes a tumor. Los tumores presentan infiltrados leucocitarios importantes de alrededor de un 40%, según el número de células CD45+. Los tumores tratados con LVR01 presentaron una tendencia al aumento de células Ly6G+ CD11b+ y de células CD49b+, así como una tendencia a la bajada en células F4/80+ CD11b+. **(A.II) Células inmunes presentes en ganglio.** Los ganglios de los animales tratados con LVR01 presentaron un mayor nivel de células F4/80+ CD11b+ (que coincide con la bajada de los mismos en el tumor). La presencia de linfocitos no se vio alterada significativamente a este tiempo. **(B) Niveles de IFN-g circulantes en los ratones tratados con LVR01.** Los animales que no recibieron LVR01 tienen niveles mínimos o indetectables de esta citoquina. Por otro lado el IFN-g presente en suero al día 14 (un día después de la administración de LVR01 IT) registra un aumento en algunos ratones tratados, especialmente si comparamos entre los sobrevivientes y no sobrevivientes del subgrupo LVR01X3. Ya para el día 25, los niveles en general son menores en animales tratados y se mantiene una diferencia entre sobrevivientes y no sobrevivientes. Por otro lado no se encuentran diferencias entre el grupo sobreviviente LVR01X3 y LVR01X1 (sin sobrevivientes) al día 14 ni al 25. **(C) Anticuerpos contra antígenos de superficie de células tumorales.** Los niveles de reactividad de la IgG en sueros contra antígenos tumorales al día 25 son mayores en los animales que recibieron LVR01 que en los controles. Los animales no sobrevivientes exhiben un mayor nivel de reactividad que los no sobrevivientes dentro del

grupo LVR01X3. Sin embargo los sobrevivientes del grupo LVR01X3 presentan niveles comparables a los de LVR01X1 *, significativo a p valor de 0,05. **, significativo a p valor de 0.01.

6. DISCUSIÓN

En los ensayos de invasión/replicación efectuados se demostró que *Salmonella* invade *in vitro* células tumorales mamarias y replica dentro de ellas. La técnica de plaqueo nos permito cuantificar niveles totales de bacterias intracelulares viables presentes en las monocapas infectadas. La similitud en la capacidad invasiva entre las variantes de *Salmonella* que expresaban GFP y las parentales nos permitió continuar los estudios con la variante GFP+ (Figura 5.A). Entre las cepas de *Salmonella* LVR01 y SL3261 se observo una diferencia marcada en cuanto a su capacidad invasiva (2hs) de células tumorales mamarias (no fagocíticas) y una similar captación de ambas por parte de la línea de macrófago/monocito J774A.1 (Figura 5.B). Los niveles similares de interiorización para ambas cepas bacterianas en la línea J774A.1 posiblemente respondan a la capacidad fagocítica de esta línea celular. Por otro lado diferencia observada de recuperación de bacterias intracelulares entre LVR01 y SL3261 en el panel de líneas de tumor mamario parece deberse a diferencias en las propiedades invasivas de las bacterias. Estas diferencias entre estas cepas son difíciles de explicar con los elementos de este estudio. Ambas cepas provienen de cepas parentales distintas, y además poseen mutaciones en distintos genes (LVR01 es *aroC*- y deriva de P228067 y SL3261 es *aroA*- y deriva de la cepa 1344). Sin embargo ambos poseen una mutación en la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos. En la literatura se destaca la importancia de un conjunto proteínas asociadas al proceso de invasión, principalmente aquellas que determinan la adhesión y endocitosis (Adhesinas, Fimbrias, proteínas de la membrana externa, SST3 I) y las que modulan la supervivencia intracelular (SST3 I y II) [83]. Estas funciones dependen de la regulación coordinada de maquinaria inserta en la membrana externa de *Salmonella*, la cual se encuentra afectada en mutantes para los genes *aro*[84]. Quizás las diferencias entre LVR01 y SL3261 sean explicadas no solo por sus cepas parentales distintas, sino por

un efecto diferencial de la mutación en los genes *aro*, que afecte las funciones relacionadas con el proceso de invasión.

Debido a estas diferencias de invasividad, se decidió continuar la mayor parte de los estudios empleando LVR01. Con el objetivo de determinar si ocurría replicación intracelular tras la invasión de LVR01 a las células tumorales mamarias, se realizaron los plaques a las 2, 24 y 48hs (Figura 5.C). En las líneas celulares 4T1 y NMU la recuperación inicial a las 2 hs es de un 7% aproximado, y es similar pero más variable al cabo de 24hs. Ya para las 48hs la recuperación es mínima. Sin embargo para la línea de cáncer de mama humano MCF7, se nota un aumento notable de CFUs a las 24hs que decae a las 48hs, a niveles similares a los iniciales. Por otra parte, la línea J774A.1 presentaba niveles de captación/invasividad que cayeron abruptamente al cabo de 24 hs. Los niveles variables de recuperación a las 24hs y especialmente el incremento notorio de recuperación de CFUs en las MCF7 infectadas sugerían replicación bacteriana, a pesar de los declives observados a las 48hs. Este declive en la recuperación de CFUs en el ensayo de invasión, puede explicarse por la naturaleza del ensayo. En caso de que una célula infectada muera, la integridad de la membrana plasmática se verá comprometida y las bacterias internalizadas entrarán en contacto con el antibiótico gentamicina, perdiendo también su viabilidad en consecuencia y en última instancia no dando lugar a colonias en los plaques.

Las variantes GFP+ de LVR01 y SL3261 nos permitían revelar el ensayo de invasión mediante técnicas de citometría, que resultarían en información cuantitativa sobre el porcentaje de células 4T1 y NMU infectadas y la intensidad de GFP de las células infectadas. Desafortunadamente la fluorescencia de las pocas bacterias que invaden a las células tumorales, no es suficiente para separar definitivamente a las bacterias invadidas de las no invadidas. En el histograma de intensidad de GFP, las células sin infectar tomaron una distribución gaussiana (figura 5.D.I). Sobre la curva del histograma de GFP a las 2hs post invasión, se proyectó un sutil “hombro” que fue interpretado como el “pico GFP+”. Este “hombro” se extendió a las 24hs (figura 5.D.II) y se observaron picos menores esparcidos de células con alta intensidad de marcación (concordando con

la observación al microscopio de fluorescencia de células densamente infectadas, en figura 6.A). A las 48hs la intensidad media de fluorescencia se mantiene similar a la de las 24 pero la proporción de células GFP+ ha bajado drásticamente, posiblemente debido a la fragilidad de las células infectadas en avanzado estado de deterioro o ya destruidas (células a las 48hs en figura 6.A), que pueden no haber resistido el preparado de la muestra para la citometría, que incluye el tratamiento con tripsina y los numerosos lavados previo y post fijación con PFA. En resumen, los niveles de porcentaje de células infectadas así como de intensidad de fluorescencia fueron mayores para LVR01GFP que para SL3261GFP para casi todos los tiempos del ensayo, en los dos tipos celulares. El número de células infectadas decrece en función del tiempo sugiriendo algún proceso de muerte celular asociado a la infección. Sumado a esto se aprecia aumento en la intensidad de GFP (barras blancas en figura 5.C.II) a las 24hs y 48hs, indicativo de replicación bacteriana intracelular. Estos resultados nos permitieron aclarar que al cabo de 24hs ya ocurre replicación bacteriana intracelular y que el declive en la recuperación observado en la figura 5.C a este tiempo es solo un artefacto de técnica debido a las limitaciones del método de plaqueo. El declive progresivo del número de células infectadas en ausencia de nuevas invasiones, puede explicar la disminuida recuperación al cabo de 48hs en el experimento de invasión/replicación (figura 5.C). Esto implicaría que LVR01 tiene un potencial invasivo y replicativo que es capaz de iniciar un proceso que eventualmente lleva la muerte celular de la célula infectada.

Para comprobar esta hipótesis de que la LVR01 estaba induciendo la muerte celular en las células invadidas, se observaron al microscopio de fluorescencia cultivos infectados y llevaron a cabo tinciones vitales con yoduro de propidio sobre monocapas invadidas con LVR01 GFP. En la figura 6.A se aprecia como en las células infectadas al cabo de 2 hs, LVR01 se encontró de a pocas bacterias por célula y se posiciono en la periferia del núcleo. Ya al tiempo de 24hs se empezaron a observar células granuladas con intensa marcación verde, que se correspondían con un alta densidad de LVR01 citoplásmica. Algunas de estas células se encontraban completamente llenas de bacterias y se habían redondeado. A las 48hs, estas células completamente llenas de bacterias parecían estar

desintegrándose, liberando al entorno varias decenas de bacterias por célula infectada. La presencia continua de gentamicina durante el ensayo previene nuevos eventos de invasión, de esta manera podemos estar convencidos de que las células que contienen decenas o cientos de bacterias se desarrollan a partir de la replicación intracelular de unas pocas bacterias que sucede tras la invasión dentro de las primeras 24 hs.

Observando monocapas infectadas “vivas” incubadas con yoduro de propidio (figura 6.B), se pudo asociar los niveles altos de replicación con distintas alteraciones a nivel celular. Las alteraciones visibles provocadas por este grado de replicación en células tumorales mamarias (apreciadas en detalle en la figuras 6.B. I, II, III y IV) incluyen el redondeo de la célula y su desprendimiento/extrusión respecto a la monocapa y llevan a la inestabilidad de la célula incluyendo la pérdida de integridad de su membrana plasmática, lo que inevitablemente resulta en la muerte celular. En las observaciones en tiempo real de los cultivos infectados a tiempos de 12-16 hs, se constató el carácter móvil de las bacterias intracelulares en células densamente infectadas. Se observaron bacilos móviles limitados en su movimiento por los límites de la membrana plasmática celular. Este grado de movilidad a nivel intracelular indica el escape de la vesícula que contiene inicialmente a la *Salmonella* en las fases tempranas de la invasión, y también implica la presencia de flagelos funcionales. Según Knodler *et al.* [56] este es uno de dos posibles comportamientos replicativos adoptados por *Salmonella* en el interior celular. Unas se mantienen sobreviviendo en la vacuola, expresando los genes del SST3 II, sin expresión de flagelo, y replicando a bajas tasas, mientras otras escapan a la vacuola, comienzan a expresar los genes del SST3 I y el flagelo, y se movilizan por el citoplasma replicando aceleradamente. Estas *Salmonella* Typhimurium citoplasmáticas, son competentes para invadir nuevas células en este estado, en caso de que la célula que las contenga pierda su integridad y las libere. Este último comportamiento bacteriano (como demuestran los autores), se asocia con una muerte celular proinflamatoria, presentando alteraciones a nivel celular que abarcan: transformaciones a nivel de citoesqueleto incluyendo redondeo, hinchazón, falta de anclaje y extrusión, pérdida de integridad de membrana plasmática, degradación de ácidos nucleicos,

activación de caspasa-1 y liberación de IL-18. Excepto la activación de caspasa-1 y la liberación de IL-18 (que no fueron evaluadas), en el presente trabajo observamos todas las características mencionadas para este proceso de muerte celular inflamatoria inducida por *Salmonella* (la cual también presenta replicación citoplásmica elevada al cabo de 8-24hs y movilidad intracelular como en [56]). Cabe destacar que el detallado trabajo de Knodler *et al.* muestra el proceso para una *Salmonella* sin atenuaciones, sobre células de colon diferenciadas (tanto *in vitro* como *in vivo*) y sobre células tumorales humanas He-La. Nosotros en cambio mostramos este proceso sobre células tumorales epiteliales de origen mamario usando salmonelas atenuadas. Este comportamiento de replicación intracelular citoplasmática en células epiteliales se ha descubierto recientemente y posee diferencias respecto a lo que ocurre en el modelo de *salmonella* invadiendo macrófagos [56], [83]. Se postula que el entorno citoplásmico de un macrófago es tóxico para la salmonella y que la supervivencia en el entorno vacuolar es mediado por los SST3 II, sin embargo el citoplasma de una célula epitelial presenta un entorno enriquecido en nutrientes y menos agresivo para la bacteria [83]. Esto haría viable el escape desde la vesícula endocítica hacia el citoplasma de células epiteliales, con replicación bacteriana en un entorno favorable y la inducción de flagelos y los SST3 I [83]. La expresión del flagelo en estas bacterias permitiría una efectiva diseminación ante la ruptura de la membrana plasmática de la célula epitelial que la contiene, mientras que la expresión de SST3 I en estas bacterias las deja listas para invadir nuevas células [56]. Este podría ser un mecanismo importante para atacar a células tumorales *in vivo*, siendo la bacteria capaz de amplificarse con cada invasión, generando muerte celular e inflamación. Respecto a la línea celular de macrófago/monocito J774A.1, el marcado y temprano descenso de bacterias intracelulares en los ensayos de invasión (Figura 5.C) indicaba algún efecto más potente o de mayor rapidez que los que se asocian a la infección en las células tumorales mamarias. Los ensayos con yoduro de propidio revelados a las 12-16hs (figura 5.B.V y VI) mostraron una extensa muerte celular en el cultivo infectado. Las células con LVR01GFP (apreciadas en detalle en 6.B.VII y VIII) se encontraban profundamente deterioradas en su mayoría, presentando un aspecto vacuolizado o

granulado y se marcaban con yoduro de propidio, señalando la pérdida de la integridad de la membrana plasmática. A las 24hs los rastros de fluorescencia de GFP en las células infectadas había desaparecido en los macrófagos sobrevivientes observados (figura 5.B.IX y X), sin embargo (y al contrario de las J774A.1 sin infectar al mismo tiempo) se apreciaban pequeños focos citoplasmáticos de ADN, interpretables como residuos de ácidos nucleicos de las LVR01GFP degradadas en vacuolas fagocíticas o quizás provenientes del consumo del *debris* celular circundante. Este tipo de muerte más acelerada en la línea J774A.1, es concordante con una activación rápida del inflamósoma capaz de desencadenar pyroptosis, típicamente vista en macrófagos infectados con *Salmonella* [55]. Este tipo de respuesta inflamatoria ha demostrado tener un rol importante en la defensa del hospedero en las infecciones con *Salmonella* (sin atenuar)[52], sin embargo el posible rol de la pyroptosis como factor pro inflamatorio/inmunoterapéutico en terapia contra el cáncer es desconocido. Un aspecto intrigante es si *Salmonella* es capaz de inducir pyroptosis en los macrófagos M2, típicamente asociados con la progresión del cáncer y su estado inmunosupresor. Un estudio del 2007 [85] en un modelo infeccioso de *Salmonella* demuestra la capacidad de esta para inyectar sus proteínas a través de sus SST3 a distintos tipos celulares presentes en el bazo de los animales, incluyendo macrófagos, neutrófilos, monocitos y linfocitos T y B. En el mismo trabajo se detectan salmonelas intracelulares en diversas células mieloides y también en linfocitos sin capacidad fagocítica. No se ha explorado si en un entorno tumoral *Salmonella* ejerce un efecto diferencial sobre células efectoras del sistema inmune respecto a las células inmunosupresoras. La eliminación de los macrófagos M2 (u otras células inmunosupresoras, como las MDSCs), acompañadas de señales pro inflamatorias constituye un posible mecanismo de acción de salmonelas atenuadas que retienen su capacidad invasiva.

Con el interés de profundizar en el comportamiento invasivo/replicativo de LVR01GFP en células tumorales, se procedió a preparar especímenes de alta calidad óptica (montados en vidrio) para su observación en microscopia confocal. Se realizó un ensayo de invasión sobre células 4T1 y NMU que fue revelado a las 2hs, 12hs 24hs y 48hs (figura 7). La invasión

en estas muestras fue realizada sobre cubres, los cuales fueron sometidos a una tinción con Faloidina y DAPI que permitió visualizar a la bacteria en conjunción con el citoesqueleto de F-actina (que permite distinguir los bordes celulares) y el ADN. La calidad de las tinciones permitió la correcta visualización de los preparados en el microscopio confocal. De estas sesiones se obtuvieron Z –stacks (apilamientos tridimensionales de planos XY sobre el eje Z) de campos al azar para los distintos tiempos ensayados. Esta técnica nos permitió confirmar el carácter intracelular de la invasión/replicación de LVR01 (cortes ortogonales en figura 7.A.I y reconstrucción 3D en 7.A.II), así como la observación del deterioro de la célula infectada en mayor detalle (figura 7.B). La ubicación intracelular de *Salmonella* fue citoplásmica y frecuentemente perinuclear (figura 7.A.I y 7.A.II). Este posicionamiento intracelular a las de *Salmonella* a las 1-2hs post invasión ya ha sido reportado, y es consecuencia de la manipulación del citoesqueleto y el transito vesicular que induce la bacteria como parte del proceso invasivo [54][83]. La técnica empleada en nuestro trabajo no permitía saber si LVR01 se encontraba dentro de una vacuola o si estaba libre en el citoplasma, para responder esa pregunta se debería incluir una tinción contra LAMP-1 que es un marcador de las vesículas que contienen a *Salmonella* (y de vesículas lisosomales también). Cuando analizamos la proporción de células 4T1 y NMU infectadas a distintos tiempos post invasión (Figura 7.C), se vio que esta fue decreciendo en función del tiempo (líneas continuas en 7.C.I y 7.C.II), mientras el conteo de bacterias intracelulares por célula infectada fue en franco ascenso (líneas discontinuas en 7.C.I y 7.C.II). Al tiempo de 12hs ya se observan células con una alta densidad bacteriana intracelular (figuras 7.C.II y 7.C.IV), pero estas representan una proporción baja del total de células infectadas en este tiempo. Dicha diferencia de estados de replicación bacteriana intracelular entre células de un mismo tiempo de invasión, sugiere que no todos los eventos de invasión se suceden de una misma cinética de replicación, en línea con los picos menores observados en los experimentos de invasión/replicación por citometría (figura 5.C.I) y los resultados ya comentados de Knodler *et al.* [56]. A las 24hs más de la mitad de las células infectadas son portadoras de decenas de salmonelas, aumentando notoriamente la proporción de células densamente

infectadas. Ya para las 48hs el número de células infectadas ha bajado drásticamente (en línea con los resultados de citometría y plaqueos que se muestran en la figura 5). Esta descripción es válida para los ambos tipos celulares ensayados (4T1 y NMU), observándose solo diferencias menores entre ellos. La colección de imágenes obtenidas evidencio un conjunto de alteraciones que fueron observadas previamente en el microscopio de epifluorescencia, como el redondeo y el desprendimiento de la monocapas, así como otros apreciados en mayor detalle bajo el microscopio confocal que incluían alteraciones en cromatina y/o desaparición de núcleo, la distorsión del citoesqueleto celular. Este tipo de alteraciones en las células infectadas fue coherente con el tipo de muerte descrita en Knodler *et al.*[56] que ya fue discutido anteriormente. La existencia de una proporción de células infectadas con decenas o cientos de bacterias a tiempos tempranos 8-12hs, que se incrementan y después desaparecen, sugieren una cinética rápida que se asocia con la muerte celular. Ensayos que permitan seguir un cultivo infectado en condiciones estables de temperatura y CO₂, posibilitarían la medición de cinéticas de replicación a nivel individual, que confirmen que esta hipótesis.

En la figura 19 se esquematiza una hipótesis, en función de los resultados obtenidos sobre la biología *in vitro* de la invasión de LVR01 a células tumorales mamarias y macrofágicas.

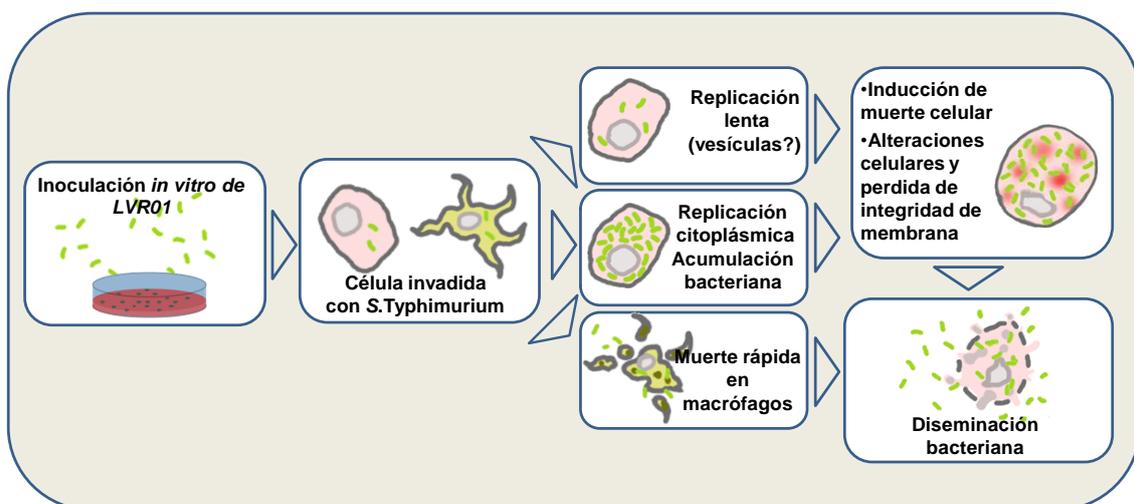


Figura 19. Efectos *in vitro* de LVR01 sobre células en cultivo. Se resume el espectro de hallazgos sobre la biología *in vitro* de LVR01 en células tumorales mamarias y macrófagos. Las bacterias que invaden a

una célula eucariota pueden replicar lentamente, o acumularse citoplasmáticamente en unas pocas horas. Según el tipo celular, LVR01 puede inducir una muerte que puede llegar en cuestión de algunas pocas hs o recién después de las 24hs. Típicamente se observa un deterioro celular asociado a la infección intracelular, que resulta últimamente en la ruptura de la integridad de la membrana celular y la diseminación bacteriana.

La administración de *Salmonella* a animales portadores de tumores resulta en una biodistribución preferencial por los tumores a tasas de acumulación (CFU/g) de aproximadamente 1000-100 a 1 respecto a otros tejidos como el bazo, hígado y pulmón (figura 10.A.I), confirmando la especificidad encontrada en otros estudios [64][65][66]. Todas las vías proporcionan una alta tasa de acumulación de bacterias en el tumor, que mantiene niveles similares de CFU/g a lo largo del estudio (figura 10.A.I), mientras el tumor sigue creciendo, indicando que existe replicación intratumoral. De estas vías, la vía intratumoral se asocia con una mayor replicación bacteriana intratumoral en función del tiempo y con una menor presencia en otros órganos (figura 10.A.I), convirtiéndose en la más selectiva de las rutas. Posiblemente esta vía constituya una alternativa más conveniente de administración mientras el tumor está presente, y en caso de realizar cirugías, las otras vías permiten una mayor llegada a órganos periféricos que hacen plausible el tratamiento contra metástasis. A partir del tropismo observado de LVR01 es difícil saber si la capacidad metastásica del modelo está contribuyendo a la variación de valores de CFUs en los órganos, especialmente en pulmón. Sería interesante examinar la distribución de LVR01 en animales con carga metastásica pulmonar elevada y ver si las metástasis pulmonares también ofician de sitios preferenciales de biodistribución de LVR01. Para eso deberíamos saber si el “*homing*” de LVR01 es comparable en tumores sólidos desarrollados y en metástasis de distinto grado de desarrollo. Esta es una pregunta compleja que depende de factores como el modelo de tumor, sitio de metástasis, el tamaño de la misma, si presenta una zona hipóxica, y la vía de administración. Como referencia, ya se ha demostrado la capacidad para alcanzar tejidos metastásicos por STAs [70][86]. En un trabajo de Ganai *et al.*[53] se muestra a una STA administrada sistémicamente colonizando lesiones metastásicas pequeñas en pulmón preferentemente respecto al tejido sano circundante. En un ensayo preliminar, se demostró la presencia de LVR01 en “pequeñas” cantidades

en los pulmones de ratones a los cuales se les administro esta bacteria vía IP a ratones portadores de tumor 4T1. De hecho, considerando el tiempo post administración de LVR01, el tamaño de un pulmón, el espesor del corte histológico y la densidad bacteriana pulmonar por plaqueo en el grupo IP, deberíamos encontrar un rango de una decena de LVR01 por corte (que fue efectivamente lo que encontramos a las 72hs en el ensayo preliminar). En este caso la técnica de microscopia de fluorescencia empleada, y los tiempos tempranos en términos de desarrollo de metástasis pulmonares no permitió apreciar si se co-localizaban con sitios metastásicos. Continuando con los estudios de biodistribución, esta se examino en ratones con enfermedad residual metastásica. En los ratones con el tumor primario extirpado se evaluó la distribución de LVR01 en bazo, hígado y pulmón tras la administración sistémica, por vía IP o IV (Figura 10.B). En primer lugar ambas vías mostraron perfiles similares, siendo la IP más adecuada para colonizar bazo e IV para los pulmón e hígado. Los niveles de concentración bacteriana en estos sitios es similar a la de los ratones portadores de tumores a los 2 días post administración, pero con el tiempo bajan gradualmente varios órdenes de magnitud (figura 10.B.I). Comparando con los animales con tumor del ensayo anterior, los niveles de LVR01 presentes en pulmón, hígado y bazo son similares a los 2 días entre los animales sin tumor y con tumor (figura 10.A.I vs 10.B.I). Sin embargo recuperación total de salmonelas por animal (figuras 10.A.II y 10.B.II) se recuperan en un numero mucho menor en animales sometidos a cirugía (un 2-25% del total inyectado al día 2 post inoculación, comparado con 100-300% en animales con tumor), y este decae drásticamente en función del tiempo. De esta comparación, parece que el tumor actuaría de “esponja captadora” de salmonelas, y la falta del mismo resulta en un numero disminuido de bacterias que son eliminados eficientemente de los órganos. A favor de esta hipótesis, se ha publicado que los entornos tumorales (con un alto y desorganizado grado de vascularización) atrapan pasivamente, a las bacterias que llegan al sitio [66]. En caso de que las samonelas recirculen entre el tumor y la periferia, también sería posible que el tumor actuara de reservorio de bacterias, redistribuyéndolas a sitios periféricos. En contra de la hipótesis de recirculación de *Salmonella* un trabajo [70] muestra la incapacidad de esta

bacteria colonizar un nuevo tumor a partir de otro que ya presentaba bacterias, mientras que resultados preliminares de un experimento homologo en nuestro laboratorio tampoco encontraron este tipo de colonización trans-tumoral. En cualquier caso, las distintas vías por las que se administro LVR01 logran llegar a todos los tejidos estudiados, pero si aparecen metástasis en nuevos sitios no colonizados por *Salmonella*, la repetición de las dosis podría favorecer la localización de la bacteria a estos sitios (sobre todo teniendo en cuenta la marcada disminución de presencia bacteriana de los sitios periféricos en ausencia del tumor). Otra explicación posible al impacto que tiene la presencia del tumor en la captación y eliminación bacteriana, puede relacionarse con el aspecto inmunológico. La inmunosupresión que genera el modelo 4T1 [87][88](Alto número de MDSCs en Tumor y Bazo, entre otros factores) podría estar impidiendo parcialmente la eliminación de bacterias en el reservorio preferencial (tumor) y en los órganos periféricos, pero cuando el tumor primario es removido, los mecanismos de eliminación funcionarían correctamente en los órganos periféricos. La biodistribución preferencial de *Salmonella* LVR01 en sitios tumorales y la capacidad de llegar a órganos susceptibles de metástasis hace plausible el uso de esta cepa como agente de terapia génica antitumoral. La expresión de estos genes en el microambiente tumoral, puede conseguirse directamente a través de la expresión procariota por parte de la bacteria (pudiéndose valer de promotores inducibles en el entorno tumoral [89]), o mediante un mecanismo conocido como bacto-fección, que consiste en el traspaso de material genético de la bacteria a una célula eucariota, que permitiría la expresión controlada desde la célula eucariota transfectada (implicando promotores eucariotas, código genético, modificaciones post traduccionales, etc) [45][90]. Si se quisiera usar LVR01 como agente de bacto-fección, se tendría que evaluar el conflicto entre su capacidad de invadir las células eucariotas y su capacidad para destruirlas, y si esos tiempos son compatibles con la transferencia del transgén al núcleo y su expresión eucariota. LVR01 posee la habilidad de invadir células tumorales en cultivo, pero parece inducir una muerte celular en un tiempo cercano a las 8-24hs. Ese tiempo puede no ser suficiente para una eficaz expresión de un transgén terapéutico desde una célula infectada. Después de que la

célula es invadida por la bacteria, se necesita el escape de esta última de la vacuola que la contiene (LVR01 puede alcanzar citoplasma), y que salmonella libere al ADN plasmídico que llevaría el transgén, y que este llegue al núcleo, para poder iniciar la expresión génica desde control eucariota[91]. La actividad intrínseca antitumoral podría estar en conflicto con su potencial terapéutico (en el mecanismo de bacto-fección) La inducción temprana de muerte celular puede interferir con la intención de expresar el transgén desde la célula eucariota. La otra opción para usar LVR01 como agente de terapia génica, podría residir en lograr la expresión del transgén desde la propia bacteria. De esta manera el espectro de proteínas terapéuticas potenciales se ve reducido por la ausencia de modificaciones postraduccionales, pero compensado por la independencia de la invasión y los procesos de inducción de muerte a la hora de expresar el gen. El uso de promotores inducibles que respondan al ambiente (hipoxia, pH, etc) o a una señal externa (drogas) puede ayudar a concentrar el efecto terapéutico donde y cuando es necesario. Por otra parte la exteriorización de los mediadores terapéuticos desde el citoplasma bacteriano, puede ser alcanzada usando las vías de secreción de la propia bacteria o simplemente dejar que se libere ante la ocasionalidad de la muerte de la bacteria en el entorno tumoral.

Para observar la distribución que adoptaban las bacterias dentro del tumor, se aplicaron técnicas de microscopía de fluorescencia sobre cortes hechos a partir de tumores criopreservados en OCT. La administración intratumoral de bacterias resultó en una distribución a las 24hs con bacterias en la región central sobre la herida infligida por la aguja (figura 11.A.I) y sobre algunas zonas del borde externo del tumor (figura 11.A.II). Esta distribución posiblemente responda al recorrido del líquido inyectado a través de la punción de este tumor sólido. Durante las inyecciones intratumorales se realizaba primero un canal de inyección por el centro del tumor y después se inyectaba el inóculo. El líquido inyectado vencía la resistencia del tejido tumoral a pura presión, posiblemente generando una lesión local en el tumor sólido (región mostrada en 11.A.I y 14.A) y generando un escape de líquido del interior a la periferia tumoral (11.A.II y 14.B) que queda contenido por la membrana que recubre al tumor (corroborado por experimentos inyección intratumoral en tumores

aislados). Por otro lado la distribución de LVR01 adoptada tras la administración intraperitoneal, también muestran colonización bacteriana de zonas periféricas (figura 11.B.I) y centrales (figura 11.B.II). Ya a las 72hs de la administración intratumoral, las zonas donde encontramos LVR01 en abundancia (figura 12.C y D), aparecen afectadas y desorganizadas en comparación con las zonas que no presentan alta densidad de LVR01 (figura 12.B) o zonas del tumor que no portan bacteria (figura 12.A). En sitios como el que se muestra en la figura 12.D, se encuentra una abundante presencia bacteriana y las formas celulares se ven poco definidas, con el ADN formando núcleos, o fragmentos de los mismos (posiblemente representando una zona necrótica). Esta asociación de LVR01 y deterioro en la estructura del tejido tumoral podría ser un indicio temprano de la capacidad antitumoral de esta bacteria. A las 24hs ya se detectan figuras reminiscentes de la replicación bacteriana intracelular en las zonas que presentan *Salmonella* (figura 13.A), aunque estas también se presentan dispersas entre las células sin ningún patrón de agrupación en particular (figura 13.A.I). La observación de las morfologías nucleares en la cercanía de LVR01, permitió apreciar infiltrados mieloides, con núcleos característicos de granulocitos (figura 13.B.II). Para corroborar esta última observación, se realizaron tinciones que permitan ver la presencia de granulocitos, empleando un anticuerpo contra Gr1 (figura 14). En estas zonas se encontraba una mayor densidad de células Gr1+ (figura 14.A y B) que en zonas libres de salmonella (figura 14.C.I y C.II). La elevada cantidad de células GR1+ en proximidad de la LVR01, pueden responder a una infiltración de neutrófilos (como durante la respuesta inmune inducida por *Salmonella* WT) o capaz a una redistribución de las MDSCs presentes en el tumor. Estos dos tipos celulares, aunque tienen inmunofenotipos distintos, son muy similares antigénicamente, y la distinción usualmente se hace en base a ensayos funcionales de fracciones enriquecidas [24]. El efecto de la administración de STAs sobre las MDSCs (tanto in vivo como in vitro) no se ha estudiado específicamente, sin embargo está bien estudiado el reclutamiento de neutrófilos a sitios infectados con *S.Typhimurium*, tanto en modelos de la enfermedad infecciosa [52] como en modelos tumorales [92] (aunque en estos últimos no se han hecho estudios específicos que consideren la diferencia entre neutrófilos y

MDSCs). El alcance de las bacterias a zonas externas e internas del tumor, la desorganización tisular tumoral asociada a la infección, las formas replicativas de *Salmonella* encontradas, y el reclutamiento de células GR1+, podrían influir en el efecto terapéutico de LVR01.

Para probar los efectos de la administración de LVR01 en animales portadores de tumores, primero se estableció en el laboratorio el modelo de cáncer de mama murino 4T1 ortotópico. En este modelo el tumor se desarrolla en la almohadilla de grasa de la glándula mamaria, y desde ese lugar proyecta sus metástasis a distintos órganos, incluyendo ganglios, pulmones hígado y bazo[82]. Este modelo es conocido por desarrollar una elevada infiltración de MDSCs en tumor y bazo, que mantienen el estado de inmunosupresión asociado y dificultan las inmunoterapias antitumorales[87][82][88][93]. La tasa de desarrollo de tumores fue del 100% tras la inyección intramamaria de 70000 células 4T1, y el crecimiento tumoral fue relativamente homogéneo al alcanzar el día 10-15 post inyección. Comprobamos que ya para el día 10 post inyección se encontraban células metastásicas en los pulmones de los animales. Al día 15 todos los animales tenían metástasis pulmonares en el rango de 50-5000 células metastásicas por pulmón. Los datos obtenidos concuerdan con lo reportado en la bibliografía [82][94]. Se llevaron a cabo cirugías de remoción del tumor primario y ganglio drenante (inguinal, muy cercano al tumor y a veces en contacto con él) para presentar un escenario “clínico” más relevante y establecer la importancia de las metástasis en el desenlace de la enfermedad. Cuando los ratones recibieron cirugía al día 16, el 100% de los ratones moría de enfermedad metastásica (principalmente pulmonar) a los 40-60 días, similar al grupo de ratones portadores de tumor a los que no se les realizó cirugía (Figura 16.B). La observación de que los ratones que fueron intervenidos quirúrgicamente poseían una sobrevida similar a la de los ratones portadores de tumores, sugerían que la enfermedad metastásica era el principal determinante en la expectativa de vida de los ratones.

Para evaluar el efecto de la administración de *Salmonella* como agente antitumoral, se administro LVR01 a ratones portadores de tumores. El

efecto de una dosis IT sobre el crecimiento tumoral fue como mucho moderado o leve, marcando una tendencia a menores tamaños a tiempos tardíos (día 31 en figura 16.A), pero no llega a ser estadísticamente significativo. Se crearon distintos grupos de tratamiento, en ratones con y sin cirugía y con una o varias dosis de LVR01 (figura 15). Cuando se realizó solo la cirugía o una dosis intratumoral, el efecto en la supervivencia fue mínimo o indistinguible estadísticamente respecto a los animales control que portaban tumor (figura 16.B). El efecto fue significativo sobre la supervivencia de los animales solo cuando se administró LVR01 en más de una dosis antes (IT) y después de la cirugía (IV). En el caso de la triple dosis de LVR01 con cirugía (grupo LVR01IT2CIV, con línea gris discontinua en figura 16.B) se reportaron los retrasos más prolongados en la muerte de los ratones e incluso los únicos sobrevivientes de los grupos de tratamiento, sobreviviendo un aproximado 35% de los ratones. Posiblemente la intervención con bacterias en esta ventana temporal de tratamiento es capaz de iniciar el ataque a las células del tumor primario. Tras la remoción del primario, la dosis intravenosa puede llegar a los pulmones, haciéndose cargo de la eliminación de las metástasis pulmonares mientras todavía no representan una carga severa. Como en otros trabajos, la repetición de las dosis de bacteria parece potenciar el efecto terapéutico [78][71]. En un estudio publicado por Avogadri *et al.*[78], se empleó el modelo de melanoma murino B16F10 y se administró la cepa SL3261 en dos variantes: una sin modificar y una variante no invasiva de la misma. Los ensayos de biodistribución a nivel histológico de los tumores, muestran a la SL3261 invasiva dentro de las células tumorales, mientras que la SL3261 no invasiva solo es captada por células fagocíticas. Los resultados con experimentos *in vitro* sugieren que las células tumorales que son invadidas por SL3261, presentan antígenos bacterianos en su superficie, siendo reconocidos como células infectadas y desencadenando su eliminación por células T citotóxicas. La vacunación empleando células dendríticas infectadas con SL3261 en animales portadores de tumor, seguidas de su posterior administración intratumoral de SL3261 invasiva, resultó en una respuesta antitumoral aumentada que logró la eliminación de los tumores en un 50-100% de los ratones tratados. Estos ratones presentaron una infiltración aumentada de células mieloides y linfoides, y

un aumento de células que reconocen un antígeno asociado al tumor. Un 75% de los ratones curados rechazaron la implantación de un nuevo tumor, implicando la generación de una memoria inmunológica contra el melanoma. Teniendo como base estos estudios y el mayor potencial invasivo de LVR01 (del cual dependen estos mecanismos) , pensamos que esta respuesta antimetastásica completa en algunos de los animales tratados del grupo LVR01 IT2CIV , podría deberse a un efecto combinado entre la toxicidad antitumoral intrínseca de salmonella y la estimulación de una respuesta inmune. Un mecanismo posible es que las primeras inyecciones permitan montar las fases iniciales de una respuesta antitumoral por toxicidad directa [73] o dotación antigénica por parte de bacterias que invaden el tumor[78]. Con el paso de los días, tras la cirugía y la administración sistémica de LVR01, algunos ratones podrían desarrollar una respuesta inmune adaptativa madura que reaccione contra las células metastásicas infectadas (y dotadas antigénicamente), marcándolas para su destrucción por el sistema inmune. En este proceso sería plausible que la destrucción inicial de células tumorales metastásicas por actividad intrínseca de LVR01 o dotación antigénica, consiga la expansión del repertorio de epítopes asociados al tumor atacados por los efectores del sistema inmune [95].

Para comprender de mejor manera el rol del sistema inmune en este modelo, se realizaron experimentos que evaluaron la respuesta humoral, así como el grado de expresión de citoquinas en sangre y el tipo de células presentes en tumor y ganglio. Los leucocitos presentes en los tumores representaban un porcentaje importante de las células totales, alcanzando un 40%-60% (descartando el abundante debris celular encontrado en los tumores), mientras que en los ganglios drenantes prácticamente el 100% eran leucocitos (con escaso debris celular). Respecto a este porcentaje de leucocitos se relativizó el resto de los tipos celulares reportados en la figura 18.A.I y 18.A.II. En el caso de los tumores tratados con LVR01 IT (figura 18.A.I), se apreciaba una disminución de macrófagos y un aumento en la cantidad de neutrófilos/MDSCs. En el grupo LVR01 IT X 2, también se apreció una tendencia a un mayor número de neutrófilos/MDSCs, de células NK y células dendríticas, que fue acompañada de un descenso de macrófagos aun más marcado que para el grupo LVR01 IT. El aumento de

los neutrófilos/MDSCs, se corresponde con la observación de los cortes histológicos en donde se asocia la presencia de LVR01 a células GR1+, y también con reportes de reclutamientos de neutrófilos en otros modelos de inmunoterapias antitumorales basadas en *Salmonella* [96][78]. En los ganglios (figura 18.A.II) tanto del grupo PBS en los que recibieron *Salmonella* casi no se detectaron neutrófilos/MDSCs, a pesar de que las MDSCs son inducidas por el modelo tumoral, y los neutrófilos son reclutados a los sitios donde hay respuestas inmunes contra *Salmonella*. En experimentos previos, si se pudo constatar el elevado porcentaje de células GR1+ CD11b+ en bazos de animales portadores de tumores 4T1 sin tratar. La disminución de células F4/80+ CD11b+ (macrófagos) en el tumor de animales tratados con LVR01 (figura 18.A.I) podría deberse a la inducción de muerte celular por apoptosis/pyroptosis como se observó in vitro para la línea J774A.1 o por la activación mediada por PAMPs y la consecuente migración hacia el ganglio de estas células. Esta última hipótesis se ve apoyada por el aumento de macrófagos hallados en los ganglios de los animales tratados con LVR01 IT respecto a los controles (figura 18.A.I y II). Sin embargo el grupo LVR01 IT X 2 que recibe dos dosis de *Salmonella* en 6 días, reporta niveles bajos de macrófagos en tumor que no se corresponden con un aumento en las células encontradas en el ganglio, por lo que este hallazgo apoya la hipótesis de LVR01 como agente tóxico para macrófagos. Las células de línea linfocítica presentan oscilaciones a nivel de tumor que no marcan tendencias claras (excepto las ya mencionadas NK), sin embargo en ganglio el grupo LVR01 IT X 2 reporta un nivel significativamente menor de linfocitos B y un aumento de linfocitos T (en particular CD8, importantes en respuestas antitumorales) respecto a los otros grupos. El aumento de linfocitos T podría explicarse por activación y proliferación de este conjunto de células. Sin embargo la bajada en linfocitos B podría responder simplemente a que este grupo no prolifera de igual manera en términos relativos, o a una disminución efectiva de los niveles de estas células. Una posibilidad es que CD19 se exprese en menor cantidad tras la activación de estas células (y no podamos detectarlas), o que también exista una inducción de muerte celular de la célula B en presencia de *Salmonella*. El grupo de tratamiento LVR01 IT X 2 también alcanza los mayores niveles de células dendríticas en

ganglio. Con la intención de relacionar la supervivencia de los ratones del grupo LVR01 IT2CIRIV y los resultados de esta citometría (grupo LVR01 IT X 2), se busco correlación entre los niveles de células inmunes de los ratones sobrevivientes analizados (n=2) y los no sobrevivientes (n=2) la única coincidencia/tendencia fue que los sobrevivientes tenían ambos un nivel menor de macrófagos que los no sobrevivientes. Esta ventana temporal de eventos tempranos asociados al tratamiento con LVR01, muestra movilización en el tumor de células relacionadas con el sistema inmune innato (neutrófilos, macrófagos, dendríticas y NK), capaces de reaccionar ante la presencia de *Salmonella*, que son potenciales productoras de citoquinas inductoras importantes (por ejemplo: IL-12, TNF- α , IL-1B, IL-18, IFN- γ) en la inducción de inmunidad antitumoral. También se asocia al tratamiento con doble dosis alteraciones en niveles de células B y T posiblemente implicadas en el desarrollo de respuestas inmunes adaptativas.

En el transcurso de una respuesta inmune antitumoral, es comúnmente aceptado que la inmunidad del tipo I posee los mecanismos efectores más eficientes para combatir esta enfermedad. Esta rama de la inmunidad se encarga de eliminar parásitos intracelulares y células defectuosas. La célula más potente para estimular este tipo de respuestas es el Linfocito T CD4 “Th1”, que se caracteriza principalmente por su producción de IFN- γ ante la suma de estímulos apropiados, entre los que se incluyen la producción de IL-12 e IL-18 por células mieloides [97][98]. El IFN- γ es crucial en la activación de macrófagos, y la potenciación/activación de los mecanismos citotóxicos de las NK y células T CD8 [99]. Para averiguar si el IFN- γ juega un rol en este tratamiento, se realizaron ELISAs de captura de esta citoquina a partir de muestras de sueros obtenidos a lo largo del tratamiento con una dosis de LVR01 IT (figura 18.B). Los niveles de IFN- γ en el grupo control que recibió PBS y cirugía fueron ínfimos a lo largo del ensayo, en cambio se observo una respuesta rápida a las 24hs post inyección de LVR01 (grupos LVR01X3 y LVR01X1). Este pico inicial de IFN- γ posiblemente sea generado por células NK, NKT y T- $\gamma\delta$, que poseen un tiempo de reacción rápida, pero no los niveles de producción célula “Th1” [100][101] A los 11 días después de la administración de LVR01, se

registro una baja en la concentración de IFN- γ en los ratones tratados (día 25 en figura 18.B). La respuesta en los ratones tratados con LVR01 no fue homogénea, con algunos presentando niveles elevados de IFN- γ al día 25 (sob LVR01X3 y LVR01X1) y otros con niveles bajos o indetectables (no sob LVR01X3). A pesar de que es tentador asociar la supervivencia con mayores niveles de IFN- γ dentro del grupo LVR01X3, la existencia de niveles similares de esta citoquina en los ratones del grupo LVR01X1 (que ninguno sobrevivió) complica las posibles conclusiones a sacar. Quizás los niveles iniciales de respuesta por IFN- γ solo son importantes desde el punto de vista terapéutico cuando se refuerza el tratamiento con mas dosis de LVR01. Al irse desarrollando la respuesta contra las metástasis tumorales y/o LVR01, existe tiempo suficiente para el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa. Probablemente el IFN- γ que encontramos al día 25 se haya secretado por células “Th1” específicas contra el tumor o la bacteria. Para confirmar el rol de las células productoras de IFN- γ , se podrían extraer leucocitos de tumor, bazo, ganglio o sangre de animales tratados y exponerlas a antígenos tumorales y bacterianos, y medir la producción/secreción *ex vivo* de citoquinas por estas células. Experimentos de detección de citoquinas intracelulares permitirían asociar los distintos tipos de linfocitos a los niveles variables de producción de IFN- γ .

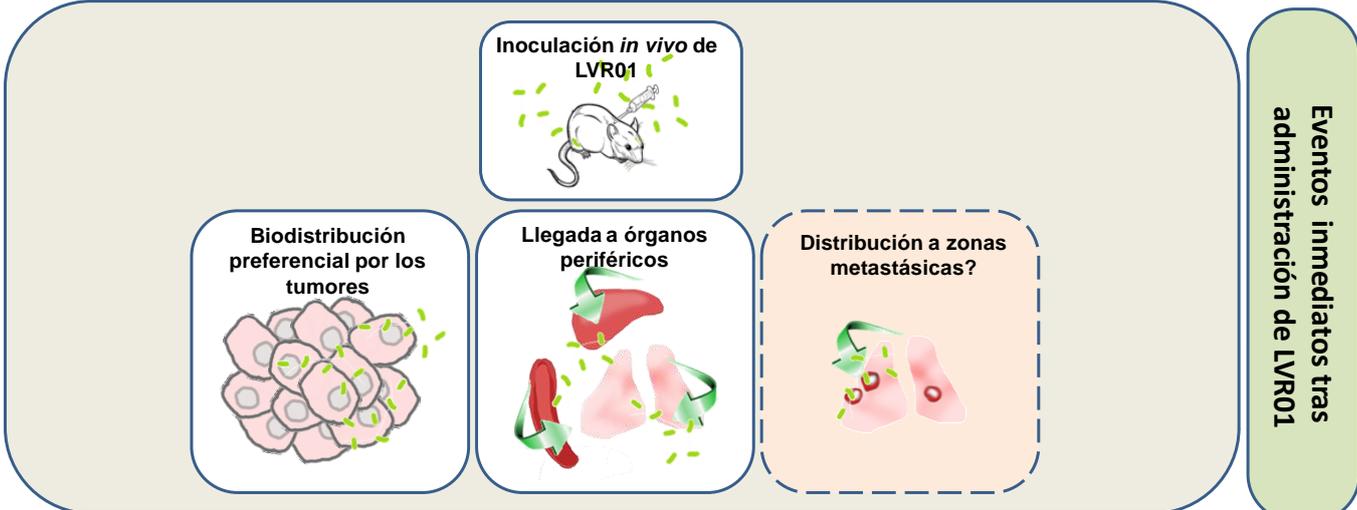
La respuesta humoral contra antígenos tumorales de 4T1, se analizo incubando a los sueros de los animales tratados ante un extracto de células 4T1 y revelando el grado de asociación de los anticuerpos IgG presentes en suero por técnica de ELISA (figura 18.C). Como el nivel de IgG se puede emplear como marcador de respuesta inmunitaria humoral adaptativa, se busco un tiempo de respuesta al tratamiento que fuera suficiente para observar esa maduración, aunque también se ensayaron otros tiempos como control. La respuesta humoral contra 4T1 de un ratón portador de tumor que solo recibió PBS y cirugía fue la más baja y era equivalente a la de un ratón naive. La administración de LVR01 parece elevar los niveles de IgG a un nivel mayor en los no sobrevivientes del grupo LVR01X3 que en los sobrevivientes, aludiendo a la ineficacia de este tipo de respuesta en este tratamiento (a los niveles observados, y sin

información de la relevancia de los antígenos reconocidos por estos sueros). Sin embargo la presencia de IgGs específicas contra 4T1 en el grupo LVR01X1 se sitúa al mismo nivel “bajo” de los supervivientes del grupo LVR01X3, con dos desenlaces distintos. Aunque este ensayo no permita establecer el impacto terapéutico de los anticuerpos que encontramos, si nos permite confirmar que la respuesta inmune humoral es estimulada en animales que reciben LVR01. La importancia de la respuesta por anticuerpos en cáncer es un tema debatido, pero se suponen capaces de dirigir a los linfocitos NK para inducir la muerte de células tumorales cubiertas de anticuerpos en un proceso llamado “citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos”, así como opsonizarlas las células tumorales induciendo su fagocitación por macrófagos[102][103]. Los anticuerpos también pueden montar respuestas mediadas por complemento contra las células tumorales, llevando por un lado a un mayor grado de inflamación local y la formación de poros que desestabilizan la célula tumoral [104].

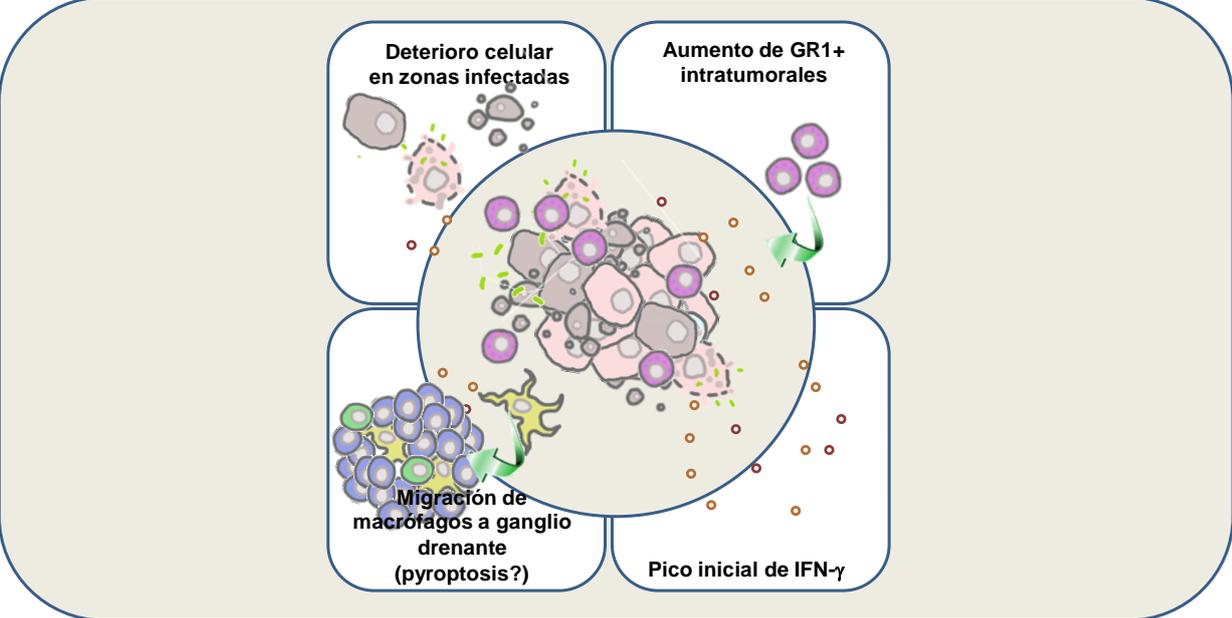
Los resultados que se desprenden a partir de una sola estimulación con LVR01 indican que existe una activación de la respuesta inmune, a nivel celular, anticuerpos y citoquinas. Sin embargo como muestra el ensayo de supervivencia, es importante aumentar el número de dosis para favorecer respuestas anticancerígenas más eficaces (Al igual que en otro modelo de terapia bacteriana contra el cáncer[78]). Los datos de IFN- γ al día 25 de los ratones que recibieron la triple dosis de LVR01 (figura 18.B), y los de la supervivencia del grupo que recibió tres dosis de LVR01 y cirugía (grupo LVR01 IT2CIV en figura 16.B), nos muestran subgrupos de ratones que responden al tratamiento mejor que otros. Al tratar de establecer una correlación entre las variables estudiadas relevantes para la inmunidad antitumoral en este modelo, se encuentra un panorama complejo para el armado de hipótesis explicativas. A nivel de coincidencias entre grupos, la citometría hecha el día 16 (figura.18.A) a nivel de ganglio arroja un descenso significativo de un 10% aproximado en los niveles de linfocitos B en el grupo LVR01 IT X 2, que quizás explique menor presencia de anticuerpos IgG a mediano plazo en el día 25 como se ve en los supervivientes del grupo LVR01X3 (Figura 18.C, mismos ratones con una dosis más de LVR01 IV). Por otro lado la mayor concentración de IFN- γ en

sueros de los animales que reciben el triple tratamiento de LVR01 podría estar asociada con una potenciación de los mecanismos de la inmunidad celular asociada a Th1. Coincidentemente el grupo LVR01 IT X 2 en la citometría (figura 18.A) presenta niveles elevados de células asociadas a esta rama efectora del sistema inmune, como lo son los linfocitos NK+ (en tumor) y CD8+ (en ganglio). Para confirmar que esta coincidencia entre aumento de estos tipos celulares y el aumento de esta citoquina insignia de la inmunidad Th1 (IFN- γ) es parte de un sesgo en la activación de la respuesta inmune, se deberían contemplar la producción de citoquinas intracelulares (IFN- γ , IL-4, IL-17, IL-10, principalmente) en los distintos grupos de tratamiento y tipos celulares.

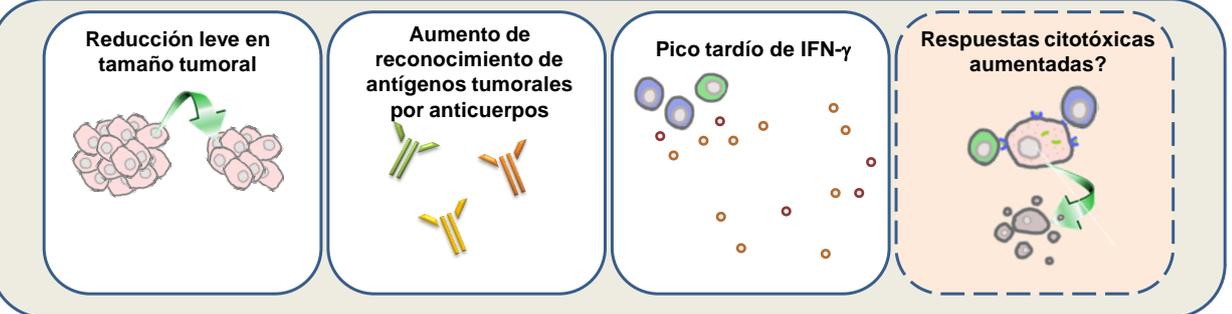
Se plantea un escenario posible en el cual se genera una respuesta inmune innata inicial, que incluye movilización de leucocitos y pico inicial de IFN- γ . Este tratamiento da lugar eventualmente a una respuesta adaptativa, con un mantenimiento de la producción de IFN- γ y una respuesta por anticuerpos IgG aumentada, (y reducción en tamaños tumorales en aquellos animales no sometidos a cirugía). En la figura 20 se recapitulan los resultados obtenidos de los experimentos in vivo, integrándolos en un diagrama con hipótesis sobre los mecanismos implicados en la actividad antitumoral de LVR01.



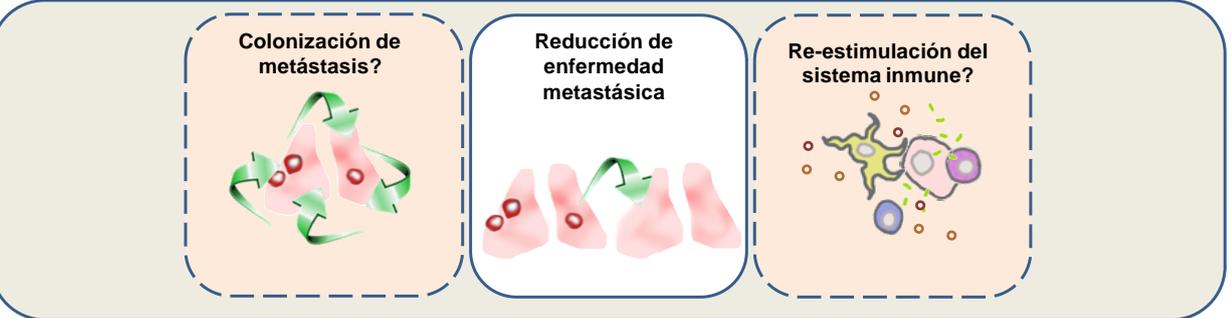
Eventos inmediatos tras administración de LVR01



Efectos tempranos 24-72hs



Efectos tardíos 10-20 días



Efectos tras múltiples dosis

Figura 20. Efectos *in vivo* de LVR01 sobre ratones portadores de enfermedad tumoral/metastásica. Se muestra un esquema integrador de los resultados experimentales obtenidos (cuadrados blancos) con posibles efectos no abarcados en este estudio (cuadrados rosado claro con borde discontinuo). La inoculación de LVR01 por distintas vías logra llegar al tumor de manera preferencial, pero también logra distribuirse en distintos órganos, con la posibilidad de alcanzar metástasis. Una vez que la bacteria llega al tumor, esta se asocia a un deterioro del tejido, a un aumento de neutrófilos/MDSCs, un aumento de secreción de IFN- γ y la migración de macrófagos desde el tumor al ganglio drenante. Mas tardíamente, se puede apreciar una tendencia a tamaños tumorales menores, así como un aumento de anticuerpos que reconocen a las células tumorales y un segundo pico de IFN- γ . Posiblemente estas respuestas se correlacionen con un aumento de la actividad citotóxica antitumoral. En aquellos animales sometidos a cirugía en los que se le administran varias dosis de LVR01 se observa una mejora en la supervivencia, retrasando o evitando la muerte por metástasis pulmonares. Es plausible que esta nueva administración de LVR01 logre una mayor cobertura de órganos con posibles metástasis, y que a su vez se logre la estimulación de respuestas inmunes que colaboren con la eliminación de las células tumorales.

7. CONCLUSIONES

Los experimentos *in vitro* permitieron apreciar una dinámica de infección intracelular particular, que era lograba una acumulación de cientos de bacterias intracelulares en unas horas y se asociaba con una distribución libre en el citoplasma de LVR01, resultando en la muerte celular de las células infectadas, con la posterior liberación de su contenido bacteriano. Las características de esta muerte tanto en las líneas tumorales mamarias como en la línea de macrófago/monocito eran sugerentes de una muerte celular programada, con muchas similitudes con la pyroptosis.

Las características en cuanto a su biodistribución en animales portadores de tumores es similar a trabajos anteriores [64][65][66], resultando en tasas de acumulación de aproximadamente cien a mil veces más en los tumores respecto a órganos como el pulmón, hígado y bazo. Es de notar que esta especificidad se logro independientemente de la vía de inoculación, ya sea local o sistémica. Se constato también la importancia del tumor como un factor que afecta a la eliminación de las bacterias de los órganos periféricos.

A nivel histológico, la administración de LVR01 a los tumores resulta en la colonización de zonas externas y centrales del tumor ya sea por la vía intratumoral o intraperitoneal. A tiempos cortos se pueden apreciar señales de invasión/replicación intracelular, reclutamiento de

neutrófilos/MDSCs y deterioro del tejido asociado a la presencia bacteriana.

Los efectos antitumorales de LVR01 sobre animales portadores de enfermedad metastásica (con y sin tumor) fueron moderados. Se apreció una tendencia a la reducción en el volumen tumoral a tiempos tardíos. Por otro lado, el aumento de dosis combinadas de LVR01 intratumorales y sistémicas en animales mostro un efecto mayor en la sobrevida de estos ratones, logrando aumentos significativos en la sobrevida, incluyendo casos de ratones libres de enfermedad por más de 180 días.

En la evaluación de respuestas inmunes inducidas por el tratamiento con LVR01 intratumoral, se encontró una movilización de células mieloides a nivel de tumor y linfoides a nivel de ganglio, aumento en los niveles de IFN- γ y un incremento en la respuesta inmune humoral. Se presenta un escenario de transición de respuestas rápidas innatas hacia otras más retardadas de la inmunidad adaptativa.

En resumen, la *Salmonella* Typhimurium atenuada LVR01 presenta una actividad antitumoral (*in vitro* e *in vivo*) y antimetastásica, donde están implicadas, su capacidad invasiva/replicativa, su biodistribución, su efecto citotóxico y su potencial inmunoterapéutico.

8. PERSPECTIVAS

- Caracterizar el tipo muerte celular inducida por LVR01 a nivel de actividad de caspasas y de sus efectos estimulantes de la respuesta inmune.
- Estudiar el estado de las bacterias que replican intracelularmente.
- Evaluar el potencial colonizador de metástasis de LVR01.
- Analizar en los tumores la relación espacial a nivel histológico entre LVR01 y distintas células linfoides y mieloides.
- Valorar el rol de la respuesta citotóxica en animales tratados.
- Analizar marcadores de activación y citoquinas secretadas en células inmunes asociados al tratamiento.
- Realizar ensayos funcionales que permitan establecer el efecto de LVR01 en linfocitos infiltrantes al tumor y sobre MDSCs.
- Variar el tratamiento, aumentando el número de dosis de LVR01.
- Evaluar a LVR01 como vector de terapia génica antitumoral o en terapias combinadas con quimioterápicos o inmunoestimuladores.

9.AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos por dar apoyo incondicional.

A Gabriela por su determinación en la conducción de este trabajo, la orientación y por enseñarme su visión científica del trabajo de investigador.

A Alejandro por la orientación, motivación y discusión crítica de los resultados.

A “Los grandes” del laboratorio por enseñarme cada quien algo distinto y valioso y por responder miles de preguntas con la mejor de las voluntades.

A “los chicos” del laboratorio con quien compartí el día a día en el laboratorio y muy buenos momentos fuera de él.

A Patricia Berasain, Paola Scavone y Pablo Liddle, por la orientación y ayuda técnica en los ensayos de histología y microscopía.

A PEDECIBA por permitirme hacer un posgrado en mi país.

A la ANII por apoyar mi trabajo de maestría con una beca.

A los profesores e investigadores de cursos y congresos que contribuyeron en mi formación académica.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] “¿Qué es el cáncer? - National Cancer Institute.” [Online]. Available: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>. [Accessed: 02-Apr-2013].
- [2] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: the next generation.,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [3] R. A. Weinberg, *The Biology Of Cancer*. Garland Science, 2007.
- [4] S. Preston-Martin, M. C. Pike, R. K. Ross, P. A. Jones, and B. E. Henderson, “Increased cell division as a cause of human cancer.,” *Cancer research*, vol. 50, no. 23, pp. 7415–21, Dec. 1990.
- [5] P. C. Nowell, “The clonal evolution of tumor cell populations.,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 194, no. 4260, pp. 23–8, Oct. 1976.
- [6] B. Stransky and S. J. de Souza, “Modeling tumor evolutionary dynamics.,” *Frontiers in physiology*, vol. 3, p. 480, Jan. 2012.
- [7] P. Vaupel and L. Harrison, “Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response.,” *The oncologist*, vol. 9 Suppl 5, no. suppl_5, pp. 4–9, Jan. 2004.
- [8] S. P. Herbert and D. Y. R. Stainier, “Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis.,” *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 12, no. 9, pp. 551–64, Sep. 2011.
- [9] J. E. Talmadge and I. J. Fidler, “AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective.,” *Cancer research*, vol. 70, no. 14, pp. 5649–69, Jul. 2010.

- [10] E. A. Comen, "Tracking the Seed and Tending the Soil: Evolving Concepts in Metastatic Breast Cancer," *Discovery Medicine*, vol. 14, no. 75, pp. 97–104, 2012.
- [11] I. Baccelli and A. Trumpp, "The evolving concept of cancer and metastasis stem cells.," *The Journal of cell biology*, vol. 198, no. 3, pp. 281–93, Aug. 2012.
- [12] J. A. Joyce and J. W. Pollard, "Microenvironmental regulation of metastasis.," *Nature reviews. Cancer*, vol. 9, no. 4, pp. 239–52, Apr. 2009.
- [13] D. Liao, Y. Luo, D. Markowitz, R. Xiang, and R. a Reisfeld, "Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model.," *PloS one*, vol. 4, no. 11, p. e7965, Jan. 2009.
- [14] K. S. Siveen and G. Kuttan, "Role of macrophages in tumour progression.," *Immunology letters*, vol. 123, no. 2, pp. 97–102, Apr. 2009.
- [15] S. I. Grivennikov, F. R. Greten, and M. Karin, "Immunity, inflammation, and cancer.," *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 883–99, Mar. 2010.
- [16] G. P. Dunn, A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber, "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape.," *Nature immunology*, vol. 3, no. 11, pp. 991–8, Nov. 2002.
- [17] M. Cirone, L. Di Renzo, L. V Lotti, V. Conte, P. Trivedi, R. Santarelli, R. Gonnella, L. Frati, and A. Faggioni, "Activation of dendritic cells by tumor cell death.," *Oncoimmunology*, vol. 1, no. 7, pp. 1218–1219, Oct. 2012.

- [18] G. Li, X. Liang, and M. T. Lotze, "HMGB1: The Central Cytokine for All Lymphoid Cells.," *Frontiers in immunology*, vol. 4, p. 68, Jan. 2013.
- [19] A. D. Garg, D. V Krysko, P. Vandenabeele, and P. Agostinis, "The emergence of phox-ER stress induced immunogenic apoptosis.," *Oncoimmunology*, vol. 1, no. 5, pp. 786–788, Aug. 2012.
- [20] N. Guerra, Y. X. Tan, N. T. Joncker, A. Choy, F. Gallardo, N. Xiong, S. Knoblauch, D. Cado, N. M. Greenberg, N. R. Greenberg, and D. H. Raulet, "NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy.," *Immunity*, vol. 28, no. 4, pp. 571–80, Apr. 2008.
- [21] D. V Correia, A. Lopes, and B. Silva-Santos, "Tumor cell recognition by $\gamma\delta$ T lymphocytes: T-cell receptor vs. NK-cell receptors.," *Oncoimmunology*, vol. 2, no. 1, p. e22892, Jan. 2013.
- [22] E. Panzarini, V. Inguscio, and L. Dini, "Immunogenic Cell Death: Can It Be Exploited in PhotoDynamic Therapy for Cancer?," *BioMed research international*, vol. 2013, p. 482160, Jan. 2013.
- [23] D. Lindau, P. Gielen, M. Kroesen, P. Wesseling, and G. J. Adema, "The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells.," *Immunology*, vol. 138, no. 2, pp. 105–15, Feb. 2013.
- [24] D. I. Gabrilovich and S. Nagaraj, "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 9, no. 3, pp. 162–74, Mar. 2009.

- [25] E. M. Shevach, "Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression.," *Immunity*, vol. 30, no. 5, pp. 636–45, May 2009.
- [26] D. a a Vignali, L. W. Collison, and C. J. Workman, "How regulatory T cells work.," *Nature reviews. Immunology*, vol. 8, no. 7, pp. 523–32, Jul. 2008.
- [27] CHLCC, "INFORME 2010 SINTESIS DE LOS ULTIMOS DATOS ESTADISTICOS
http://www.urucan.org.uy/uilayer/ve/Informe_2010_RNC%20_Sintesis_datos_estadisticos.pdf," 2010.
- [28] "Breast Cancer Treatment." [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMH0032825/>.
- [29] "WHO | Breast cancer: prevention and control." [Online]. Available: <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/>. [Accessed: 30-Mar-2013].
- [30] K. Turaga, G. Acs, and C. Laronga, "Gene expression profiling in breast cancer.," *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*, vol. 17, no. 3, pp. 177–82, Jul. 2010.
- [31] J. Bange, E. Zwick, and A. Ullrich, "Molecular targets for breast cancer therapy and prevention.," *Nature medicine*, vol. 7, no. 5, pp. 548–52, May 2001.
- [32] J. a Freudenberg, Q. Wang, M. Katsumata, J. Drebin, I. Nagatomo, and M. I. Greene, "The role of HER2 in early breast cancer metastasis and the origins of resistance to HER2-targeted therapies.," *Experimental and molecular pathology*, vol. 87, no. 1, pp. 1–11, Aug. 2009.

- [33] H. Soliman, "Immunotherapy strategies in the treatment of breast cancer.," *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*, vol. 20, no. 1, pp. 17–21, Jan. 2013.
- [34] S. L. Topalian, G. J. Weiner, and D. M. Pardoll, "Cancer immunotherapy comes of age.," *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 29, no. 36, pp. 4828–36, Dec. 2011.
- [35] F. Cavallo, C. De Giovanni, P. Nanni, G. Forni, and P.-L. Lollini, "2011: the immune hallmarks of cancer," *Cell*, vol. 60, no. 3, pp. 319–326, Mar. 2011.
- [36] C. R. Parish, "Cancer immunotherapy: the past, the present and the future.," *Immunology and cell biology*, vol. 81, no. 2, pp. 106–13, May 2003.
- [37] B. A. Fox, D. J. Schendel, L. H. Butterfield, S. Aamdal, J. P. Allison, P. A. Ascierto, M. B. Atkins, J. Bartunkova, L. Bergmann, N. Berinstein, C. C. Bonorino, E. Borden, J. L. Bramson, C. M. Britten, X. Cao, W. E. Carson, A. E. Chang, D. Characiejus, A. R. Choudhury, G. Coukos, T. de Gruijl, R. O. Dillman, H. Dolstra, G. Dranoff, L. G. Durrant, J. H. Finke, J. Galon, J. A. Gollob, C. Gouttefangeas, F. Grizzi, M. Guida, L. Håkansson, K. Hege, R. B. Herberman, F. S. Hodi, A. Hoos, C. Huber, P. Hwu, K. Imai, E. M. Jaffee, S. Janetzki, C. H. June, P. Kalinski, H. L. Kaufman, K. Kawakami, Y. Kawakami, U. Keilholtz, S. N. Khleif, R. Kiessling, B. Kotlan, G. Kroemer, R. Lapointe, H. I. Levitsky, M. T. Lotze, C. Maccalli, M. Maio, J.-P. Marschner, M. J. Mastrangelo, G. Masucci, I. Melero, C. Melief, W. J. Murphy, B. Nelson, A. Nicolini, M. I. Nishimura, K. Odunsi, P. S. Ohashi, J. O'Donnell-Tormey, L. J. Old, C. Ottensmeier, M. Papamichail, G. Parmiani, G. Pawelec, E. Proietti, S. Qin, R. Rees, A. Ribas, R. Ridolfi, G. Ritter, L. Rivoltini, P. J. Romero, M. L. Salem, R. J. Scheper, B. Seliger, P. Sharma, H. Shiku, H. Singh-Jasuja, W. Song, P. T. Straten,

H. Tahara, Z. Tian, S. H. van Der Burg, P. von Hoegen, E. Wang, M. J. Welters, H. Winter, T. Withington, J. D. Wolchok, W. Xiao, L. Zitvogel, H. Zwierzina, F. M. Marincola, T. F. Gajewski, J. M. Wigginton, and M. L. Disis, "Defining the critical hurdles in cancer immunotherapy.," *Journal of translational medicine*, vol. 9, no. 1, p. 214, Jan. 2011.

- [38] "Search of: gene therapy cancer il - List Results - ClinicalTrials.gov." [Online]. Available: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=gene+therapy+cancer+il&Search=Search>. [Accessed: 31-Mar-2013].
- [39] T. A. Oelschlaeger, "Bacteria as tumor therapeutics?," *Bioengineered bugs*, vol. 1, no. 2, pp. 146–7, 2010.
- [40] S. A. Hoption Cann, J. P. van Netten, and C. van Netten, "Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future.," *Postgraduate medical journal*, vol. 79, no. 938, pp. 672–80, Dec. 2003.
- [41] S. Patyar, R. Joshi, D. S. P. Byrav, A. Prakash, B. Medhi, and B. K. Das, "Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy," *Journal of biomedical science*, vol. 17, no. 1, p. 21, Jan. 2010.
- [42] E. J. Cheadle and A. M. Jackson, "Bugs as drugs for cancer.," *Immunology*, vol. 107, no. 1, pp. 10–9, Oct. 2002.
- [43] I. Adkins, J. Holubova, M. Kosova, and L. Sadilkova, "Bacteria and their toxins tamed for immunotherapy.," *Current pharmaceutical biotechnology*, vol. 13, no. 8, pp. 1446–73, Jun. 2012.
- [44] M. Moreno, M. G. Kramer, L. Yim, and J. A. Chabalgoity, "Salmonella as live trojan horse for vaccine development and cancer gene therapy.," *Current gene therapy*, vol. 10, no. 1, pp. 56–76, Feb. 2010.

- [45] C. K. Baban, M. Cronin, D. O’Hanlon, G. C. O’Sullivan, and M. Tangney, “Bacteria as vectors for gene therapy of cancer.,” *Bioengineered bugs*, vol. 1, no. 6, pp. 385–94, 2010.
- [46] H. W. Herr, D. M. Schwalb, Z. F. Zhang, P. C. Sogani, W. R. Fair, W. F. Whitmore, and H. F. Oettgen, “Intravesical bacillus Calmette-Guérin therapy prevents tumor progression and death from superficial bladder cancer: ten-year follow-up of a prospective randomized trial.,” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 13, no. 6, pp. 1404–8, Jun. 1995.
- [47] M. Ha, “Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in the treatment of superficial bladder cancer,” vol. 69, no. 6, pp. 307–313, 2009.
- [48] N. Bernardes, R. Seruca, A. M. Chakrabarty, and A. M. Fialho, “Microbial-based therapy of cancer: current progress and future prospects.,” *Bioengineered bugs*, vol. 1, no. 3, pp. 178–90, 2010.
- [49] “Phase II/III Clinical Study CSF470 Plus BCG Plus GM-CSF vs IFN Alpha 2b in Stage IIB, IIC and III Melanoma Patients - Full Text View - ClinicalTrials.gov.” [Online]. Available: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01729663>. [Accessed: 28-Mar-2013].
- [50] J. Fierer and D. G. Guiney, “Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of Salmonella infection.,” *The Journal of clinical investigation*, vol. 107, no. 7, pp. 775–80, Apr. 2001.
- [51] P. Mastroeni and A. J. Grant, “Spread of Salmonella enterica in the body during systemic infection: unravelling host and pathogen determinants.,” *Expert reviews in molecular medicine*, vol. 13, no. April, p. e12, Jan. 2011.

- [52] H. K. de Jong, C. M. Parry, T. van der Poll, and W. J. Wiersinga, "Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis.," *PLoS pathogens*, vol. 8, no. 10, p. e1002933, Jan. 2012.
- [53] S. Ganai, R. Arenas, and J. Sauer, "In tumors Salmonella migrate away from vasculature toward the transition zone and induce apoptosis," *Cancer gene ...*, vol. 18, no. 7, pp. 457–466, 2011.
- [54] A. Haraga, M. B. Ohlson, and S. I. Miller, "Salmonellae interplay with host cells.," *Nature reviews. Microbiology*, vol. 6, no. 1, pp. 53–66, Jan. 2008.
- [55] S. L. Fink and B. T. Cookson, "Pyroptosis and host cell death responses during Salmonella infection.," *Cellular microbiology*, vol. 9, no. 11, pp. 2562–70, Nov. 2007.
- [56] L. a Knodler, B. a Vallance, J. Celli, S. Winfree, B. Hansen, M. Montero, and O. Steele-Mortimer, "Dissemination of invasive Salmonella via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 41, pp. 17733–8, Oct. 2010.
- [57] Q. Wang, R. Imamura, K. Motani, H. Kushiyama, S. Nagata, and T. Suda, "Pyroptotic cells externalize eat-me and release find-me signals and are efficiently engulfed by macrophages.," *International immunology*, no. 2, Feb. 2013.
- [58] P. Thiennimitr, S. E. Winter, and A. J. Bäumlner, "Salmonella, the host and its microbiota.," *Current opinion in microbiology*, vol. 15, no. 1, pp. 108–14, Feb. 2012.
- [59] S. L. Fink and B. T. Cookson, "Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying

eukaryotic cells.," *Infection and immunity*, vol. 73, no. 4, pp. 1907–16, Apr. 2005.

- [60] T. Bergsbaken, S. L. Fink, and B. T. Cookson, "Pyroptosis: host cell death and inflammation.," *Nature reviews. Microbiology*, vol. 7, no. 2, pp. 99–109, Feb. 2009.
- [61] N. S. Forbes, "Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy.," *Nature reviews. Cancer*, vol. 10, no. 11, pp. 785–94, Nov. 2010.
- [62] D. M. Wall, C. V Srikanth, and B. A. McCormick, "Targeting tumors with salmonella Typhimurium- potential for therapy.," *Oncotarget*, vol. 1, no. 8, pp. 721–8, Dec. 2010.
- [63] S. Leschner and S. Weiss, "Salmonella-allies in the fight against cancer.," *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, vol. 88, no. 8, pp. 763–73, Aug. 2010.
- [64] J. Pawelek, K. Low, and D. Bermudes, "Tumor-targeted Salmonella as a novel anticancer vector," *Cancer research*, vol. 57, pp. 4537–4544, 1997.
- [65] K. B. Low, M. Ittensohn, T. Le, J. Platt, S. Sodi, M. Amoss, O. Ash, E. Carmichael, a Chakraborty, J. Fischer, S. L. Lin, X. Luo, S. I. Miller, L. Zheng, I. King, J. M. Pawelek, and D. Bermudes, "Lipid A mutant Salmonella with suppressed virulence and TNFalpha induction retain tumor-targeting in vivo.," *Nature biotechnology*, vol. 17, no. 1, pp. 37–41, Jan. 1999.
- [66] N. S. Forbes, L. L. Munn, and D. Fukumura, "Sparse Initial Entrapment of Systemically Injected Salmonella typhimurium Leads to Heterogeneous Accumulation within Tumors Advances in Brief Sparse Initial Entrapment of Systemically Injected Salmonella typhimurium Leads to Heterogeneous Accumulation wit," pp. 5188–5193, 2003.

- [67] K. Crull, D. Bumann, and S. Weiss, "Influence of infection route and virulence factors on colonization of solid tumors by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.," *FEMS immunology and medical microbiology*, vol. 62, no. 1, pp. 75–83, Jun. 2011.
- [68] R. Kasinskas and N. Forbes, "Salmonella typhimurium specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue in vitro," *Biotechnology and bioengineering*, 2006.
- [69] B. J. Toley and N. S. Forbes, "Motility is critical for effective distribution and accumulation of bacteria in tumor tissue.," *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, vol. 4, no. 2, pp. 165–76, Feb. 2012.
- [70] Y. a Yu, S. Shabahang, T. M. Timiryasova, Q. Zhang, R. Beltz, I. Gentshev, W. Goebel, and A. a Szalay, "Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins.," *Nature biotechnology*, vol. 22, no. 3, pp. 313–20, Mar. 2004.
- [71] R. M. Hoffman, "Tumor-targeting amino acid auxotrophic *Salmonella typhimurium*," *Amino acids*, vol. 37, no. 3, pp. 509–21, Sep. 2009.
- [72] R. M. Hoffman, "Tumor-seeking *Salmonella* amino acid auxotrophs.," *Current opinion in biotechnology*, vol. 22, no. 6, pp. 917–23, Dec. 2011.
- [73] M. Zhao, A. Suetsugu, H. Ma, L. Zhang, F. Liu, Y. Zhang, B. Tran, and R. M. Hoffman, "Efficacy against lung metastasis with a tumor-targeting mutant of *Salmonella typhimurium* in immunocompetent mice.," *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, vol. 11, no. 1, pp. 187–93, Jan. 2012.

- [74] Z. Zhong, R. a Kazmierczak, A. Dino, R. Khreis, A. Eisenstark, and H. Schatten, "Salmonella-host cell interactions, changes in host cell architecture, and destruction of prostate tumor cells with genetically altered Salmonella.," *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada*, vol. 13, no. 5, pp. 372–83, Oct. 2007.
- [75] X. Luo, Z. Li, S. Lin, T. Le, M. Ittensohn, D. Bermudes, J. D. Runyab, S. Y. Shen, J. Chen, I. C. King, and L. M. Zheng, "Antitumor effect of VNP20009, an attenuated Salmonella, in murine tumor models.," *Oncology research*, vol. 12, no. 11–12, pp. 501–8, Jan. 2001.
- [76] J. F. Toso, V. J. Gill, P. Hwu, F. M. Marincola, N. P. Restifo, D. J. Schwartzentruber, R. M. Sherry, S. L. Topalian, J. C. Yang, F. Stock, L. J. Freezer, K. E. Morton, C. Seipp, L. Haworth, S. Mavroukakis, D. White, S. MacDonald, J. Mao, M. Sznol, and S. A. Rosenberg, "Phase I study of the intravenous administration of attenuated Salmonella typhimurium to patients with metastatic melanoma.," *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 20, no. 1, pp. 142–52, Jan. 2002.
- [77] "IL-2 Expressing, Attenuated Salmonella Typhimurium in Unresectable Hepatic Spread - Full Text View - ClinicalTrials.gov." [Online]. Available: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01099631?term=salmonella+cancer&rank=1>. [Accessed: 17-Apr-2013].
- [78] F. Avogadri, C. Martinoli, L. Petrovska, C. Chiodoni, P. Transidico, V. Bronte, R. Longhi, M. P. Colombo, G. Dougan, and M. Rescigno, "Cancer immunotherapy based on killing of Salmonella-infected tumor cells.," *Cancer research*, vol. 65, no. 9, pp. 3920–7, May 2005.

- [79] F. Saccheri, C. Pozzi, F. Avogadri, S. Barozzi, M. Faretta, P. Fusi, and M. Rescigno, "Bacteria-induced gap junctions in tumors favor antigen cross-presentation and antitumor immunity.," *Science translational medicine*, vol. 2, no. 44, p. 44ra57, Aug. 2010.
- [80] C. Agorio, F. Schreiber, M. Sheppard, P. Mastroeni, M. Fernandez, M. A. Martinez, and J. A. Chabalgoity, "Live attenuated Salmonella as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma.," *The journal of gene medicine*, vol. 9, no. 5, pp. 416–23, May 2007.
- [81] S. Grille, M. Moreno, A. Brugnini, D. Lens, and J. A. Chabalgoity, "A therapeutic vaccine using Salmonella-modified tumor cells combined with interleukin-2 induces enhanced antitumor immunity in B-cell lymphoma.," *Leukemia research*, vol. 37, no. 3, pp. 341–8, Mar. 2013.
- [82] F. Miller and A. Care, "Mouse 4T1 Breast Tumor Model," pp. 1–16, 2000.
- [83] P. Malik-Kale, C. E. Jolly, S. Lathrop, S. Winfree, C. Luterbach, and O. Steele-Mortimer, "Salmonella - at home in the host cell.," *Frontiers in microbiology*, vol. 2, no. June, p. 125, Jan. 2011.
- [84] A. Sebkova, D. Karasova, M. Crhanova, E. Budinska, and I. Rychlik, "aro mutations in Salmonella enterica cause defects in cell wall and outer membrane integrity.," *Journal of bacteriology*, vol. 190, no. 9, pp. 3155–60, May 2008.
- [85] K. Geddes, F. Cruz, and F. Heffron, "Analysis of cells targeted by Salmonella type III secretion in vivo.," *PLoS pathogens*, vol. 3, no. 12, p. e196, Dec. 2007.
- [86] S. Ganai, R. B. Arenas, J. P. Sauer, B. Bentley, and N. S. Forbes, "In tumors Salmonella migrate away from

vasculature toward the transition zone and induce apoptosis," *Cancer gene ...*, vol. 18, no. 7, pp. 457–466, Jul. 2011.

- [87] L. Chen, T.-G. Huang, M. Meseck, J. Mandeli, J. Fallon, and S. L. C. Woo, "Rejection of metastatic 4T1 breast cancer by attenuation of Treg cells in combination with immune stimulation.," *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, vol. 15, no. 12, pp. 2194–202, Dec. 2007.
- [88] S. a DuPré, D. Redelman, and K. W. Hunter, "The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci.," *International journal of experimental pathology*, vol. 88, no. 5, pp. 351–60, Oct. 2007.
- [89] J. Chen, D. Wei, H. Zhuang, Y. Qiao, B. Tang, X. Zhang, J. Wei, S. Fang, G. Chen, P. Du, X. Huang, W. Jiang, Q. Hu, and Z.-C. Hua, "Proteomic screening of anaerobically regulated promoters from Salmonella and its antitumor applications.," *Molecular & cellular proteomics : MCP*, vol. 10, no. 6, p. M111.009399, Jun. 2011.
- [90] W. Kong, M. Brovold, B. a Koeneman, J. Clark-Curtiss, and R. Curtiss, "Turning self-destructing Salmonella into a universal DNA vaccine delivery platform.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 47, pp. 19414–9, Nov. 2012.
- [91] S. Weiss and T. Chakraborty, "Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian host cells by bacterial carriers.," *Current opinion in biotechnology*, vol. 12, no. 5, pp. 467–72, Oct. 2001.
- [92] K. Westphal, S. Leschner, J. Jablonska, H. Loessner, and S. Weiss, "Containment of tumor-colonizing bacteria by host

neutrophils.," *Cancer research*, vol. 68, no. 8, pp. 2952–60, Apr. 2008.

- [93] J.-I. Youn, S. Nagaraj, M. Collazo, and D. I. Gabrilovich, "Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 181, no. 8, pp. 5791–802, Oct. 2008.
- [94] B. A. Pulaski, S. Ostrand-rosenberg, and C. T. Vaccines, "Reduction of Established Spontaneous Mammary Carcinoma Metastases following Immunotherapy with Major Histocompatibility Complex Class II and B7 . 1 Cell-based Tumor Vaccines Reduction of Established Spontaneous Mammary Carcinoma MÃ© tastases following," 1998.
- [95] T. W. Dubensky and S. G. Reed, "Adjuvants for cancer vaccines.," *Seminars in immunology*, vol. 22, no. 3, pp. 155–61, Jun. 2010.
- [96] K. Westphal, S. Leschner, J. Jablonska, H. Loessner, and S. Weiss, "Containment of tumor-colonizing bacteria by host neutrophils.," *Cancer research*, vol. 68, no. 8, pp. 2952–60, Apr. 2008.
- [97] Y. Luo, J. Henning, and M. a O'Donnell, "Th1 cytokine-secreting recombinant Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin and prospective use in immunotherapy of bladder cancer.," *Clinical & developmental immunology*, vol. 2011, p. 728930, Jan. 2011.
- [98] J. Zhu and W. E. Paul, "CD4 T cells : fates , functions , and faults," vol. 112, no. 5, pp. 1557–1569, 2009.
- [99] K. Schroder and P. Hertzog, "Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions," *Journal of leukocyte ...*, vol. 75, no. February, 2004.

- [100] Y. Gao, W. Yang, M. Pan, E. Scully, M. Girardi, L. H. Augenlicht, J. Craft, and Z. Yin, "Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 198, no. 3, pp. 433–42, Aug. 2003.
- [101] C. Carnaud, D. Lee, O. Donnars, S. H. Park, A. Beavis, Y. Koezuka, and A. Bendelac, "Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 163, no. 9, pp. 4647–50, Nov. 1999.
- [102] J. Diessner, V. Bruttel, K. Becker, M. Pawlik, R. Stein, S. Häusler, J. Dietl, J. Wischhusen, and A. Hönig, "Targeting breast cancer stem cells with HER2-specific antibodies and natural killer cells.," *American journal of cancer research*, vol. 3, no. 2, pp. 211–20, Jan. 2013.
- [103] H. E. Kohrt, R. Houot, A. Marabelle, H. J. Cho, K. Osman, M. Goldstein, R. Levy, and J. Brody, "Combination strategies to enhance antitumor ADCC.," *Immunotherapy*, vol. 4, no. 5, pp. 511–27, May 2012.
- [104] M. A. Murphy, J. J. O'Leary, and D. J. Cahill, "Assessment of the humoral immune response to cancer.," *Journal of proteomics*, vol. 75, no. 15, pp. 4573–9, Aug. 2012.