



Programa de Posgrado en Biotecnología, Universidad de la República

Tesis de Maestría en Biotecnología

***Salmonella* en combinación con aptámeros  
inhibidores de puntos de control del sistema inmune  
como nueva opción terapéutica frente al cáncer.**

Lic. Sofía Chilibroste Vera

Dirección: Dra. María Moreno Jauge

Co-dirección: Dra. Victoria Calzada Falcón

TRIBUNAL

Dr. Gustavo Mourglia

Dr. Víctor M. González

Dra. María Magdalena Vola

2021

## AGRADECIMIENTOS

Al tribunal: Dr. Gustavo Mourglia, Dr. Víctor González y Dra. Magdalena Vola, gracias por aceptar esta tarea. En especial agradecer a Gustavo, quien también fue mi evaluador a lo largo del posgrado, por sus valiosos comentarios y sugerencias.

A la ANII y CAP, que gracias a su financiación pude hacer de mi vocación mi trabajo.

Al Posgrado en Biotecnología, por permitirme desarrollar mis estudios de Maestría en esta área y por el apoyo económico brindado mediante las alícuotas para estudiantes.

A mis tutoras, María y Victoria, muchas gracias por el apoyo constante durante la realización de este trabajo. En los momentos más complicados fueron un pilar fundamental para continuar.

Al grupo *Salmonella* y cáncer, estar rodeada de gente apasionada por lo que hace es contagioso y muy divertido también. En especial a Amy, gracias por tooda tu ayuda y estar siempre!

A los integrantes del DBT, por las charlas y consejos que siempre son de gran ayuda.

A Estefanía, Romina y Marcelo del CIN, muchas gracias por su ayuda y buena disposición siempre.

A mi amigos, por estar y bancar siempre!

A mi familia, por siempre creer en mi y apoyarme en cada nuevo desafío. Especialmente a mis hermanos y padres, gracias!!

“Los grandes logros de cualquier persona generalmente dependen de muchas manos, corazones y mentes”

W.D

## RESUMEN

El sistema inmune tiene un rol fundamental en el desarrollo del cáncer. La modulación de éste a través del uso de inmunoterapias permite controlar o, eventualmente, eliminar la enfermedad. Gracias al progreso sustancial de los últimos años, actualmente hay una gran variedad de inmunoterapias aprobadas para uso clínico frente a diversos tipos de patologías oncológicas. Sin embargo, no siempre se responde de manera exitosa al tratamiento; un porcentaje importante de los pacientes no responden adecuadamente o desarrollan resistencia a algunas terapias. Sumado a esto, generalmente se trata de procedimientos con altos costos, complejos de implementar y con efectos secundarios severos. Dentro de los grandes desafíos en esta área se encuentran: establecer alternativas terapéuticas de mayor precisión, con el fin de aumentar los casos de éxito, y más accesibles. Esto implica el diseño de nuevas estrategias, ya sea optimizando o combinando terapias ya existentes, o desarrollando nuevos tratamientos.

En el presente trabajo nos propusimos evaluar el potencial terapéutico de una inmunoterapia basada en el uso de la cepa LVR01 de *Salmonella* en combinación con aptámeros que bloqueen distintos puntos de control del sistema inmune (CTLA4, TIM3 y PD1) para el tratamiento del melanoma y cáncer de colon.

Observamos que la combinación de LVR01 con anti-PD1 en el modelo de cáncer de colon tiene un mayor potencial terapéutico que en el modelo de melanoma. Esta diferencia se explica, en parte, por una mayor expresión de PD1 en el microambiente tumoral y captación de anti-PD1 en los órganos blanco. La terapia combinada es capaz de generar una respuesta inmune específica frente al tumor, donde algunos animales presentan una respuesta completa. Además, demostramos que se trata de una respuesta antitumoral de memoria, ya que es capaz de brindar protección frente a ensayos de desafío. Finalmente, se evidenció que los esplenocitos de los animales que respondieron exitosamente a la terapia son capaces de conferir protección e impedir el desarrollo de un nuevo tumor en animales naïve. Los resultados resaltan la relevancia de evaluar el potencial de las inmunoterapias en escenarios óptimos de baja carga tumoral, que permita una ventana de tiempo amplia para la generación de una respuesta inmune efectiva.

En suma, el trabajo realizado aporta conocimientos básicos que sirven de insumo para el diseño racional de futuras estrategias terapéuticas frente al cáncer basadas en *Salmonella* atenuada.

# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

1. Inmunidad & Cáncer	
1.1. Definición de cáncer	7
1.2. Inmunoedición	8
1.3. Respuesta inmune antitumoral & mecanismos de evasión	9
1.4. Estadificación tumoral	11
2. Inmunoterapias	
2.1. Definición	13
2.2. Inmunoterapias frente al cáncer	13
2.2.1. Citoquinas	14
2.2.2. Anticuerpos Monoclonales	16
2.2.2.1. Bloqueo de puntos de control inhibitorios del sistema inmune	17
2.2.3. Transferencia adoptiva de células	18
2.2.4. Microorganismos vivos	19
2.2.4.1. <i>Salmonella</i> & Cáncer	20
2.2.5. Aptámeros	24
2.2.5.1. Aplicaciones - Diagnóstico y Terapia	25
2.2.5.2. Uso en la clínica -Terapia	27
3. Melanoma	
3.1. Patología	28
3.2. Terapias	29
4. Cáncer de colon	
4.1. Patología	31
4.2. Terapias	32

HIPÓTESIS DE TRABAJO	34
----------------------	----

OBJETIVOS	34
-----------	----

## MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas celulares	35
2. Cepa bacteriana	35
3. Aptámeros	35
4. Animales de experimentación	36
5. Modelo de melanoma B16F1 subcutáneo y protocolo de tratamiento.	37

6. Modelo de cáncer de colon CT26 subcutáneo y protocolo de tratamiento.	38
7. Ensayo de biodistribución del aptámero contra PD1.	38
8. Estudio de la respuesta inmune.	39
8.1. Análisis de la respuesta inmune celular.	39
8.1.1. Evaluación de los linfocitos.	39
8.1.2. Expresión diferencial de genes por RT-qPCR.	40
8.2. Respuesta inmune humoral.	41
9. Valoración de la respuesta inmune antitumoral de memoria.	42
9.1. Evaluación mediante desafío con un segundo tumor.	42
9.2. Ensayo de Winn modificado.	
9.2.1. Puesta a punto en CT26.	42
9.2.2. Evaluación en CT26.	42
10. Análisis estadístico	43

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Evaluación del potencial terapéutico de <i>Salmonella</i> LVR01 en combinación con moléculas que bloquean puntos de control inhibidores del sistema inmune en un modelo de melanoma B16F1 subcutáneo.	
1.1. Puesta a punto del tratamiento con <i>Salmonella</i> LVR01 en combinación con los aptámeros contra CLTA4, PD1 y TIM3 en un modelo de melanoma B16F1 subcutáneo.	44
1.2. Puesta a punto de la evaluación del potencial terapéutico de <i>Salmonella</i> LVR01 en combinación con aptámero contra PD1 en un modelo de melanoma B16F1 subcutáneo.	45
1.3. Estudio del eje PD1/PD-L1 y comparación del potencial terapéutico del aptámero contra PD1 con el del anticuerpo monoclonal comercial contra PD1 en el modelo de melanoma B16F1 subcutáneo.	49
1.4. Optimización de la evaluación del potencial terapéutico de <i>Salmonella</i> LVR01 en combinación con aptámeros contra TIM3 en un modelo de melanoma B16F1 subcutáneo.	53
2. Evaluación del potencial terapéutico de <i>Salmonella</i> LVR01 en combinación con moléculas que bloquean PD1 en un modelo de cáncer de colon CT26 subcutáneo.	
2.1. Puesta a punto del tratamiento con <i>Salmonella</i> LVR01 en el modelo de cáncer de colon CT26 subcutáneo.	55
2.2. Análisis del potencial terapéutico de <i>Salmonella</i> LVR01 en combinación con aptámeros anti-PD1 en un modelo de cáncer de colon CT26 subcutáneo.	55

2.3. Comparación del potencial terapéutico del aptámero anti-PD1 con el del anticuerpo monoclonal comercial en el modelo de cáncer de colon CT26 subcutáneo.	60
3. Evaluación de la biodistribución del aptámero contra PD1 en el modelo murino de melanoma y de cáncer de colon.	
3.1. Derivatización del aptámero.	63
3.2. Evaluación de la biodistribución del aptámero contra PD1 en el modelo murino de melanoma a las 24 horas.	64
3.3. Evaluación de la biodistribución del aptámero contra PD1 en el modelo murino de melanoma y de cáncer de colon a las 2 horas.	66
3.4. Evaluación de la expresión de PD1 en células provenientes de tumor.	69
4. Análisis de la respuesta inmune celular ejercida por <i>Salmonella</i> en combinación con moléculas que bloquean PD1 en el modelo murino de melanoma y de cáncer de colon.	
4.1. Evaluación de los linfocitos T citotóxicos en modelo murino de melanoma B16F1 subcutáneo por citometría de flujo.	70
4.2. Evaluación de la respuesta inmune linfocitaria en modelo de cáncer de colon CT26 subcutáneo por citometría de flujo.	74
4.3. Evaluación de la expresión diferencial de genes en muestras de tumor CT26 por RT-qPCR.	80
5. Análisis de la respuesta inmune humoral ejercida por <i>Salmonella</i> en combinación con moléculas que bloquean PD1 en el modelo murino de cáncer de colon.	82
6. Valoración de la respuesta inmune anti-tumoral de memoria inducida por <i>Salmonella</i> en combinación con moléculas que bloquean PD1 en modelo de cáncer de colon subcutáneo.	
6.1. Evaluación mediante desafío con un segundo tumor.	84
6.2. Ensayo de Winn modificado.	84
6.2.1. Puesta a punto en CT26.	84
6.2.2. Evaluación en CT26.	86
<b>DISCUSIÓN FINAL Y PERSPECTIVAS</b>	<b>88</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>96</b>

## INTRODUCCIÓN

### 1. Inmunidad & Cáncer

#### 1.1. Definición de cáncer

El término cáncer representa a un conjunto de enfermedades en las que células malignas proliferan en el organismo debido a que alteran el equilibrio de los programas de crecimiento (alteraciones en la proliferación, diferenciación y apoptosis celular). Las células malignas crecen descontroladamente formando acúmulos celulares denominados tumores malignos que tienden a propagarse a distancia, por vía sanguínea o linfática, y originar metástasis (Fainboim and Geffner, 2011). Estas se originan por acumulación de mutaciones en genes asociados al desarrollo del cáncer (proto-oncogenes y genes asociados a la supresión tumoral). Además, el estroma asociado al tumor contribuye activamente en el desarrollo de la patología, estimulando el desarrollo y expresión de los llamados *Hallmarks* del cáncer. Dentro de estos encontramos: proliferación celular sostenida, evasión de mecanismos supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalización celular, angiogénesis, desarrollo de un fenotipo invasor y metástasis, inflamación que promueve el crecimiento tumoral, inestabilidad genómica y mutación, reprogramación metabólica y evasión del sistema inmune (Fainboim and Geffner, 2011; Hanahan and Weinberg, 2011) (Figura 1.1).

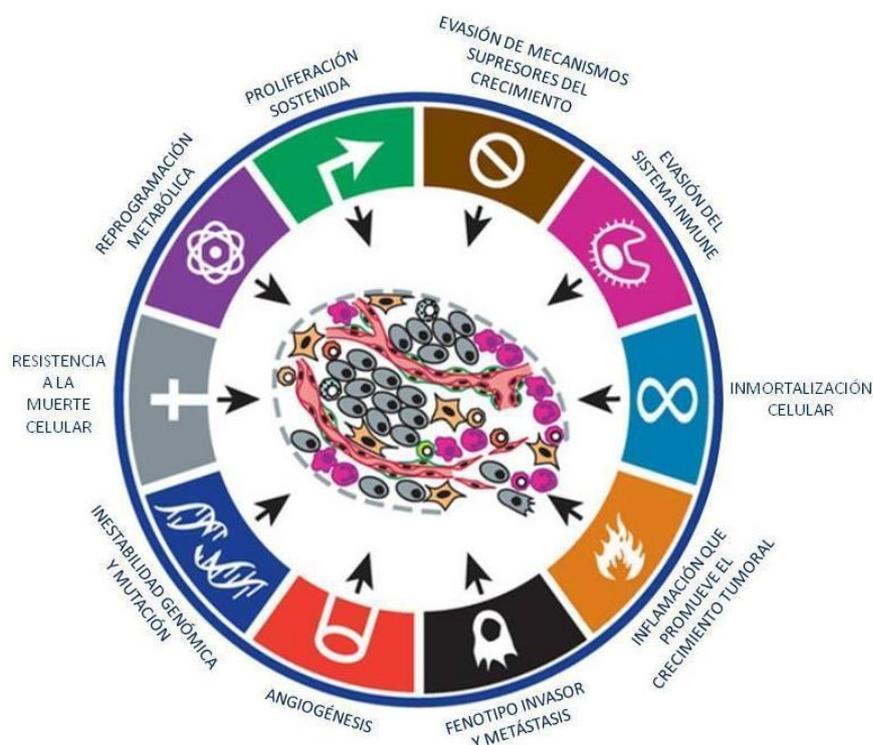


Figura 1.1 - *Hallmarks* del cáncer. Imagen adaptada de (Hanahan and Weinberg, 2011)

## 1.2. Inmunoedición

En 1909 Paul Ehrlich propone por primera vez que el sistema inmune podría tener un efecto protector frente al cáncer. Luego en los años 60, Burnet y Thomas, desarrollan el concepto de inmunovigilancia que postula que las células inmunes son capaces de reconocer células tumorales y eliminarlas. Esta teoría es cuestionada en 1974 por Stutman y colaboradores, que no encontraron diferencias en la susceptibilidad al cáncer de ratones inmunocompetentes en comparación con ratones atímicos. Posteriormente, con el avance de las tecnologías para el desarrollo de ratones transgénicos (ej: ratones RAG  $-/-$ , carentes de células T, B y NKT) y el uso de anticuerpos monoclonales, la teoría se pudo comprobar experimentalmente y surge el concepto de inmunoedición del cáncer. Dicho concepto reconoce el rol dual del sistema inmune, que por un lado promueve la protección del huésped contra el cáncer y por otro facilita el escape del tumor al moldearlo (Fainboim and Geffner, 2011; Murphy and Casey, 2017; Schreiber et al., 2011). El concepto de inmunoedición del cáncer presenta 3 etapas denominadas “3E”: eliminación, equilibrio y escape. Durante la fase de eliminación las células transformadas son destruidas por una respuesta antitumoral efectiva (correspondería al proceso de inmunovigilancia). A medida que transcurre el tiempo surgen células tumorales que son capaces de resistir el control del sistema inmune y proliferar, entran en la fase de equilibrio, donde se da una presión inmunológica selectiva. Finalmente, se da la fase de escape, en la que los tumores “inmunológicamente esculpidos” evaden la respuesta antitumoral y crecen progresivamente al lograr establecer un microambiente tumoral inmunosupresor, en esta etapa es cuando los tumores se vuelven clínicamente detectables (Fainboim and Geffner, 2011; Mittal et al., 2014; Murphy and Casey, 2017; Schreiber et al., 2011) (Figura 1.2).

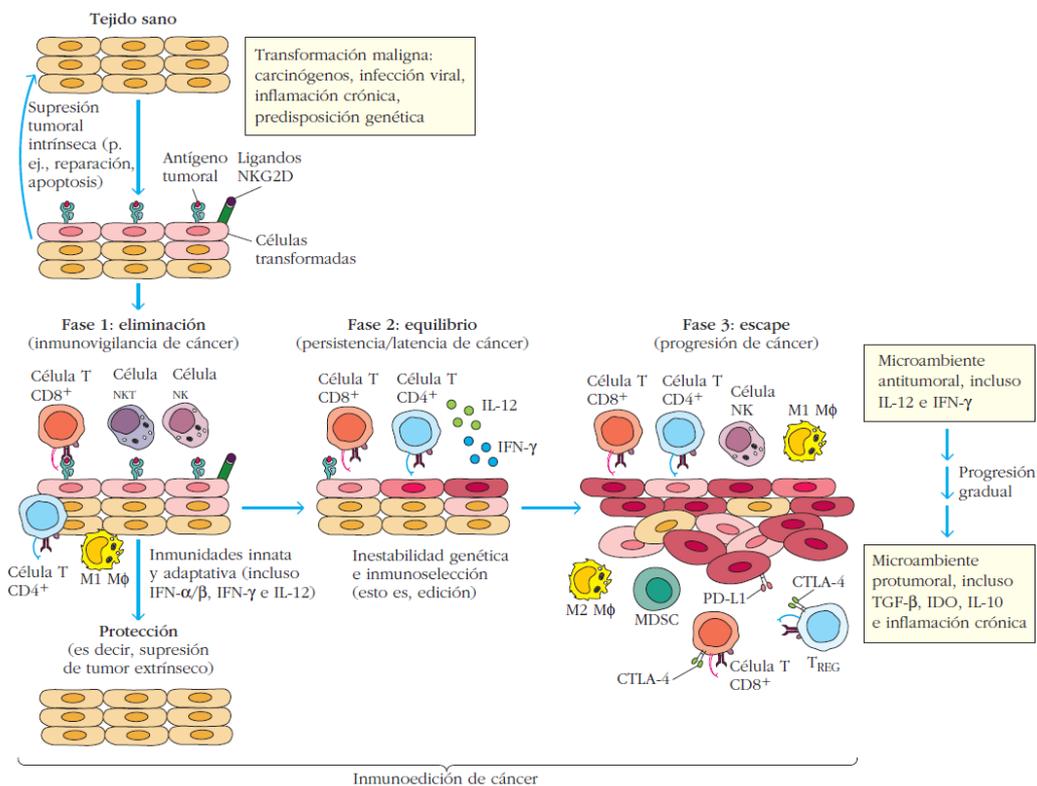
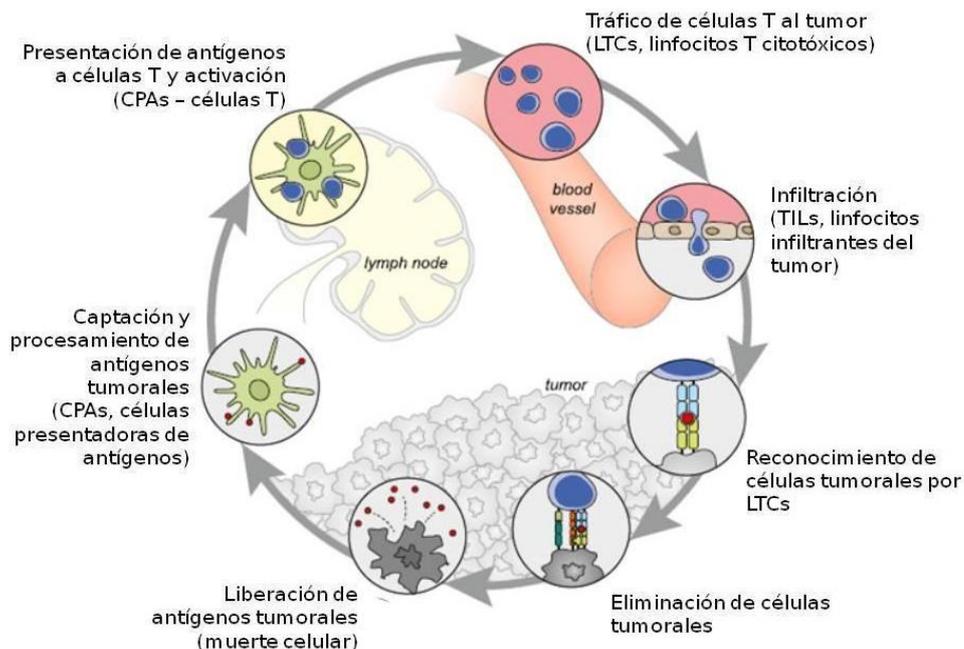


Figura 1.2 - Inmunoedición del cáncer (Owen et al., 2014).

En individuos inmunocompetentes, durante la fase de equilibrio se están removiendo continuamente células tumorales retrasando el crecimiento tumoral (etapa que se puede prolongar por años). Sin embargo, si el sistema inmune se ve comprometido rápidamente se pasa a la fase de escape. Un ejemplo clínico que evidencia la presencia de esta fase es el caso de pacientes que fueron sometidos a trasplantes y desarrollan cáncer a partir de los órganos donados. Un estudio reportó el desarrollo de melanoma en un período de 1-2 años post-trasplante en 2 pacientes que habían recibido un riñón del mismo donante, quien había respondido con éxito a un tratamiento quirúrgico de melanoma maligno 16 años atrás (Murphy and Casey, 2017; Schreiber et al., 2011).

### 1.3. Respuesta inmune antitumoral & mecanismos de evasión

Para que una respuesta inmune antitumoral efectivamente elimine las células tumorales hay una serie de eventos que deben suceder y se han descrito como el “ciclo inmune del cáncer”. En el primer paso de este ciclo, antígenos tumorales o asociados al tumor son liberados y capturados por células dendríticas que los procesarán; para que se inicie una respuesta inmune antitumoral este paso debe ir acompañado de señales inmunogénicas, por ejemplo, citoquinas proinflamatorias y factores liberados por las células tumorales moribundas (DAMPs, patrones moleculares asociados al daño). A continuación, las células dendríticas migran al ganglio linfático donde presentan el antígeno capturado a las células T; las células T específicas del antígeno reconocen el mismo y reciben señales coestimuladoras que conducen a su activación. Finalmente, las células T efectoras citotóxicas se dirigen hacia el tumor, lo infiltran, reconocen a las células tumorales y proceden a la eliminación de estas. La muerte de las células tumorales genera que se liberen antígenos asociados al tumor lo que retroalimenta el ciclo y puede potenciar la respuesta antitumoral generada (Chen and Mellman, 2013) (Figura 1.3). En cada etapa del ciclo descrito anteriormente puede haber señales capaces de estimular o inhibir la respuesta inmune antitumoral, de hecho, en los pacientes con cáncer la *performance* de este ciclo no es la “óptima”, esto se puede deber a que los antígenos tumorales no se están detectando o están siendo tratados como propios y se generen células T reguladoras. También puede suceder que las células T no migren apropiadamente al tumor y no puedan infiltrarlo o que exista un microambiente tumoral inmunosupresor (Chen and Mellman, 2013). Existe una relación compleja entre el cáncer y el sistema inmune, el desafío es intentar comprenderla con el fin de desarrollar estrategias terapéuticas e implementarlas en la clínica.



**Figura 1.3** - Rol de los linfocitos T citotóxicos (LTC) en la respuesta inmune antitumoral, imagen adaptada de (Chen and Mellman, 2013).

Los principales mediadores celulares de la respuesta antitumoral son los linfocitos TCD8+ junto con los linfocitos TCD4+ Th1. Los TCD8+ o LTC (linfocitos T citotóxicos) se encargan de la eliminación de las células tumorales mediante la producción de gránulos citotóxicos (perforinas y granzimas) y por citotoxicidad dependiente de la interacción Fas:FasL. Los linfocitos Th1 colaboran con los LTC y potencian la respuesta inmune antitumoral mediante la secreción de citoquinas y la interacción CD40:CD40L. Las principales citoquinas y quimioquinas involucradas en una respuesta inmune antitumoral son IFN $\gamma$ , IL-12, CXCL9 y CXCL10, que participan en la activación y reclutamiento de linfocitos TCD8+ (Giraldo et al., 2015). También existe un componente humoral en la respuesta antitumoral, se pueden producir anticuerpos contra diversos antígenos tumorales o asociados a tumor capaces de destruir células tumorales mediante la activación del complemento por la vía clásica o mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (macrófagos y células NK portan receptores Fc que reconocen a las células opsonizadas) (Abbas et al., 2015). Las células NK, además, pueden eliminar a las células tumorales directamente, ya que muchas expresan en menor cantidad a los MHC de clase I (que constituyen una señal inhibitoria para las células NK) y expresan ligandos estresores activadores de las NK (por ejemplo MICA y MICB que son reconocidos por NKG2D). El mecanismo que utilizan para eliminar a las células tumorales es la liberación de gránulos citotóxicos (Vesely et al., 2011). Los macrófagos tienen la capacidad tanto de inhibir como de promover el crecimiento y propagación de los tumores, dependiendo de su fenotipo (M1 o M2). Los macrófagos M1, activados de la forma clásica, pueden eliminar a muchas células tumorales por los mismos mecanismos por los que eliminan patógenos (actividad fagocítica, ADCC). Por otro lado, hay pruebas de que algunos macrófagos presentes en los tumores contribuyen con la progresión y tienen un fenotipo M2. Estas células secretan factores de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento transformador B (TGF- $\beta$ ) y otros factores solubles que promueven la angiogénesis tumoral (Goubran et al., 2014). Sumado a esto, las células tumorales

son capaces de desarrollar mecanismos para modular y/o inhibir la respuesta inmune, como la producción de moléculas inmunosupresoras (ej: IL-10 y TGF- $\beta$ ) que tienen un efecto anti-inflamatorio, inhiben la actividad y proliferación de linfocitos citotóxicos e inducen la diferenciación a células T reguladoras, y la expresión de ligandos para receptores inhibitorios expresados en las células T efectoras (ej: PD-L1, PD-L2, galectinas). Los microambientes de algunos tumores también poseen poblaciones de células mieloides supresoras (MDSC) que pueden inhibir la activación de las células T. Además, los tumores pueden producir enzimas que actúan como inmunosupresores locales (ej: indolamina 2,3-dioxigenasa, IDO). Finalmente, las células tumorales pueden producir materiales como el colágeno que crean una barrera física que impide la interacción con las células del sistema inmune (Chen and Mellman, 2013; Goubran et al., 2014; Murphy and Casey, 2017; Owen et al., 2014; Srivastava et al., 2012) (Figura 1.4).

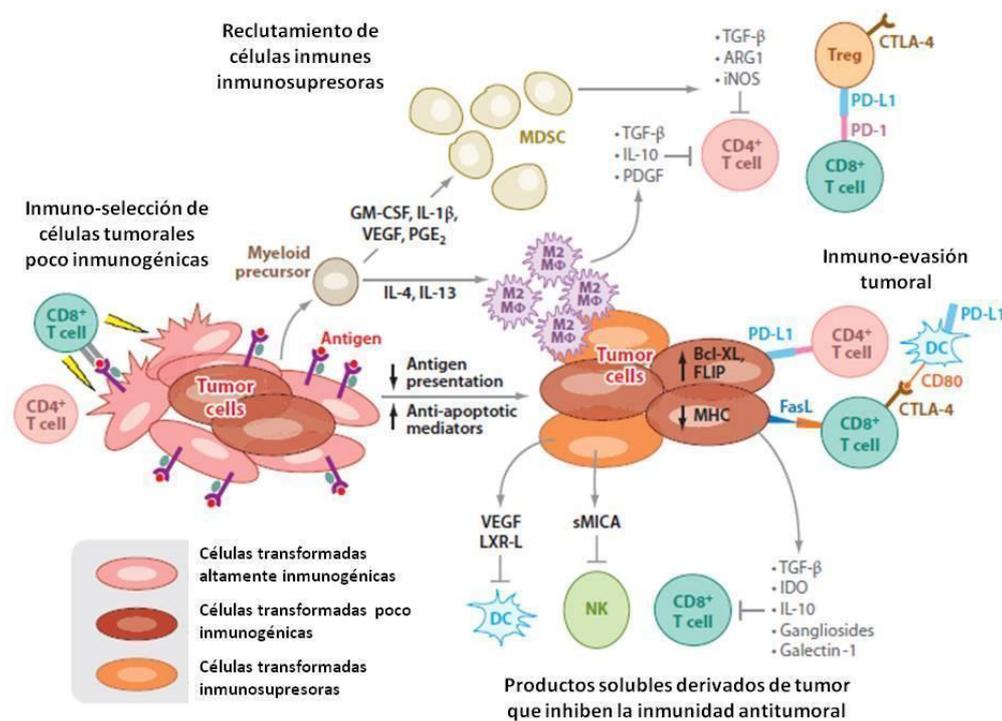


Figura 1.4 - Mecanismos de evasión de la respuesta inmune antitumoral en cáncer. Imagen adaptada de (Vesely et al., 2011).

#### 1.4. Estadificación tumoral

El conocimiento actual de la interacción entre el sistema inmune y las células tumorales ha sentado las bases para poder realizar una estadificación racional de los tumores y establecer estrategias terapéuticas con mayor precisión. Un concepto, que permitió desarrollar una novedosa estadificación en pacientes con tumores malignos, llegó con la observación de que el tipo, densidad y ubicación de células inmunes dentro del tumor podrían predecir la supervivencia en el cáncer colorrectal con mayor precisión que el sistema de estadificación clásico (Galon and Bruni 2019; Lanzi et al. 2020). Esto condujo al desarrollo e implementación del “*Immunescore*” (IS), un sistema de puntuación estandarizado que se basa en la

cuantificación de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs). El IS varía desde cero, donde hay ausencia o baja densidad de TILs, a cuatro, donde hay una alta densidad de TILs. Además, se propuso que la clasificación tomara en cuenta otros factores adicionales a la cantidad de TILs como la expresión de receptores o ligandos de puntos de control inhibidores del sistema inmune (en células T o tumorales, respectivamente), la posible inestabilidad genómica, expresión de neoantígenos y nivel de inmunogenicidad. Tomando en cuenta estas características se pueden clasificar a los tumores en:

- Tumores calientes: aquellos con una alta densidad de TILs (IS alto), expresión de puntos de control inhibidores del sistema inmune (PD1, CTLA4, TIM3, LAG3) y de sus ligandos (PD-L1, PD-L2, galectinas).
- Tumores alterados - inmunosuprimidos: pobre densidad de TILs (IS intermedio), presencia de mediadores inmunosupresores solubles (IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF), presencia de células mieloides supresoras y T reguladoras, expresión de PD1, CTLA4, TIM3, LAG3.
- Tumores alterados - excluidos: no hay TILs en el centro del tumor, sino que se acumulan en los bordes, invasión marginal (IS intermedio), hay activación de vías oncogénicas, modificaciones epigenéticas del microambiente tumoral, vasculatura y/o estroma tumoral aberrante e hipoxia.
- Tumores fríos: ausencia de TILs (IS bajo), son “inmunológicamente ignorantes”, baja expresión de neoantígenos, baja expresión de MHC de clase I, poco inmunogénicos.

Las guías clínicas internacionales recomiendan para la estadificación en cáncer de colon utilizar el sistema TNM (T: tamaño tumoral y extensión del tumor principal, N: diseminación en ganglios linfáticos, M: metástasis) junto con el immunoscore, debido a su gran utilidad clínica al momento de evaluar el riesgo de recurrencia de la enfermedad y decidir el tratamiento más conveniente para el paciente (ESMO, 2020). El gran desafío en la actualidad es dilucidar cómo transformar tumores fríos en calientes, ya que los tumores calientes presentan una mejor tasa de respuesta frente a terapias dirigidas e inmunoterapias (Galon and Bruni, 2019).

## 2. Inmunoterapias

### 2.1. Definición

Las inmunoterapias consisten en el tratamiento de una enfermedad mediante la inducción, mejora o supresión de la respuesta inmune. El cáncer es blanco principal de las terapias que buscan potenciar la respuesta inmune y para esto se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas que consisten en el uso de anticuerpos monoclonales, citoquinas, transferencia adoptiva de células y terapia génica, entre otras (Murphy and Casey, 2017).

Clásicamente las inmunoterapias se pueden clasificar en pasivas y activas, siendo el objetivo de estas últimas inducir una respuesta inmune *in vivo*; y éstas a su vez se pueden clasificar en “específicas” de un blanco molecular o “inespecíficas” que modulan al sistema inmune de forma global (Papaioannou et al., 2016).

### 2.2. Inmunoterapias frente al cáncer

Un agente inmunoterapéutico “ideal” para combatir el cáncer debe ser capaz de discriminar las células tumorales de las normales (específico), ser lo suficientemente potente para poder eliminar un número pequeño o grande de células tumorales (sensible) y, por último, debe ser capaz de prevenir la recurrencia del tumor (durabilidad) (Bergman, 2019).

Las primeras estrategias inmunoterapéuticas desarrolladas frente al cáncer no fueron específicas de tumor. En el siglo XIX el Dr. William Coley observó que algunos pacientes con cáncer que desarrollaban infecciones bacterianas tenían una mayor supervivencia que aquellos que no sufrieron la infección. De modo que Coley utilizó una mezcla de bacterias, conocidas como las “toxinas de Coley”, para tratar pacientes con sarcomas, obteniendo tasas de respuestas completas de aproximadamente el 15%. Debido a las altas tasas de fracaso y a la presencia de efectos secundarios significativos este enfoque terapéutico fue interrumpido. El trabajo de Coley sentó las bases para la modulación inespecífica de la respuesta inmune en el tratamiento del cáncer (Bergman, 2019). Actualmente existen numerosos abordajes de inmunoterapias no específicas de tumor, como el uso de *Salmonella* que describiremos más adelante.

Gracias a los avances biotecnológicos se pudieron desarrollar múltiples herramientas que permitieron expandir el conocimiento sobre los procesos biológicos, tanto a nivel celular como molecular, que ocurren en diversas patologías. Estos avances se vieron acompañados por el crecimiento de campos de estudio como la inmunología, permitiendo su acercamiento a la clínica.

Es posible identificar tres etapas fundamentales que deben lograrse, ya sea de manera espontánea o terapéuticamente, para montar una respuesta inmune antitumoral eficaz. (1) Para iniciar una respuesta inmune las células dendríticas deben capturar antígenos asociados al tumor, éstos los puede cargar *in situ* o pueden ser entregados exógenamente como parte de una vacuna terapéutica. Además, las células dendríticas deben recibir señales de activación adecuadas, permitiendo su maduración, de modo que puedan promover la respuesta inmune deseada. Las señales de activación pueden darse de forma exógena (ligandos de

receptores tipo toll (TLRs), agonistas de receptores activadores como CD40) o endógenas (DAMPs); además algunas formas de quimioterapias o terapias dirigidas promueven un tipo de muerte celular con un fenotipo inmunogénico que contribuye con la activación (Chen and Mellman, 2013). (2) A nivel de los órganos linfáticos las células dendríticas que presenten los antígenos tumorales deben ser capaces de generar una respuesta inmune antitumoral protectora, lo que incluye la producción de linfocitos T citotóxicos, la capacidad de atraer células NK, NKT y generar anticuerpos que puedan contribuir con la respuesta inmune antitumoral. Por tanto, el ganglio linfático es un sitio potencial para dirigir intervenciones terapéuticas, por ejemplo, se pueden proporcionar agentes capaces de perfilar el tipo de respuesta T buscada (Chen and Mellman, 2013). (3) Finalmente, las células T efectoras específicas del tumor deben ser capaces de infiltrar el mismo para llevar a cabo su función adecuadamente.

Los tumores poseen diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune antitumoral: (i) las células tumorales pueden disminuir la expresión de MHC I o la expresión de antígenos tumorales; (ii) pueden expresar moléculas de superficie supresoras (ej: PD-L1, -L2) que se unen a receptores que expresan las células T activadas (ej: PD1) conduciendo a la anergia o agotamiento de las mismas; (iii) las células tumorales son capaces de liberar moléculas inmunosupresoras, como IDO que consume el triptófano y limita la función de las células T; (iv) células mieloides supresoras pueden ser reclutadas en el tumor y liberar moléculas supresoras de células T adicionales como arginasa y óxido nítrico sintasa; (v) la hipoxia en el microambiente tumoral promueve un ambiente inmunosupresor, ya que puede llevar a la producción de CCL28 que recluta células T reguladoras y promueve la generación de adenosina que inhibe la función de las células T efectoras; (vi) las células del estroma tumoral pueden tener un efecto supresor, por ejemplo las células madres mesenquimales bloquean la proliferación y función de las células T efectoras, mientras que las células vasculares del tumor pueden suprimir la adhesión de las células T al endotelio tumoral y prevenir la infiltración, este efecto es mediado en parte por VEGF y en parte por el receptor de endotelina-B (ETBR) (Chen and Mellman, 2013).

Actualmente, la mayoría de las inmunoterapias contra el cáncer que se han aprobado clínicamente tienen a las células T como principal mecanismo efector y pueden dividirse en dos categorías: (i) agentes que son capaces de modular de manera endógena la respuesta de las células T, y (ii) terapias celulares donde células T modificadas constituyen el agente terapéutico. Además, existen dos grandes formas de poder abordar la primera categoría mencionada: utilizando agentes capaces de modular el nivel de diversas citoquinas que influyen en el comportamiento de las células T o utilizando moléculas que bloqueen los puntos de control inhibitorios del sistema inmune (Bucktrout et al., 2018).

### 2.2.1. Citoquinas

El hecho de que las citoquinas puedan incrementar la inmunogenicidad y promover la regresión tumoral condujo a que aumente el interés en el estudio de las mismas y su aplicación clínica en pacientes con cáncer (Chabalgoity et al., 2007). El aislamiento y la clonación de diversos genes de citoquinas ha facilitado su producción a gran escala, se han desarrollado diversas técnicas experimentales y clínicas para

emplear citoquinas recombinantes, ya sea de forma aislada o combinadas, con el fin de potenciar la respuesta inmune antitumoral (Owen et al., 2014).

La IL-2 es una glicoproteína inmunomoduladora producida principalmente por células T CD4+ activadas y, en menor medida, por células T CD8+, NK, NKT y DCs activadas (Floros and Tarhini, 2015). Tiene una gran variedad de efectos inmunológicos incluyendo activación de células T citotóxicas, y activación de células NK en las que induce la producción de IFN $\gamma$ , así como su proliferación y actividad citolítica. Asimismo, promueve la proliferación y activación de células B. Esta citoquina es considerada crucial en la regulación de una respuesta inmune efectiva contra el cáncer. La administración de IL-2 conduce a la liberación de citoquinas proinflamatorias, incluyendo TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IFN $\gamma$ . Sin embargo, también es un potente regulador inmune ya que promueve la expansión de las células T reguladoras, y promueve la muerte celular inducida por la activación (interacción Fas:FasL) (Jiang et al., 2016). La FDA aprobó el uso de IL-2, administrada en altas dosis, para el tratamiento de carcinoma renal metastático en 1992, y para melanoma metastático en 1998, mejorando la supervivencia de los pacientes un 8% y 17% respectivamente. Sin embargo, su uso fue limitado ya que la administración sistémica de IL-2 se asocia a numerosos efectos adversos, observándose fenómenos como el síndrome de fuga capilar acompañado de hipotensión que llevó a sospechar que se encuentra involucrado un receptor endotelial de IL-2 activado (Bucktrout et al., 2018). Posteriormente, una serie de ensayos clínicos en pacientes con melanoma se centraron en estudiar la respuesta terapéutica de IL-2 a altas dosis junto a otras citoquinas (IFN $\alpha$ ) o regímenes de quimioterapia como forma de mejorar las tasas obtenidas (Jiang et al., 2016).

La IL-15 fue inicialmente caracterizada como un factor de crecimiento para las células T con similares propiedades *in vitro* que la IL-2. Los receptores de ambas citoquinas contienen las mismas subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ , y las vías de señalización son similares, por lo que se asumió que tendrían funciones similares. Al igual que la IL-2, la IL-15 activa a las células NK, promueve la proliferación de las células T e induce la generación de células T citotóxicas, facilita la proliferación de células B y la síntesis de inmunoglobulinas. Sin embargo, *in vivo* se ha demostrado que estas dos citoquinas tienen funciones diferentes (Rautela and Huntington, 2017; Waldmann, 2006; Wu, 2013). En las células T CD4+ estimuladas en forma repetitiva por la IL-15 no se promueve la muerte celular inducida por la activación, de hecho, se obtiene el efecto opuesto y además es capaz de inhibir este efecto por la IL-2 (Pulliam et al., 2017). La IL-15 no tiene un efecto en el mantenimiento de la población de células T reguladoras, es capaz de estimular la proliferación de células T CD8+ y permite la supervivencia de células T CD8+ de memoria. Por último, la IL-15 promueve el desarrollo de DCs, activa macrófagos e induce la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de los mismos (Pulendran et al., 2004). Resultados recientes de ensayos clínicos fase I y II mostraron el efecto beneficioso que posee un complejo agonista de IL-15, N-803, en combinación con el bacilo de Calmette-Guerin (BCG) para el tratamiento de pacientes con carcinoma *in situ* de vejiga invasivo no muscular que no respondieron al tratamiento con BCG (Chamie et al., 2019).

Desde hace años se conoce la importancia de los interferones (IFNs) en la inmunovigilancia e inmunoedición del cáncer. Por este motivo la utilización de los mismos podría ser una buena estrategia para el tratamiento antitumoral (Dunn et al., 2006). Se han llevado a cabo ensayos clínicos fase I y II en diversos tipos de

cáncer (mama, ovario, melanoma, renal) utilizando IFNs en combinación con otros tratamientos obteniendo resultados prometedores (Abdolvahab et al., 2020). La FDA aprobó en el año 2011 el uso de IFN pegilado como terapia adyuvante en pacientes con melanoma post cirugía (Herndon et al., 2012).

### 2.2.2. Anticuerpos Monoclonales

El uso de anticuerpos como agentes inmunoterapéuticos se puede abordar desde diversas estrategias que incluyen los anticuerpos monoclonales, anticuerpos anti-idiotipo, anticuerpos conjugados a otros fármacos, toxinas o elementos radiactivos, y variantes de ingeniería como anticuerpos biespecíficos, fragmentos variables de cadena única, anticuerpos de cadena única, entre otros (Bergman, 2019).

La tecnología de hibridomas permitió la producción de anticuerpos monoclonales con especificidad definida y en grandes cantidades. La actividad de los anticuerpos monoclonales como agentes terapéuticos depende de las características del antígeno blanco y del anticuerpo. La molécula diana ideal debería expresarse en niveles altos y estables en todas las células tumorales y no expresarse en tejidos sanos (Cheson and Leonard, 2008).

Los anticuerpos pueden actuar directamente sobre las células tumorales y el efecto antitumoral ocurre por los mismos mecanismos efectores que se dan en la eliminación de patógenos, incluyendo opsonización y fagocitosis, activación del complemento y ADCC. Además, los anticuerpos monoclonales pueden controlar la sobrevida tumoral bloqueando la estimulación de receptores celulares e induciendo la apoptosis, por ejemplo, Trastuzumab que bloquea el receptor HER2 que se encuentra sobre-expresado en el 25% de los cánceres de mama (Alduaj and Illidge, 2011; Pegram et al., 2000; Ross and Fletcher, 1999). Los anticuerpos pueden actuar indirectamente sobre las células tumorales; anticuerpos anti-angiogénicos se utilizan para controlar el desarrollo de la vasculatura tumoral, por ejemplo, Bevacizumab - anticuerpo anti-VEGF, principal factor de crecimiento vascular (Janning and Loges, 2018).

En 1997 la FDA aprobó el primer anticuerpo monoclonal para el cáncer: Rituximab (anti-CD20) para el tratamiento de linfoma no Hodgkin; actualmente hay más de 75 anticuerpos monoclonales aprobados para el tratamiento de diversos tipos de cáncer humanos (Bergman, 2019). Desde su aprobación, Rituximab ha revolucionado las terapias de los tumores malignos de células B, convirtiéndose en un componente estándar para el tratamiento de linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes y leucemia linfocítica crónica (CLL). Desde el año 2015 Rituximab forma parte de la lista modelo de medicamentos esenciales creada por la Organización Mundial de la Salud (Salles et al., 2017). En Uruguay forma parte del listado de medicamentos de alto costo financiados a través del Fondo Nacional de Recursos que cubre el tratamiento de linfopatías tumorales (Fondo Nacional de Recursos, 2019). Rituximab se une con alta afinidad y especificidad al antígeno CD20, expresado en células B malignas; los principales mecanismos efectores implicados en la eliminación de las células CD20+ son citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, fagocitosis celular dependiente de anticuerpos, citotoxicidad dependiente del complemento y efectos tumorales directos a través de apoptosis u otras vías de muerte celular (Salles et al., 2017).

### 2.2.2.1. Bloqueo de puntos de control inhibitorios del sistema inmune

Los anticuerpos monoclonales también pueden contribuir a disminuir la inmunoregulación inducida por las células tumorales, por ejemplo, bloqueando puntos de control inhibidores del sistema inmune. CTLA4 un receptor inhibitorio que regula la activación de las células T en etapas tempranas fue el blanco inicial de este tipo de terapias. El objetivo buscado utilizando este anticuerpo es “liberar” respuestas antitumorales preexistentes y desencadenar nuevas. En el año 2011 la FDA aprueba el anticuerpo anti-CTLA4, Ipilimumab, como tratamiento de primera línea para pacientes con melanoma metastático, basándose en ensayos clínicos de fase III que mostraron una prolongación en la supervivencia de los pacientes (Hodi et al., 2010). A pesar de los resultados alentadores, el uso de Ipilimumab representó desafíos clínicos y científicos. Como anticipaba el fenotipo autoinmune letal de los ratones KO para CTLA4, se observaron eventos adversos graves vinculados con fenómenos autoinmunes en 10-35% de los pacientes que recibieron esta terapia de bloqueo (Farkona et al., 2016). CTLA4 es importante para el mantenimiento de la función supresora de las células T reguladoras y, por tanto, al administrar esta terapia también se pierde la función de esta población celular encargada de mantener la tolerancia (Mellman et al., 2011).

De todas formas, el éxito de la terapia con anti-CTLA4 en melanoma generó interés en evaluar otros anticuerpos que puedan ser utilizados para activar la respuesta de las células T. Hay un número de receptores activadores conocidos que podrían ser blancos de anticuerpos agonistas incluyendo 4-1BB, OX40, GITR, CD27 y CD28. Este último, sin embargo, introduce una nota de precaución ya que en un ensayo clínico utilizando un anticuerpo agonista a CD28 se observaron severos casos de toxicidad e incluso de muerte a causa de una gran e inesperada liberación de citoquinas. Estos eventos enfatizan el poder que posee el sistema inmune y la necesidad de tener cuidados extremos y diseñar ensayos clínicos conservadores cuando se va a emplear un activador inmune. El uso de moléculas más pequeñas que tengan un *clearance* más rápido podría mitigar este tipo de toxicidades modulando la respuesta, por ejemplo el uso de fragmentos de anticuerpos u otro tipo de moléculas como aptámeros (Mellman et al., 2011), como se verá más adelante.

Otro punto de control inhibitorio del sistema inmune involucra al receptor PD1 y sus ligandos PD-L1 y PD-L2. PD1 es expresado en células T efectoras y cuando se une a su ligando envía señales que inhiben la proliferación celular, la liberación de citoquinas y las funciones efectoras. Se ha observado en modelos tumorales que la señal enviada por PD1 inhibe a las células T y bloquea la respuesta inmune antitumoral luego de que se une a PD-L1 expresado a nivel del tumor. Además, se demostró en ensayos preclínicos que impedir la interacción entre PD1:PD-L1 puede aumentar la respuesta T *in vitro* y mediar la actividad antitumoral. Anticuerpos monoclonales anti-PD1 o anti-PD-L1 alcanzaron la clínica y se obtuvieron resultados prometedores en varios tipos de cáncer. Pembrolizumab y Nivolumab, dos anticuerpos anti-PD1, fueron aprobados por la FDA para el tratamiento de melanoma y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), Nivolumab también fue aprobado para el tratamiento de carcinoma renal (Farkona et al., 2016). En Uruguay desde el año 2020 Pembrolizumab forma parte del listado de medicamentos de alto costo financiados a través del Fondo Nacional de Recursos para el tratamiento de melanoma cutáneo y cáncer de pulmón metastático (Fondo Nacional de Recursos, 2020a, 2020b).

Se han identificado múltiples puntos de control inhibidores del sistema inmune que podrían ser blancos prometedores de nuevas terapias. Algunos ejemplos de moléculas que han sido evaluadas en ensayos preclínicos e incluso ensayos clínicos son las proteínas LAG3 y TIM3. Se ha identificado la expresión progresiva de LAG3 en células T durante su agotamiento y es un marcador selectivo de células T reguladoras lo que sugiere que puede tener un rol en la supresión inmune generada por los tumores. TIM3 es expresada en varias poblaciones de células T y también por células de la inmunidad innata como DCs; la coexpresión de TIM3 con PD1 en células T CD8+ infiltrantes de tumor refleja la implicancia que puede tener esta molécula en la respuesta antitumoral y se han comenzado a explorar terapias combinadas que bloqueen ambas proteínas (Farkona et al., 2016).

### 2.2.3. Transferencia adoptiva de células

La transferencia adoptiva de células es un tipo de inmunoterapia que consiste en extraer células con actividad antitumoral de la sangre del paciente o de tumores sólidos, expandirlas en número y potenciar su actividad antitumoral, y posteriormente re-infundirlas al paciente. Los efectores celulares más evaluados en este tipo de terapias son los linfocitos T, las células NK, NKT, NKT invariantes, NK inducidas por citoquinas y células dendríticas (Abbas et al., 2015; Ruella and Kalos, 2014).

El primer uso clínico de células NK para el tratamiento del cáncer implicaba la infusión a pacientes con células activadas *ex vivo* con IL-2, NK activadas por linfoquinas (LAK). La eficacia clínica de este tratamiento se vio limitada por la toxicidad de la IL-2 y posiblemente por la expansión de células T reguladoras por parte de esta citoquina (Morvan and Lanier, 2016).

La transferencia adoptiva de células T involucra la expansión *ex vivo* de células T específicas de tumor y la infusión de estas células a los pacientes. Las células pueden expandirse *in vitro* por varios métodos como el tratamiento con IL-2, anticuerpos anti-CD3 y utilizando células presentadoras de antígenos alogénicas que provean una señal coestimuladora. Se ha visto que la terapia de transferencia adoptiva de células T es más efectiva si el paciente es inmunosuprimido antes de recibir el tratamiento y si se administra sistemáticamente IL-2 (Farkona et al., 2016; Murphy and Casey, 2017).

Otro abordaje que ha despertado un gran interés es el uso de vectores retrovirales que transfieren genes de receptores T específicos de tumor, TCR, en células T de los pacientes antes de su re-infusión. Este método no presenta requerimientos de histocompatibilidad ya que las células que se van a transfundir son derivadas del mismo paciente. El uso clínico de TCRs con alta avidéz ha sido asociado con una destrucción significativa de tejidos sanos que expresan el mismo antígeno blanco (Farkona et al., 2016; Murphy and Casey, 2017).

Existe otra forma de inmunoterapia adoptiva que también utiliza retrovirus para introducir genes en células T de los pacientes e involucra la expresión de un nuevo tipo de receptor conocido como CAR, receptor quimérico de antígeno. CARs son receptores que contienen un dominio extracelular de reconocimiento específico del antígeno, codificado por los genes variables de inmunoglobulinas, fusionado a un dominio intracelular que provee señales de activación y coestimulación. Cuando

estos receptores quiméricos son expresados por células T el producto se conoce como células CAR-T. Una importante ventaja que confiere esta estrategia es que el blanco puede ser cualquier molécula capaz de ser reconocida por un anticuerpo, no hay restricciones por el complejo MHC unido a un péptido (Murphy and Casey, 2017).

Muchos de los estudios publicados sobre el tratamiento de neoplasias de células B con CAR-T utilizan células dirigidas a CD19 (Maher, 2014; Matsuki and Younes, 2016). La mayor experiencia clínica ha sido para el tratamiento de leucemia linfocítica aguda en recaída o refractaria, donde se han obtenido respuestas completas en un porcentaje cercano al 90%. Este tipo de terapias siempre van acompañadas de efectos adversos y hay que tener presente que aquí se están eliminando también las células B normales de los pacientes por lo que estos pacientes van a requerir ser tratados con inmunoglobulinas (Geyer and Brentjens, 2017; Tang et al., 2016). En el año 2017 la FDA aprobó la inmunoterapia con células CAR-T para el tratamiento de leucemia linfocítica aguda (FDA, 2017).

En el año 2010 la FDA aprobó el uso de Provenge para el tratamiento del cáncer de próstata avanzado. Provenge® (o sipuleucel-T) fue la primera vacuna contra el cáncer en ser licenciada (Riedmann, 2012). Esta clase de inmunoterapia se centra en el uso de células dendríticas (DCs), que son capaces de modular la respuesta inmune mediada por las células T. Las DCs pueden ser aisladas de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) que generalmente se encuentran en un estado inmaduro. Luego de pasar por un proceso de maduración las DCs pueden estimular la activación de linfocitos T CD8+ específicos de tumor autólogos, que son capaces de reducir masas tumorales; la maduración resulta ser un proceso clave ya que DCs inmaduras pueden inducir una respuesta tolerogénica a estos antígenos específicos o simplemente no generar una respuesta. Se han desarrollado diversos protocolos (ej: Provenge®) para la generación de DCs cargadas con antígenos tumorales, su expansión, maduración y finalmente su re-infusión en los pacientes (Gorabi et al., 2020).

#### 2.2.4. Microorganismos vivos

Actualmente el desarrollo de terapias antitumorales basadas en microorganismos vivos está nuevamente en foco de investigación (Forbes et al., 2018). Las características del microambiente tumoral, incluyendo vasos sanguíneos anormales, regiones hipóxicas y necróticas, hacen que sea propicio para la colonización por bacterias anaerobias obligadas (como *Clostridium* y *Bifidobacterium*) y facultativas (como *Streptococcus*, *Escherichia*, *Listeria* y *Salmonella*). Se han evaluado terapias basadas en la administración de bacterias solas y también usando a las bacterias como vectores de antígenos tumorales o genes terapéuticos (Duong et al., 2019). Las bacterias, al administrarse sistémicamente, llegan al tumor mediante mecanismos pasivos y activos. Los mecanismos pasivos dependen del microambiente tumoral, los vasos sanguíneos anormales y el proceso inflamatorio que se genera, llevan a que el flujo se dirija hacia el tumor. Los mecanismos activos dependen de la movilidad de las bacterias que les permite penetrar en zonas más profundas del tumor y su metabolismo les permite crecer en esas zonas. Las interacciones que se dan entre las bacterias, las células tumorales y el microambiente tumoral producen cambios en el infiltrado

de células inmunes del tumor, citoquinas y quimioquinas, que conducen a la regresión tumoral (Duong et al., 2019).

Una de las formas más antiguas y eficaces de inmunoterapia basada en microorganismos vivos ha sido la utilización de BCG, una forma atenuada del bacilo *Mycobacterium bovis*, que ha demostrado ser un potente estimulador del sistema mononuclear fagocítico (Al-Hilu and Al-Shujairi, 2020). Aprobado por la FDA en 1990, actualmente sigue siendo el tratamiento de primera línea para el carcinoma superficial de vejiga junto con la resección transuretral de los pólipos (American Cancer Society, 2020).

La utilidad de las bacterias anaerobias estrictas como terapia antitumoral se encuentra limitada porque sólo colonizan y replican en condiciones de anoxia y por ello no lo hacen en metástasis o pequeños tumores; este impedimento se puede sortear utilizando bacterias anaerobias facultativas como *Salmonella* (Pawelek et al., 2003).

#### 2.2.4.1. *Salmonella* & Cáncer

En 1997 Pawelek demostró que la inoculación de cepas de *Salmonella* atenuada a animales portadores de melanoma genera replicación bacteriana preferencial en el tejido tumoral, en especial en las áreas necróticas del mismo, acompañada de un crecimiento tumoral más lento y un aumento en la sobrevida de los animales (Pawelek et al., 1997). Como se mencionó anteriormente, al tratarse de una bacteria anaerobia facultativa tiene la capacidad de colonizar tumores grandes y pequeños. Además, se ha demostrado que actúa como inhibidor de la metástasis en melanoma llevando a una reducción sustancial en tamaño y número de micrometástasis (Luo et al., 2000; Pawelek et al., 2003).

La manipulación de *Salmonella* resulta sencilla, puede ser fácilmente modificada a través de mutaciones genéticas seleccionadas, lo que permite generar cepas recombinantes atenuadas con ciclos de replicación limitados y pérdida de virulencia (Low et al., 2004). Además, se puede utilizar como vector de entrega de moléculas terapéuticas, para transportar genes o sintetizar citoquinas, prodrogas, antígenos tumorales y factores anti-angiogénicos, entre otros (Figura 1.5) (Luo et al., 2000; Moreno et al., 2010; Pawelek et al., 2003). *Salmonella* ha sido usada como una terapia antitumoral efectiva en distintos modelos de cáncer incluyendo melanoma, colon, mama, pulmón, renal, hepático, próstata y hematológicos (Mi et al., 2019; Pangilinan and Lee, 2019). Se han llevado a cabo ensayos clínicos fase I y II que demuestran la bioseguridad del uso de *Salmonella* atenuada en humanos, tanto en individuos sanos como en pacientes con cáncer, con baja toxicidad (Cunningham and Nemunaitis, 2001; Kirkpatrick et al., 2006; Niethammer et al., 2012; Tacket et al., 2000). Existen más de 25 años de experiencia con una vacuna patentada a *Salmonella* viva atenuada *S. Typhi* Ty21a (Vivotifs, Crucell/Berna biotech) (Kopecko et al., 2009).

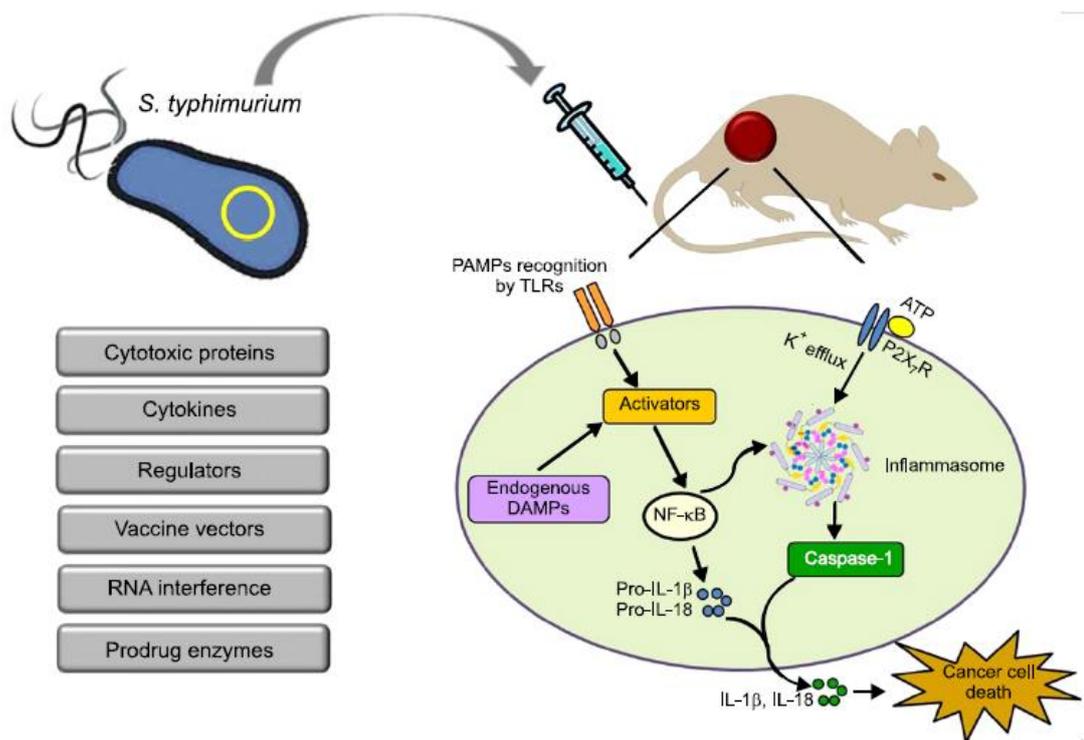
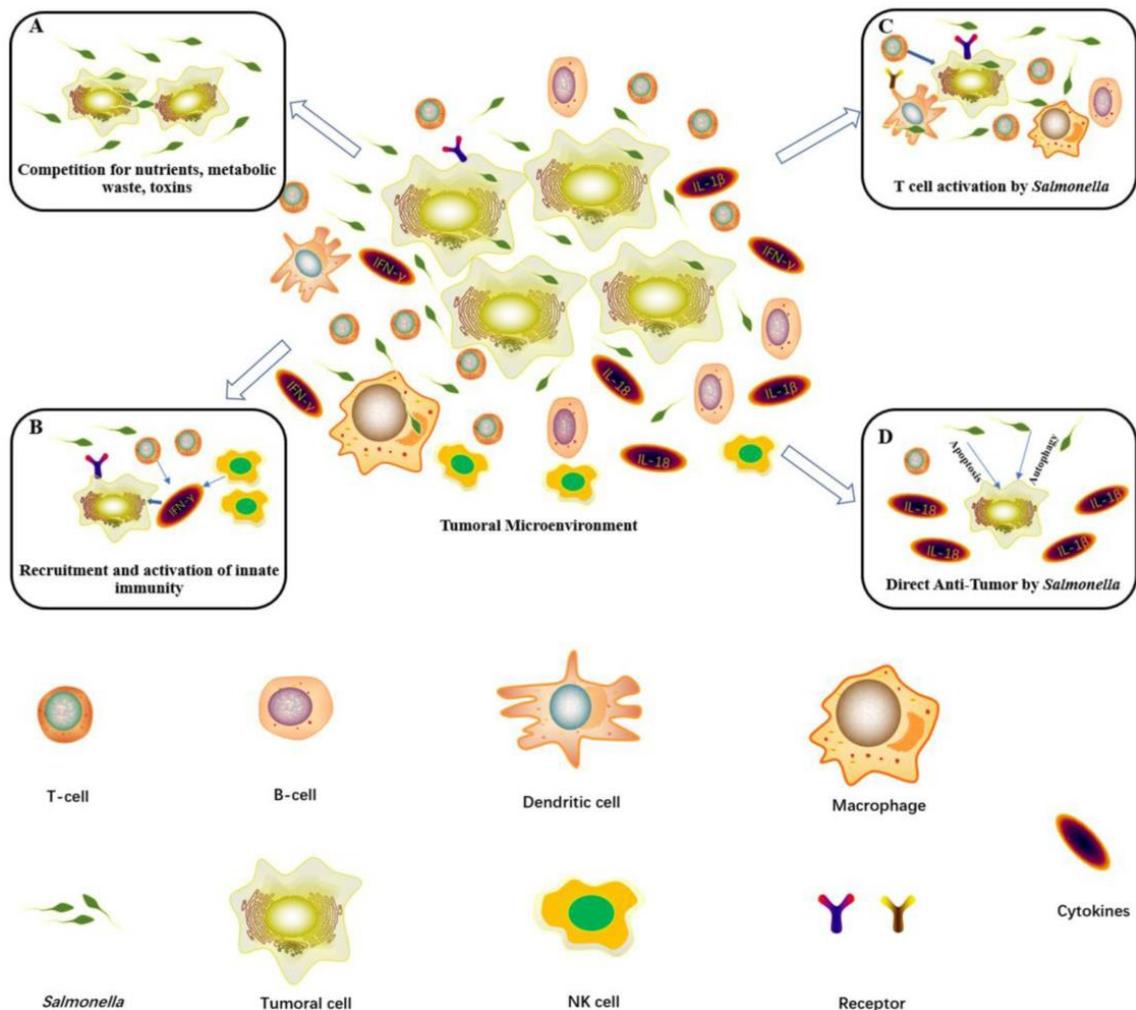


Figura 1.5 - Uso de *Salmonella* como terapia antitumoral. Imagen extraída de (Zheng and Min 2016).

Como se mencionó anteriormente, la naturaleza del microambiente tumoral suele ser inmunosupresora, las células tumorales escapan de la acción de las células inmunes limitando su maduración y la infiltración de las mismas. La administración sistémica de *Salmonella* atenuada activa la inmunidad antitumoral y lleva a la regresión del tumor mediante diversos mecanismos (Figura 1.5) (Zheng and Min, 2016). Uno de los mecanismos que explica el efecto antitumoral es la estimulación de la respuesta inmune en el hospedero (Figura 1.6). *Salmonella* expresa componentes bacterianos conservados llamados PAMPs (patrones moleculares asociados al patógeno) que son reconocidos por receptores de la inmunidad innata, PRR (receptores de reconocimiento de patrones) que al activarse transducen diversas señales que llevan a la secreción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas. PAMPs como LPS, flagelina o motivos CpG son fuertes agonistas de TLRs (Lee et al., 2008), *Salmonella* también activa al inflammasoma en etapas tempranas de la colonización de los tejidos cancerosos mediante la familia de receptores tipo NOD (NLRs). El inflammasoma NLRC4 reconoce la flagelina inyectada en el citoplasma por los sistemas de secreción bacterianos y el inflammasoma NLRP3 es activado por señales endógenas de peligro, DAMPs o PAMPs acompañados de un aumento del eflujo de potasio. La activación de caspasa-1 por los inflammasomas lleva al clivaje de pro-IL-1β y pro-IL-18 a sus formas activas IL-1β e IL-18. El contexto proinflamatorio que se genera conduce al reclutamiento y activación de células inmunes, convirtiendo el microambiente tumoral inmunosupresor en un ambiente inmunocompetente (Shahabi et al., 2010; Zheng and Min, 2016). Se ha demostrado que la activación del inflammasoma NLRP3 inducido por *Salmonella* tiene un rol esencial en el efecto antitumoral dependiente de caspasa-1. Hay un aumento en la expresión de caspasa-1 en los macrófagos del tipo M1, no así en M2,

sugiriendo el rol central de *Salmonella* en la polarización de los macrófagos hacia el perfil M1 (Mónaco, Chilibroste, et al. 2021). Sumado a esto, se demostró que *Salmonella* es capaz de inducir la producción de trampas extracelulares en macrófagos (METs) (Mónaco et al., 2021a). Además, se ha descrito que *Salmonella* reduce la expresión deIDO y esto incrementa el infiltrado de linfocitos T citotóxicos (Kuan and Lee, 2016). Trabajos realizados en varias líneas celulares de tumores murinos y humanos probaron que *Salmonella* reduce la expresión de PD-L1, esto podría conducir a una mayor activación de los linfocitos T (Chen et al., 2020). Los linfocitos T tienen una participación activa en el efecto antitumoral de *Salmonella*, esto se demostró en estudios que se utilizaron ratones deficientes de células T (Lee et al., 2011). Sumado a lo anterior, *Salmonella* es capaz de infectar células presentadoras de antígeno *in vivo*, facilitando la presentación de antígenos asociados al tumor (TAA) tanto en el contexto del MHC de clase I, como del MHC de clase II directamente al sistema inmune, al mismo tiempo que inducen una respuesta inmune innata mediante la producción de mediadores inmunes como IL-12, contexto ideal para la generación y activación de linfocitos T específicos (Saccheri et al., 2010).

Otro mecanismo que explica el efecto antitumoral de *Salmonella* es la competencia por los nutrientes, ya que la bacteria al estar replicándose rápidamente priva a las células tumorales de nutrientes lo que lleva a la muerte de las mismas (Zheng and Min, 2016). Además, se ha descrito que *Salmonella* tiene un efecto antitumoral directo desencadenando apoptosis y piroptosis en células tumorales (Chang and Lee, 2014; Mónaco, 2021). Se ha observado que el tratamiento con *Salmonella* en B16F10, modelo de melanoma murino, incrementa la expresión de caspasa-3 clivada requerida en la activación de la cascada de caspasas que conduce a la apoptosis. También se ha visto tras el tratamiento con *Salmonella* un aumento de Beclin-1, una de las proteínas más importantes en la regulación de la autofagia, acompañado de la conversión de LC3-I en LC3-II, un marcador autofagosomal. La activación de la vía de señalización autofágica está mediada por la regulación a la baja de AKT/mTOR/p70S6K, que es un blanco crucial de *Salmonella* en las células tumorales (Pangilinan and Lee, 2019).



**Figura 1.6** - Mecanismos de acción que explican el efecto antitumoral de *Salmonella*. Imagen extraída de (Mi et al., 2019).

Hace algunos años, el Departamento de Desarrollo Biotecnológico comenzó a explorar el uso de *Salmonella* atenuada para el tratamiento de cáncer. En este contexto se construyó una cepa atenuada de *Salmonella* Typhimurium denominada LVR01, que presenta una mutación metabólica en el gen *aroC* (*aroC*<sup>-</sup>) (Chabalgoity et al., 2000). Diversos trabajos fueron llevados a cabo donde se pusieron a punto modelos de melanoma, leucemia mieloide aguda, linfoma no-Hodgkin a células B y cáncer de mama; éstos demostraron que las inmunoterapias basadas en *Salmonella* LVR01, ya sea sola, combinada o como vector para la administración de citoquinas, pueden constituir una alternativa para el tratamiento de estos tipos de tumores (Agorio et al., 2007; Bascuas et al., 2018; Chilibroste et al., 2021; Grille et al., 2014, 2013; Kramer et al., 2015; Mónaco, 2021; Vola et al., 2018). En trabajos recientes realizados por integrantes del grupo de investigación se ha avanzado en la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares por los que *Salmonella* LVR01 ejerce su efecto antitumoral en melanoma (Mónaco, 2021; Mónaco et al., 2021b; Plata, 2021).

### 2.2.5. Aptámeros

Los aptámeros son moléculas sintéticas conformadas por secuencias cortas de oligonucleótidos (ssDNA o RNA) con una estructura tridimensional caracterizada por bucles, tallos u horquillas que tienen la capacidad de unirse a un blanco determinado con alta afinidad (rango de  $K_d$  picomolar - nanomolar bajo) y especificidad. De esta forma, comparten propiedades funcionales con los anticuerpos monoclonales (con frecuencia son llamados “anticuerpos químicos”) (Famulok and Mayer, 1999; Kovacevic et al., 2018). Los aptámeros pueden unirse a una gran variedad de blancos como proteínas, células, bacterias, viriones y varias moléculas pequeñas orgánicas e inorgánicas por complementariedad espacial y por medio de interacciones electrostáticas/iónicas, enlaces de hidrógeno, fuerza de van der Waals, así como como interacciones hidrofóbicas (Fu and Xiang, 2020). Son seleccionados de una biblioteca de secuencias al azar de 20-60 ácidos nucleicos ( $> 1 \times 10^{14}$ ) mediante SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Dicha metodología permite enriquecer las secuencias más afines y específicas tras varias rondas de incubación con el blanco molecular de interés y de amplificación (Ellington and Szostak, 1990; Tuerk and Gold, 1990). Generalmente el procedimiento incluye tres etapas que se repiten para generar aptámeros específicos a un blanco. En la primera etapa se incuba la biblioteca junto con la molécula blanco y los aptámeros específicos se unen a la misma. La segunda etapa consiste en la partición, se realizan lavados para obtener los complejos blanco-aptámero y luego se separan. En la tercera etapa se da la amplificación de las secuencias obtenidas mediante PCR o RT-PCR (para aptámeros ADN o ARN respectivamente). Se realizan varias rondas de selección, por último, los aptámeros de la ronda final son secuenciados y se identifican aquellos que se unen con mayor especificidad y afinidad al blanco (Ning et al., 2020) (Figura 1.7).

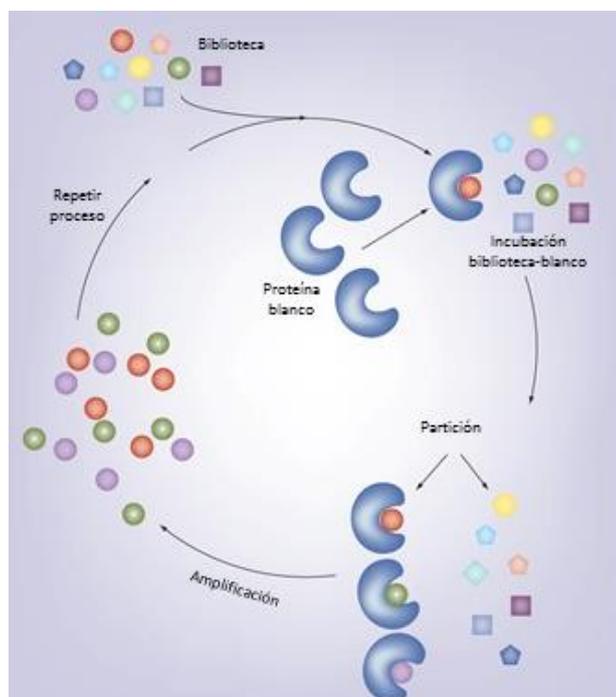


Figura 1.7 - Método de selección de aptámeros, SELEX. Imagen adaptada de (Barbas et al., 2010).

Al igual que los anticuerpos monoclonales, los aptámeros pueden utilizarse en el laboratorio y en la clínica, como herramientas de investigación, diagnóstico y/o tratamiento (Fu and Xiang, 2020). Los aptámeros presentan ciertas ventajas respecto a los anticuerpos monoclonales, particularmente para las aplicaciones *in vivo*. Tienen un tamaño menor (aproximadamente 10 veces más pequeño que un anticuerpo) lo que le permite una penetración superior y más rápida en los tejidos (Chen et al., 2017; Fu and Xiang, 2020; Liu and Guo, 2020). Son poco o nada inmunogénicos y no son tóxicos, esto resulta de gran importancia para su aplicación clínica, ya que no habría impedimentos en el uso reiterado de los mismos (Chen et al., 2017; Fu and Xiang, 2020). Su producción es mediante síntesis química lo que reduce el costo, aumenta la reproducibilidad y disminuye los tiempos, ya que no requiere de la inmunización de animales ni el uso de células (Fu and Xiang, 2020; Liu and Guo, 2020). Los aptámeros pueden modificarse fácilmente para otorgar otras propiedades y también para aumentar su estabilidad, siendo de gran importancia para los aptámeros ARN porque son más vulnerables a la degradación por nucleasas, altas temperaturas, medios alcalinos, entre otros (Lakhin et al., 2013). Son muy estables en rangos amplios de temperatura y pH, e incluso si se llegan a desnaturalizar pueden fácilmente volver a adoptar su estructura tridimensional original (Fu and Xiang, 2020).

Una de las principales limitaciones de los aptámeros es su susceptibilidad a ser rápidamente degradados en medios biológicos y en particular en el torrente sanguíneo. Se ha descrito que el tiempo promedio en que un aptámero decae en sangre es de minutos, esto hace que la aplicación terapéutica sea muy difícil (Lakhin et al., 2013). Sin embargo, se han desarrollado diversas estrategias para poder extender su vida media en plasma. Una estrategia convencional es utilizar nucleótidos modificados, y modificaciones en los extremos 5' y 3', lo que los protege de la degradación por nucleasas. Algunos aptámeros sin modificar tienen la capacidad de resistir a la degradación, se ha observado que en estos casos los aptámeros adoptan una estructura tridimensional que protege sus extremos 5' y 3' impidiendo la degradación por exonucleasas. También se ha desarrollado una estrategia más novedosa para evitar la degradación, que consiste en la generación de "aptámeros en espejo" (Spiegelmers); la particularidad de estos aptámeros es que están compuestos por L-oligonucleótidos y las nucleasas sólo clivan D-oligonucleótidos, si bien su producción puede resultar un poco más compleja estos aptámeros son muy estables y resistentes a la degradación enzimática (Lakhin et al., 2013). Los aptámeros presentan una rápida eliminación del organismo por vía urinaria, debido a que los riñones son capaces de remover sustancias con pesos moleculares menores de 30-50 kDa y en general el tamaño de los aptámeros oscila entre 5-15 kDa. Para aplicaciones terapéuticas es muy común la conjugación del aptámero con PEG (polietilenglicol) que tiene un peso molecular de 20 o 40 kDa, lo que conduce a extender la vida media del aptámero en la circulación (Lakhin et al., 2013).

#### 2.2.5.1. Aplicaciones - Diagnóstico y Terapia

Los aptámeros han sido desarrollados para diagnóstico, tanto como herramienta de imagenología molecular, o como biosensores en la detección de células tumorales

o proteínas asociadas a tumores en el caso de patologías oncológicas (Ma et al., 2015).

En terapia se han estudiado como biomolécula terapéutica *per se* o como vector de transporte de drogas (Ma et al., 2015). Muchas drogas utilizadas en tratamientos clínicos no discriminan precisamente entre células normales y células afectadas, lo que lleva a que tengan un efecto tóxico en células patológicas pero también se produzcan efectos adversos en las células normales. Por esto, resulta relevante implementar terapias selectivas y eficaces que generen la mínima toxicidad posible. Las terapias “guiadas” permiten una entrega de las drogas o agentes biológicos más específica disminuyendo los efectos adversos. Una estrategia para alcanzar este propósito es el desarrollo de diferentes plataformas, donde aptámeros que se unen a biomarcadores específicos de una patología son utilizados como vectores de transporte del agente terapéutico (Ning et al., 2020).

Por todas las características mencionadas anteriormente, se ha descrito que los aptámeros poseen un potencial prometedor para el tratamiento del cáncer (Fu and Xiang, 2020). Pueden unirse a factores de crecimiento o citoquinas e impedir su interacción con su receptor, o pueden bloquear al receptor, inhibiendo el crecimiento de tumores (Fu and Xiang, 2020). Se han desarrollado aptámeros ARN anti-PSMA (antígeno prostático específico de membrana) con capacidad de inhibir la actividad enzimática de PSMA, reduciendo la capacidad migratoria e invasiva de las células cancerosas prostáticas *in vitro*. El aptámero A9g (anti-PSMA) demostró ser seguro y no tóxico en estudios *in vivo* (Ning et al., 2020). También se ha trabajado en un aptámero anti-HER2 (receptor de factor de crecimiento epidermal humano 2), un receptor de tirosina quinasas expresado en una gran variedad de cánceres como de mama y gástrico. Se diseñó un aptámero trimérico anti-HER2, en los ensayos realizados observaron una inhibición en el crecimiento de células tumorales gástricas y en estudios preclínicos se observó una disminución en el volumen tumoral de tumores HER2 positivos (Ning et al., 2020). Existe una gran variedad de aptámeros descritos con capacidad para modular la respuesta inmune contra el cáncer, ya sea mediante la activación o bloqueo de receptores inmunes (Soldevilla et al., 2016). Entre ellos se destacan los aptámeros contra receptores involucrados en puntos de control del sistema inmune como CTLA4, PD1 y TIM3. El primero utilizado para manipular la respuesta inmune en cáncer fue un aptámero ARN antagonista de CTLA4. Se observó que el mismo se unía a CTLA4 con gran afinidad y especificidad, siendo capaz de inhibir *in vitro* la función de CTLA4 y aumentar la respuesta antitumoral en ratones. Además, en este estudio se observó que su conformación tetramérica mejoraba significativamente su bioactividad tanto *in vivo* como *in vitro* (Fu and Xiang, 2020; Santulli-Marotto et al., 2003). También se han desarrollado aptámeros ADN que se unen específicamente al dominio extracelular de PD1 y bloquean la interacción PD1:PD-L1 en ratones. La forma PEGilada de este aptámero obtuvo un efecto antitumoral comparable al anticuerpo anti-PD1 en un modelo murino de cáncer de colon que expresa PD-L1 (Fu and Xiang, 2020; Prodeus et al., 2015). Otros estudios reportaron que aptámeros ADN anti PD-L1 humano bloquean la interacción PD1:PD-L1 en humanos, promoviendo la proliferación linfocitaria *in vitro* y suprimiendo el crecimiento tumoral, *in vivo*, con mínima toxicidad en riñón e hígado. En los tumores tratados con esta terapia se observó una elevada infiltración de linfocitos TCD4+ y TCD8+, y niveles aumentados de IL-2, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , CXCL9 y CXCL10 (Fu and Xiang, 2020; Lai et al., 2016). El aptámero TIM3Apt, se une al dominio extracelular de TIM3 con

alta afinidad y especificidad. Su conformación monomérica tiene una potente capacidad antagonista en linfocitos que expresan TIM3. La terapia combinada utilizando TIM3Apt junto con un anti-PD-L1 demostró tener un efecto sinérgico en un modelo murino de cáncer de colon (Hervas-Stubbs et al., 2016). Un aptámero anti-TIM3 de conformación trimérica bloquea la interacción TIM3:Galectina-9 y promueve la secreción de citoquinas, proliferación celular y disminución de la muerte celular *in vitro*. En modelos de ratones portadores de tumores, el mismo produjo un enlentecimiento del crecimiento tumoral y un aumento de la supervivencia global, utilizándolo como monoterapia o en terapia combinada con anti-PD1 (Gefen et al., 2017).

### 2.2.5.2. Uso en la clínica -Terapia

En el año 2004, la FDA aprobó la primera formulación en base a aptámeros para aplicaciones terapéuticas. Se trata de un aptámero anti-VEGF (Macugen®, de OSI Pharmaceuticals) y se usa para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad (Tabla 1.1) (Fu and Xiang, 2020; Ruckman et al., 1998). Varios aptámeros se han estado estudiando en fase clínica, siendo la mayoría de las publicaciones en el área oncológica. El primer aptámero estudiado en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer fue AS1411, que se une específicamente a nucleolina, una proteína altamente expresada en células tumorales que se relaciona con el crecimiento celular, proliferación y supervivencia. Cuando AS1411 se une a su molécula blanco, el complejo AS1411-nucleolina es internalizado en la célula y conduce a una inhibición de la replicación del ADN. Se ha descrito que es capaz de reducir la estabilidad del ARNm de BCL-2 promoviendo la apoptosis celular; también se observó que inhibe la proliferación celular mediante el bloqueo de las vías de señalización de NF-κB. Otros mecanismos por los cuales AS1411 ejerce su efecto no han sido elucidados aún (Ning et al., 2020). El aptámero NOX-A12 es un aptámero ARN en espejo (Spiegelmer), es un antagonista de CXCL12 y se ha estudiado para el tratamiento de CLL. NOX-A12 se une a CXCL12 e impide el reclutamiento y acumulación de células linfoides en la médula ósea, inhibiendo la migración y proliferación celular (Tabla 1.1) (Fu and Xiang, 2020; Ning et al., 2020).

**Tabla 1.1 - Aptámeros terapéuticos frente al cáncer en estudios clínicos o preclínicos.**

Table 2. Selected aptamers under clinical trials or active laboratory investigation for cancer therapy.

Aptamer	Selection	DNA/RNA	Kd	Target	INT	Function	Application/Mechanism	Status
Pegaptanib sodium (Macugen)	SELEX, 10 rounds	RNA (28 nt)	50 pM	VEGF <sub>165</sub>	No	Antagonism	1. Age-related macular degeneration (AMD). 2. Potential therapeutic application for solid cancers with extensive angiogenesis.	Approved by FDA for treatment of AMD
AS1411	Designed and chemically synthesized	DNA (26 nt), guanosine rich quartets	55 nM	Nucleolin	Yes	Internalization or delivery	1. Binding cell-surface nucleolin and internalization, leading to DNA replication inhibition. 2. Drug delivery.	Phase II clinical trial
NOX-A12	Spiegelmer * technology	L-RNA (45 nt)	200 pM	CXCL12	No	Antagonism	Disrupting the homing and the accumulation of CLL cells in the bone marrow, sensitizing these cells to cytotoxic drugs.	Phase II clinical trial
AX102	SELEX, 12 rounds	DNA (34 nt)	100 pM	PDGF-B	No	Antagonism	1. Inhibition of tumor angiogenesis. 2. Promotion of tumor blood vessel efficiency, resulting in increased anticancer drug delivery.	Pre-clinical
xPSM-A10 (A10)	SELEX, 6 rounds	RNA (72 nt)	1.5 nM	PSMA	Yes	Internalization and delivery	# Delivery of (1) chemotherapeutics, (2) therapeutic RNAs, and (3) nanoparticles to PSMA-positive prostate cancer cells.	Pre-clinical
HB5	SELEX, multiple rounds	DNA (86)	18.9 nM	HER2	Yes	Internalization and delivery	Delivery of (1) chemotherapeutics, (2) nanoparticles to HER2-positive breast cancer cells.	Pre-clinical
HoA2_3	Whole-cell SELEX	DNA	6.2 nM	HER2	Yes	Internalization	Binding with high specificity to HER2-positive cells and tumor tissue and great potential for the treatment of HER2-overexpressing cancers.	Pre-clinical
MP7	SELEX, 5 rounds	DNA	167 nM	Murine PD-1	No	Antagonism	Blocking murine PD-1 and PD-L1 interaction so as to restore T cell function.	Pre-clinical
aptPD-L1	SELEX, 8 rounds	DNA	4.7 nM	Human PD-L1	No	Antagonism	Blocking the binding between human PD-1 and PD-L1 so as to restore T cell function.	Pre-clinical

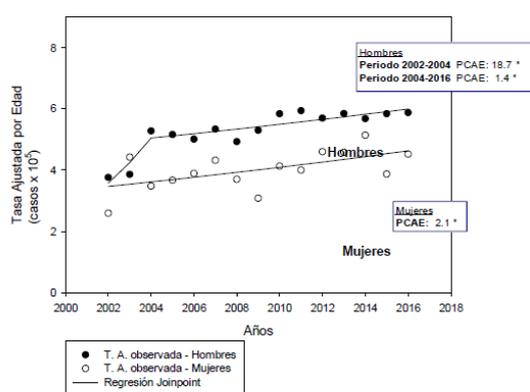
Tabla extraída de (Fu and Xiang, 2020).

### 3. Melanoma

#### 3.1. Patología

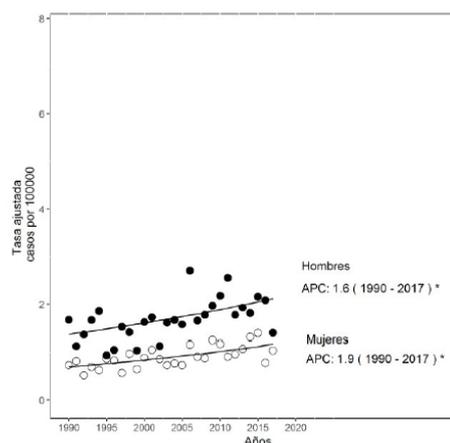
El cáncer de piel con sus diferentes tipos, constituyen en su conjunto el cáncer más frecuente, siendo el melanoma la forma que presenta mayor mortalidad (World Health Organization, 2017). El melanoma cutáneo es un tumor maligno originado a partir de melanocitos, células de la epidermis responsables de la pigmentación de la piel (Nestle and Kerl, 2004). A pesar de que el melanoma corresponde a menos del 5% de los casos de cánceres cutáneos, éste representa aproximadamente el 75% de las muertes relacionadas con cáncer de piel (Olszanski, 2014). Además, el melanoma es el cáncer que ha tenido mayor incremento en su tasa de incidencia y mortalidad en el mundo en las últimas décadas, a pesar del constante avance de la terapéutica oncológica. Para este año en Estados Unidos, se estiman 106.110 casos nuevos y cerca de 7.180 muertes a causa de esta enfermedad (American Cancer Society, 2021; National Cancer Institute, 2019). Uruguay no es ajeno a esta problemática, de hecho, Uruguay presenta las tasas más altas de incidencia y mortalidad por melanoma en Latinoamérica. En promedio se diagnostican 260 casos anualmente y 85 uruguayos mueren cada año por esta causa (cifras correspondientes al período 2012-2016). En el período 2002-2016 las tasas de incidencia han aumentado en el entorno de un 2% por año, 1.4% en hombres a partir del 2004 y un 2.1% en mujeres (Figura 1.8, izquierda). En el período entre 2002-2004 se destaca un mayor incremento en hombres, esto podría estar más relacionado con un aumento en la captura de casos que a un aumento genuino de la incidencia. En las tasas de mortalidad también se observó un aumento significativo, en el período 1990-2017 han crecido a razón de un 1.6% por año en hombres y de un 1.9% por año en mujeres (Figura 1.8, derecha) (Registro Nacional de Cáncer and Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, 2021).

TENDENCIAS RECIENTES DE LA INCIDENCIA EN URUGUAY  
MELANOMA  
2002-2016



PCAE (o APC): Porcentaje de Cambio Anual Estimado para el período (2002-2016).  
 (\*) PCAE con asterisco es estadísticamente significativo

TENDENCIAS DE LA MORTALIDAD EN URUGUAY  
MELANOMA  
1990-2017



PCAE (o APC): Porcentaje de Cambio Anual Estimado para el período (1990-2017).  
 (\*) PCAE con asterisco es estadísticamente significativo

**Figura 1.8** - Tendencias recientes de la incidencia (izquierda) y mortalidad (derecha) de melanoma en Uruguay. Imagen extraída de (Registro Nacional de Cáncer and Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, 2021).

La tasa de supervivencia a 5 años del melanoma en su estadio inicial es del 98%. Sin embargo, en etapas avanzadas de la enfermedad disminuye drásticamente, llegando en el estadio metastásico a una media de supervivencia de 6 a 9 meses, con una supervivencia a 5 años menor del 5% (Garbe et al., 2011). El melanoma es entonces uno de los tumores sólidos más agresivos y con una pobre respuesta a los tratamientos clásicos. El tratamiento potencialmente curativo del melanoma primario es la cirugía, mientras que cuando la enfermedad se hace metastásica las opciones terapéuticas son poco eficaces (Gogas et al., 2013). Los avances terapéuticos alcanzados en la última década han logrado aumentar moderadamente la supervivencia global en pacientes con melanoma avanzado (Moreira et al., 2021; Shah and Dronca, 2014).

Se entiende por inmunogenicidad de un tumor a la capacidad del mismo de inducir una respuesta inmune adaptativa que pueda prevenir el crecimiento del mismo. Existe numerosa evidencia que sugiere que el melanoma es un tumor altamente inmunogénico (Passarelli et al., 2017):

- Casos de remisión espontánea completa en pacientes con melanoma maligno, atribuible a la respuesta inmune frente al tumor (Halama et al., 2010; Morton et al., 1991).
- Presencia de anticuerpos contra antígenos asociados al tumor en pacientes con melanoma (Morton et al., 1968).
- Presencia de un infiltrado linfocitario tumoral en lesiones de melanoma en humanos asociado a un buen pronóstico (Cipponi et al., 2011).
- El fenómeno de autoinmunidad contra las células melanocíticas que clínicamente se traduce en despigmentación de la piel e histológicamente por destrucción de melanocitos adyacentes al melanoma (Halo nevo de Sutton) o distantes (cambios vitiligoides o vitiligo) también representa evidencia de la inmunogenicidad tumoral (Boasberg et al., 2006; Cunha et al., 2009).
- La inmunodepresión sistémica favorece el desarrollo de melanoma (Van Leeuwen et al., 2010).

Actualmente se reconoce que el melanoma es un tumor heterogéneo (según datos clínicos, epidemiológicos y genéticos) con diversas alteraciones genéticas y que se desarrolla en diferentes sitios del cuerpo, tanto en piel expuesta al sol como en regiones no expuestas. Esto indudablemente complejiza su abordaje terapéutico el cual tiene una fuerte tendencia a ser individualizado (Bertolotto, 2013).

### 3.2. Terapias

La remoción quirúrgica constituye el tratamiento de primera línea potencialmente curativo para aquellos pacientes con melanoma maligno no diseminado, mientras que en etapas avanzadas de la enfermedad se debe recurrir a terapias sistémicas (Halama et al., 2010). Los pacientes con melanoma maligno avanzado tienen un pobre pronóstico y el uso de quimioterapias (dacarbazina, temolozomida) muchas veces no resulta efectivo debido a la resistencia que generan las células tumorales a esta terapia (Mishra et al., 2018). Desde el año 2010 se han logrado avances significativos en el tratamiento de melanoma, principalmente en los que tienen alto riesgo de recurrencia y metastásicos. Estos avances condujeron a la aprobación

de nuevos tratamientos inmunoterapéuticos como los anticuerpos anti-CTLA4 (Ipilimumab) y anti-PD1 (Pembrolizumab y Nivolumab) que han impactado drásticamente en el pronóstico de los pacientes, aumentando la supervivencia global de los mismos (Moreira et al., 2021). Aproximadamente un 50% de los melanomas presentan una mutación específica BRAF V600, esta mutación induce una activación constitutiva de la cascada de señalización RAS-RAF-MEK-ERK, por lo que el uso de inhibidores de BRAF (Sorafenib, Vemurafenib, Dabrafenib) induce una rápida regresión en melanoma metastásico. Hay evidencia que demuestra que estos pacientes también responden muy bien a terapias con inhibidores de MEK (Trametinib). Las limitaciones de este tipo de terapias dirigidas es que sólo se obtienen buenos resultados en los pacientes que tengan estas mutaciones y no se encuentran exentas a la generación de resistencia frente a las mismas (Mishra et al., 2018; Moreira et al., 2021). Otra aproximación inmunoterapéutica de aplicación tópica es el uso de imiquimod, un agonista de TLR7/8 que al activar el receptor TLR7 induce la producción de IFN $\alpha$ , IL-12, TNF $\alpha$ , activando el sistema inmune innato. Actualmente la estrategia terapéutica más utilizada es el uso de terapias combinadas con el fin de lograr respuestas más eficientes y prolongadas en el tiempo, combatir la generación de resistencias frente al tratamiento y disminuir los efectos secundarios (Mishra et al., 2018; Najem et al., 2017). En el año 2015 la FDA aprobó la primera terapia basada en el uso de un virus herpes oncolítico, talimogene laherparepvec (T-VEC), para el tratamiento de pacientes con melanoma metastásico irresecable (Moreira et al., 2021).

## 4. Cáncer de colon

### 4.1. Patología

El cáncer colorrectal ha sido identificado como la segunda causa de muerte a nivel mundial dentro de las patologías oncológicas (Bray et al., 2018). Con aproximadamente 765000 casos nuevos a nivel global, el 55% ocurren en países desarrollados (Siegel et al., 2017). La incidencia de esta patología se encuentra en aumento, se predice que los casos nuevos incrementarán a 2-5 millones en el año 2035 (Dekker et al., 2019). Uruguay exhibe tasas de incidencia y mortalidad elevadas, coincidentes con las correspondientes al conjunto de países desarrollados; siendo el segundo cáncer más frecuente en mujeres y el tercero en hombres (Figura 1.9 y 1.10). Cada año ocurren más de 1800 casos nuevos y más de 1000 pacientes mueren por esta enfermedad (Delgado et al., 2018).

CANCER EN URUGUAY 2011-2015  
PRINCIPALES SITIOS (ordenados por Incidencia)

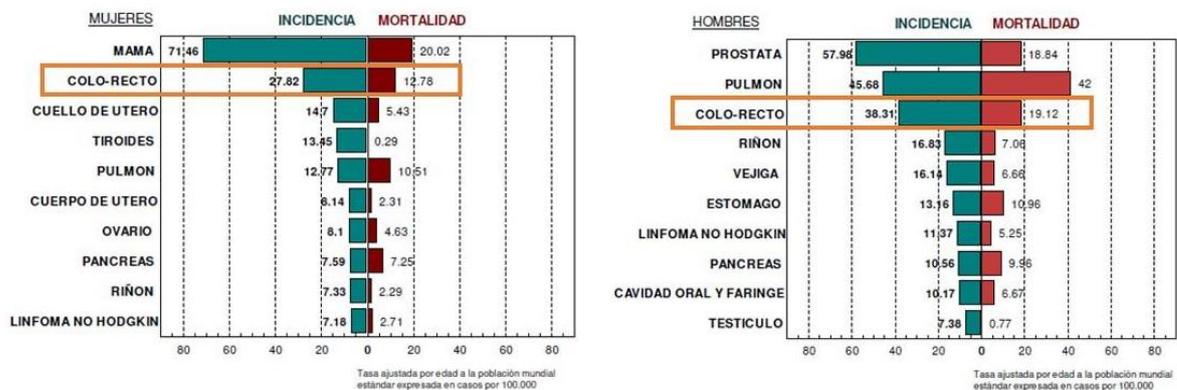


Figura 1.9 - Tasas de incidencia y mortalidad de diversos tipos de cáncer en Uruguay, gráficos separados por sexo (mujeres en la izquierda, hombres en la derecha). Imagen extraída de (Delgado et al., 2018).

TENDENCIA DE LA MORTALIDAD EN URUGUAY  
CANCER DE COLO-RECTO - 1990-2016

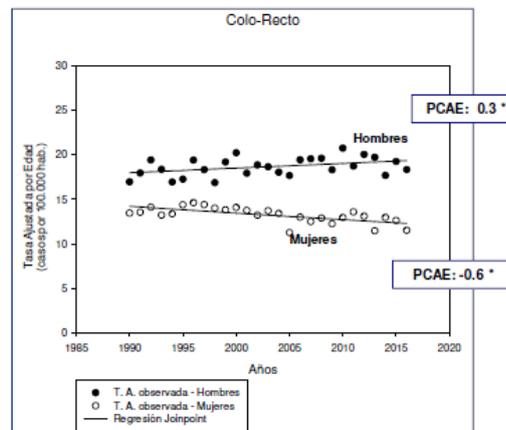


Figura 1.10 - Tendencia de la mortalidad de cáncer de colon en Uruguay. Imagen extraída de (Delgado et al., 2018).

El pronóstico de los pacientes con cáncer de colon depende del estadio en que se encuentren cuando se realiza el diagnóstico; más del 20% de los pacientes

presentan metástasis al momento del diagnóstico, lo que se asocia a un pronóstico desfavorable. Esta enfermedad presenta un periodo asintomático prolongado, lo que podría explicar por qué al momento de realizar el diagnóstico los pacientes ya se encuentran en etapas avanzadas (Delgado et al., 2018; Koi and Carethers, 2017; Siegel et al., 2017). En EEUU, la supervivencia de los pacientes a los 5 años luego de la remoción quirúrgica de tumores localizados (estadio I), regionales (estadio II y III) y distantes (estadio IV) es de 91,1%, 71,1% y 13,3%, respectivamente. En la enfermedad metastásica, estadio IV, la remoción quirúrgica del tumor primario y/o lesiones metastásicas se acompaña de una terapia sistémica como quimioterapias o terapias dirigidas (Koi and Carethers, 2017). En la última década se han realizado importantes avances en las áreas de inmunología del cáncer y su microambiente, lo que ha tenido un gran impacto en las estrategias diagnósticas y terapéuticas en cáncer de colon. Se ha asociado un mejor pronóstico en aquellos pacientes que presentan linfocitos infiltrantes de tumor con un fenotipo Th1 y citotóxico. Por su parte, aquellos pacientes con linfocitos infiltrantes con un fenotipo T regulador y Th17 y/o fibroblastos asociados al cáncer (CAF) se asocian con un mal pronóstico. Además, la clasificación molecular del tumor influye en el microambiente tumoral, de modo que en patologías donde hay una inestabilidad microsatelital alta e hipermutación el microambiente está enriquecido de células inmunes con función antitumoral. Los tumores con estabilidad microsatelital presentan un microambiente inmunológico heterogéneo y es necesario realizar evaluaciones genéticas para hacer una subclasificación y determinar el pronóstico. Esta caracterización molecular e inmunológica de los tumores permite identificar marcadores predictivos de la enfermedad y definir cuáles son las estrategias terapéuticas óptimas para cada paciente (Koi and Carethers, 2017).

#### 4.2. Terapias

Aproximadamente en el 80-90% de los pacientes con cáncer de colon metastásico se determina que no es resecable, por lo que frecuentemente se utilizan tratamientos que combinan quimioterapia (ej: 5-fluorouracil) con agentes moleculares dirigidos a inhibir el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, ej: bevacizumab) o el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ej: cetuximab o panitumumab) (The National Comprehensive Cancer Network, 2020). Los beneficios clínicos de estos tratamientos son limitados, se observa un aumento en la supervivencia global de los pacientes de unos 30 meses aproximadamente. Por tanto, se requiere el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para mejorar estos pronósticos (Koi and Carethers, 2017; The National Comprehensive Cancer Network, 2020).

Los tratamientos para el cáncer de colon se pueden dividir en dos categorías: neoadyuvantes y adyuvantes. Las terapias neoadyuvantes se administran previo al principal tratamiento, usualmente cirugía, mientras que las terapias adyuvantes refieren a tratamientos que se dan luego o en combinación con la terapia principal. Con las terapias neoadyuvantes se han observado múltiples beneficios clínicos como la disminución de la agresividad del cáncer, eliminando tumores metastásicos tempranos, previniendo complicaciones durante la cirugía y, basándose en la respuesta al tratamiento, se pueden definir planes de terapias adyuvantes más adecuados en caso de ser necesarios (Lichtenstern et al., 2020).

Inicialmente el uso de inhibidores de puntos de control del sistema inmune no se consideraba una opción viable para el tratamiento de cáncer de colon, ya que un estudio fase II de un anticuerpo anti-CTLA4 (Tremelimumab) mostró que en los pacientes refractarios a otros tratamientos no había una mejora. Sumado a este estudio, en dos ensayos fase I que estudiaban terapias con anticuerpos anti-PD1 y anti-PD-L1 previamente tratados, no tuvieron respuestas. En ninguno de estos estudios se realizó una caracterización molecular de los tumores, es decir, se desconocía si presentaban una inestabilidad microsatelital baja o elevada, y esto comprometió la interpretación de los resultados. De hecho, un estudio posterior evaluando un anticuerpo anti-PD1 (MDX-1106) en una variedad de tumores resistentes a los tratamientos, entre ellos de un paciente con cáncer de colon, resultó en una respuesta completa y duradera de este paciente. A partir de estas observaciones fue que se realizaron más estudios y se correlacionó que los pacientes que presentan una alta inestabilidad microsatelital responden bien a este tipo de terapias. La FDA aprobó el uso de pembrolizumab y nivolumab (anti-PD1) en pacientes con cáncer de colon con alta inestabilidad microsatelital, y representa la primer inmunoterapia aprobada por la FDA cuya aplicación se basa en un biomarcador genético de un tipo particular de tumor (Lichtenstern et al., 2020).

Las terapias mencionadas anteriormente presentan algunas limitaciones: sólo beneficia a un grupo de pacientes (aquellos con tumores con alta inestabilidad microsatelital) y el costo de las terapias es elevado. Debido a esto, se continúa explorando en busca de estrategias terapéuticas costo-efectivas; en este sentido una terapia adyuvante que se encuentra en estudio es el uso de aspirina. Muchos estudios observacionales apoyan la idea de que el consumo diario de aspirina puede mejorar la supervivencia de paciente con cáncer de colon. Actualmente hay 5 ensayos clínicos en marcha (ISRCTN74358684, NCT02647099, NCT00565708, NCT02301286 y NCT02467582) que intentan determinar el efecto adyuvante de la aspirina en esta patología. Otros ensayos enfocados en la prevención de las recurrencias post-cirugía, evaluaron el efecto de la administración de células tumorales (con estabilidad microsatelital) irradiadas en conjunto con la vacuna BCG obteniendo resultados prometedores (Lichtenstern et al., 2020).

Por todo lo mencionado anteriormente, es relevante explorar nuevas aproximaciones terapéuticas frente al cáncer. El presente trabajo está orientado hacia la evaluación del potencial terapéutico de *Salmonella* en combinación con aptámeros que bloquean puntos de control del sistema inmune en vías de avanzar hacia su posible uso futuro para el tratamiento de una patología humana de alta incidencia en la población nacional y mundial como es el cáncer, particularmente melanoma y cáncer de colon.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

El conjunto de las evidencias indica que en condiciones ideales *Salmonella* sería capaz de infectar células tumorales, induciendo su muerte. La generación de antígenos derivados de las células tumorales en un contexto inflamatorio, también inducido por *Salmonella*, sería propicio para la captación y presentación de éstos al sistema inmune, desencadenando una respuesta específica contra el tumor, caracterizada por la activación de células NK y linfocitos T citotóxicos capaces de eliminar células tumorales. Los aptámeros en tanto evitarían la inhibición de la activación de los linfocitos T específicos inducidos por el tratamiento con *Salmonella*, promoviendo el mantenimiento de su función citotóxica.

## OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial terapéutico de una nueva inmunoterapia basada en el uso de la cepa LVR01 de *Salmonella* en combinación con aptámeros que bloqueen distintos puntos de control del sistema inmune para el tratamiento del melanoma y cáncer de colon.

### 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1. Evaluación del potencial terapéutico de *Salmonella* LVR01 en combinación con los aptámeros contra CLTA4, PD1 y TIM3 en modelos subcutáneos de melanoma B16F1 y cáncer de colon CT26.
- 2.2. Comparación del potencial terapéutico del aptámero incluido en la terapia combinada más efectiva con el del anticuerpo monoclonal comercial contra dicho punto de control en modelos subcutáneos de melanoma B16F1 y cáncer de colon CT26.
- 2.3. Estudio de la biodistribución del aptámero con mejor respuesta mediante imagenología molecular y citometría de flujo.
- 2.4. Análisis de la respuesta inmune ejercida por la terapia combinada que resulte más efectiva en modelos subcutáneos de melanoma y cáncer de colon. En particular, estudio de la activación y funcionalidad de linfocitos T citotóxicos y células NK.
- 2.5. Valoración de la respuesta inmune antitumoral de memoria inducida por la terapia combinada que resulte más efectiva en modelos subcutáneos de melanoma y cáncer de colon, mediante desafío con un segundo tumor.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Líneas celulares

#### 1.1. Melanoma

Se utilizó la línea celular de melanoma de ratón B16F1, obtenida de American Type Culture Collection (ATCC, N° de línea CRL-6323). La línea fue cultivada en medio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) enriquecido con suero fetal bovino al 10%, a 37°C y atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, siguiendo recomendaciones de ATCC.

#### 1.2. Cáncer de colon

Se utilizó la línea celular de cáncer de colon de ratón CT26, obtenida de ATCC (N° de línea CRL-2638). La línea fue cultivada en medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) enriquecido con suero fetal bovino al 10%, a 37°C y atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, siguiendo recomendaciones de ATCC.

### 2. Cepa bacteriana

Se utilizó una cepa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) atenuada, con una mutación en el gen *aroC* (*aroC*-) de la vía de los compuestos aromáticos llamada LVR01 (Chabalgoity et al., 2000). Para la preparación de los inóculos se cultivó la cepa bacteriana en caldo Luria-Bertani (LB) a 37°C y con agitación (200 rpm) durante 16 horas (ON). Se prepararon alícuotas del mismo, y se almacenaron a -80°C en el mismo medio de cultivo con 15% de glicerol en una concentración conocida.

Al momento de su utilización, se descongeló una alícuota a temperatura ambiente y se resuspendieron las bacterias en suero fisiológico estéril a una concentración de  $1 \times 10^7$  ufc/mL o  $2 \times 10^7$  ufc/mL. En todas las ocasiones, se chequeó el inóculo utilizado por conteo de diluciones seriadas apropiadas en placa de LB agar.

### 3. Aptámeros

Se utilizaron aptámeros contra los puntos de control CTLA4, TIM3, PD1 y un aptámero control NEG (aptámero control inespecífico), obtenidos de IBA Lifesciences GmbH (Alemania) (Tabla 2.1).

**Tabla 2.1** - Lista de aptámeros y principales características.

Nombre	Secuencia	Tipo	Purificación	Largo/A,G,C,T,U	Referencia
CTLA4	(NH <sub>2</sub> )GGG GGA AXX YXA AXA YGA YXY AYX AXA GGG AGA GAG GAA GAG GGA XGG GYY GAY GXG YYG YA	ARN	HPLC	62/18,24,0,0,0	Santulli- Marotto, S. et al. 2003
TIM3	(NH <sub>2</sub> )GGG AGA GGA YYA XGX AGX YAY XAX GGX YXX GGA GYX AGY GGY AGA GYG XYG YGG XYY YXY YY	ARN	HPLC	62/11,22,0,0,0	Hervas- Stubbs, S. et al. 2016
PD1	(NH <sub>2</sub> )GAC GAT AGC GGT GAC GGC ACA GAC GGT ACA GTT CCC GTC CCT GCA CTA CAC GTA TGC CGC TTC CGT CCG TCG CTC	ADN	HPLC	75/13,20,27,15,0	Prodeus, A. et al. 2015
NEG	(NH <sub>2</sub> )CCT GTG TGA GCC TCC TAA CCA GAA CAG TTA AAG TGT CCC ACT CC ATG ATT CTT GTC TCT C	ADN	HPLC	64/13,10,21,20,0	Prodeus, A. et al. 2015

En las secuencias (NH<sub>2</sub>) refiere a la modificación NH<sub>2</sub> en el extremo 5´ terminal y las siglas X e Y en los aptámeros ARN representan bases modificadas.

Previo a su uso los aptámeros fueron resuspendidos en agua libre de RNasas y almacenados a -20°C, según indicaciones del fabricante.

### 3.1. Derivatización

Se realizó la marcación del aptámero anti-PD1 con AlexaFluor647® succinimidyl ester (Alexa647-NHS) obtenida de Thermo Fisher Scientific (A-20006, EEUU). La conjugación se llevó a cabo debido a que los aptámeros presentan un grupo aminohexilo en el extremo 5´ terminal que forma un enlace amida con el grupo reactivo éster N-hidroxisuccinidilo del fluoróforo. Se resuspendió 1 mg de aptámero PD1 en buffer bicarbonato fosfato pH=8,32. Luego se agregó Alexa647-NHS, previamente disuelta en DMSO, en una relación 2:1 (Alexa647-NHS:PD1). Se llevó a cabo una reacción de 2 horas a temperatura ambiente, protegiendo la mezcla de la luz. Se confirmó el éxito de la reacción por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) utilizando la columna Kinetex® 5 µm XB-C18 y se purificaron las fracciones del producto. Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% se determinó la fracción purificada que contenía el aptámero conjugado, el revelado se realizó por medición de fluorescencia utilizando In-Vivo MS FX PRO y por tinción con nitrato de plata. Finalmente, se procedió a la cuantificación del producto por espectrofotometría. El producto final fue liofilizado y se almacenó a -20°C. Al momento de su utilización se disolvió el aptámero conjugado en suero fisiológico estéril.

## 4. Animales de experimentación

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

Todos los ensayos con animales de experimentación se realizaron bajo normas y cumpliendo todos los requerimientos de la Comisión Nacional de Experimentación

Animal (CNEA) para asegurar su salud y bienestar. El protocolo de experimentación animal fue presentado y aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la Facultad de Medicina (Exp. N° 070153-000361-17).

## 5. Modelo de melanoma B16F1 subcutáneo y protocolo de tratamiento.

Se utilizó el modelo murino de melanoma subcutáneo de células B16F1 previamente estandarizado y muy utilizado en nuestro laboratorio (Agorio et al., 2007). Para ello, los ratones C57BL/6 fueron inoculados a nivel flanco derecho por punción subcutánea (s.c.) con una suspensión de  $2,5 \times 10^5$  células B16F1 en 100  $\mu$ l de suero fisiológico.

Como primera aproximación, los animales se dividieron al azar en 7 grupos: SF, LVR01, LVR01+anti-PD1, LVR01+anti-TIM3 (i.p), LVR01+anti-TIM3 (i.v), LVR01+anti-CTLA4, LVR01+NEG. Una vez que los tumores fueron visibles, aprox. el día 9 post inoculación del tumor (p.i.t.), se inyectó de forma intratumoral 100  $\mu$ l de suero fisiológico inyectable (grupo SF) o una solución conteniendo  $1 \times 10^6$  ufc de *Salmonella* LVR01 (resto de los grupos con LVR01). Además, los días 9, 11 y 14 p.i.t. se administraron los aptámeros, en las concentraciones previamente reportadas, tal como se indica en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 - Dosis y vías de administración de los aptámeros.

Grupo	Descripción	Vía de administración del aptámero	Dosis aptámero	n
SF	Suero fisiológico	-	-	10
LVR01	<i>Salmonella</i>	-	-	10
LVR01+ anti-PD1	<i>Salmonella</i> combinada con aptámero anti-PD1	intraperitoneal	1300 pmol	10
LVR01+ anti-TIM3 (i.p)	<i>Salmonella</i> combinada con aptámero anti-TIM3	intraperitoneal	800 pmol	11
LVR01+ anti-TIM3 (i.v)	<i>Salmonella</i> combinada con aptámero anti-TIM3	intravenosa	800 pmol	10
LVR01+ anti-CTLA4	<i>Salmonella</i> combinada con aptámero anti-CTLA4	intraperitoneal	500 pmol	10
LVR01+NEG	<i>Salmonella</i> combinada con aptámero control negativo	intraperitoneal	1300 pmol	9

Cada 2-3 días se midieron los tumores, determinando ancho, largo y profundidad con un calibre, para el cálculo de volumen tumoral según la siguiente fórmula: largo x ancho x altura x  $\pi/6$  = volumen (en  $\text{mm}^3$ ). Además, se registró la supervivencia. Se realizó eutanasia humanitaria por dislocación cervical cuando el volumen tumoral superó los  $4.000\text{mm}^3$ , o si el animal presentaba aspecto clínico enfermo (criterios de punto final).

El diseño del esquema terapéutico fue modificado en reiteradas ocasiones para obtener una respuesta con mayor potencial. Se modificaron los siguientes

parámetros: la cantidad de dosis de aptámero, el tiempo de inicio del tratamiento y la concentración de *Salmonella*, según se especifica en cada experimento en la sección Resultados y Discusión. Sin embargo, la vía de administración del aptámero y la cantidad de aptámero por dosis se mantuvieron a lo largo de todo el trabajo tal como se detalla en la Tabla 2.2.

Para comparar el potencial terapéutico del aptámero anti-PD1 con el anticuerpo monoclonal comercial anti-PD1 (BioXCell, clona RMP1-14), se inocularon los tumores B16F1 tal como se describe anteriormente. Los animales se dividieron al azar en 6 grupos: SF, LVR01, Apt-anti-PD1, Ac-anti-PD1, LVR01+Apt-anti-PD1 (*Salmonella* combinada con aptámero anti-PD1) y LVR01+Ac-anti-PD1 (*Salmonella* combinada con anticuerpo anti-PD1). A los días 2, 4, 7 y 14 p.i.t. se administró vía intraperitoneal anti-PD1 (aptámero: 1300 pmol o anticuerpo: 650 pmol equivalente a 100 µg) a los animales que pertenecían al grupo de terapias combinadas o monoterapia con anti-PD1. El día 11 p.i.t. se inyectó de forma intratumoral una solución conteniendo  $2 \times 10^6$  ufc de *Salmonella* LVR01 a los ratones de los grupos de terapias combinadas o monoterapia con LVR01. Se realizó seguimiento del volumen tumoral y sobrevida global.

## 6. Modelo de cáncer de colon CT26 subcutáneo y protocolo de tratamiento.

Se realizó la puesta a punto de la terapia con *Salmonella* en el modelo murino de cáncer de colon CT26 subcutáneo. Los ratones BALB/C fueron inoculados a nivel flanco derecho por punción subcutánea (s.c.) con una suspensión de  $8 \times 10^4$  células CT26 en 100 µl de suero fisiológico. Los animales se dividieron al azar en 2 grupos: SF y LVR01. Al día 11 p.i.t. y 26 p.i.t. se inyectó de forma intratumoral 100 µl de suero fisiológico inyectable (grupo SF) o una solución conteniendo  $2 \times 10^6$  ufc de *Salmonella* LVR01 (grupo LVR01). Se realizó seguimiento del volumen tumoral y sobrevida global como se describió para el modelo de melanoma.

Para ensayos de evaluación con terapia combinada, el diseño experimental se modificó levemente: a los días 2, 4, 7 y 14 p.i.t. se administró el aptámero anti-PD1 Tabla 2.2 y se administró semanalmente LVR01.

Se comparó el potencial terapéutico del aptámero anti-PD1 con el anticuerpo monoclonal comercial anti-PD1 obtenido de BioXCell (clona RMP1-14) en el modelo de cáncer de colon, de forma análoga al melanoma, pero considerando los tiempos y frecuencia de tratamiento usados para cáncer de colon

## 7. Ensayo de biodistribución del aptámero contra PD1.

Se estudió la biodistribución del aptámero anti-PD1-Alexa-647 en el modelo de melanoma (2 y 24 horas post administración del aptámero) y cáncer de colon (2 horas post administración del aptámero). Para esto, a ratones portadores de tumor se les inyectó vía intravenosa 10 µg del aptámero conjugado resuspendido en 150 µl de suero fisiológico estéril. Pasadas 2 o 24 horas los animales fueron sacrificados, se extrajeron los órganos, se pesaron y dispusieron en una placa de Petri para evaluar su fluorescencia. El estudio de imagen *ex vivo* se realizó en el equipo In-Vivo MS FX PRO (Bruker BioSpin) y para el procesamiento de datos se utilizó el software Bruker.

## 8. Estudio de la respuesta inmune.

Se evaluó la respuesta inmune celular y humoral ejercida por *Salmonella* en combinación con anti-PD1 en el modelo murino de melanoma y cáncer de colon. Para llevar a cabo este estudio se obtuvieron muestras de suero, tumor, ganglio linfático drenante de tumor (TDLN) y bazo.

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

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

### 8.1. Análisis de la respuesta inmune celular.

A partir de los tejidos obtenidos en PBS se obtuvo una suspensión celular mediante disgregación mecánica. Se analizó el reclutamiento de células inmunes al tumor o TDLN luego de la terapia combinada mediante citometría de flujo.

#### 8.1.1. Evaluación de los linfocitos.

Las células fueron marcadas con distintos paneles de anticuerpos, de acuerdo a como se muestra en las tablas 2.3 y 2.4.

**Tabla 2.3** - Anticuerpos conjugados a fluoróforos utilizados para inmunofenotipificación para linfocitos.

Fluoróforo	Marcador
FITC	CD49b
APC	CD3
APCCy7	CD4
PE	CD8
PerCPCy5.5	CD19

**Tabla 2.4** - Anticuerpos conjugados a fluoróforos utilizados para inmunofenotipificación de linfocitos T citotóxicos.

Fluoróforo	Marcador
APCCy7	CD45
APC	CD3
PerCP	CD8
PE	CD69
Pacific Blue	CD103
FITC	CD44

Los datos se adquirieron en el citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson) y para el procesamiento de los datos se utilizó el software FACS Diva.

Se definieron las células NK ( $CD3^-CD49b^+$ ), NKT ( $CD3^+CD49b^+$ ), linfocitos B ( $CD3^+CD19^+$ ), linfocitos T colaboradores ( $CD3^+CD4^+CD8^-$ ) y linfocitos T citotóxicos ( $CD3^+CD4^+CD8^+$ ) en tumor y células totales de TDLN.

En TDLN se definieron los linfocitos T citotóxicos activados ( $CD3^+CD8^+CD69^+$ ), circulantes ( $CD3^+CD8^+CD44^{high}$ ) y residentes de memoria ( $CD3^+CD8^+CD69^+CD103^+$ ). En tumor se utilizó CD45 para definir leucocitos y luego se realizó el mismo análisis que para TDLN.

### 8.1.2. Expresión diferencial de genes por RT-qPCR.

Se evaluó el perfil transcripcional en muestras de tumores CT26 de animales que fueron tratados con anti-PD1 (aptámero o anticuerpo) y/o con *Salmonella* LVR01. Al día 14 p.i.t. se extrajo material tumoral que se conservó en TRIzol previo a la extracción de ARN total. El tejido tumoral se rompió mediante el uso del TissueRuptor (Qiagen). En todos los casos se obtuvo el ARN mediante extracción con cloroformo. Luego de la misma, su cantidad y calidad se evaluó usando medidas espectrofotométricas a 260nm/280nm mediante NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Previo a la síntesis de ADN copia se trató 1  $\mu$ g de ARN total con DNAsal (Invitrogen) según instrucciones del fabricante. Luego, se llevó a cabo la retrotranscripción en un volumen final de 20  $\mu$ l en presencia de Random primers (200 ng), dNTPs (0,5 mM), DTT (0,01 M), RNaseOUT (40 U) y enzima retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen). Finalmente se realizó PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) con los primers descritos en Tabla 2.5, utilizando el kit QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit (Qiagen) en un termociclador 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El gen codificante para  $\beta$ 2-microglobulina fue elegido como gen house-keeping. Los niveles relativos de ARNm en cada muestra fueron calculados usando el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  tal como se describió previamente (Livak and Schmittgen, 2001), donde  $\Delta Ct = Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{housekeeping}}$ . A su vez estos niveles fueron relativizados respecto al grupo control (tumores sin tratamiento).

**Tabla 2.5** - Secuencias nucleotídicas de cebadores utilizados para estudiar la expresión diferencial de genes por PCR en tiempo real.

Nombre	Secuencia del cebador
MB2M_F	5'-CCTGCAGAGTTAAGCATGCCAG-3'
MB2M_R	5'-TGCTTGATCACATGTCTCGATCC-3'
mIL6_F	5'-GTTCTCTGGGAAATCGTGAAA-3'
mIL6_R	5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'
mTNF $\alpha$ _F	5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3'
mTNF $\alpha$ _R	5'-CCTCCACTTGGTGGTTTGTCT-3'
mIFN $\gamma$ _F	5'-TCAGCAACAGCAAGGCGAAA-3'
mIFN $\gamma$ _R	5'-CCGCTTCTGAGGCTGGAT-3'
mCXCL10_F	5'-GCCGTCATTTTCTGCCTCAT-3'
mCXCL10_R	5'-GCTTCCCTATGGCCCTCATT-3'
mCCL3_F	5'-AACATCATGAAGGTCTCCAC-3'
mCCL3_R	5'-CCAAGACTCTCAGGCATTCA-3'
mCCL4_F	5'-GCCCTCTCTCTCTTGTCT-3'
mCCL4_R	5'-GTCTGCCTCTTTTGGTCAGG-3'
mCCL5_F	5'-GGTACCATGAAGATCTCTGCA-3'
mCCL5_R	5'-AAACCCTCTATCCTAGCTCAT-3'
mCXCL2_F	5'-CCCTCAACGGAAGAACCAAA-3'
mCXCL2_R	5'-CACATCAGGTACGATCCAGGC-3'

## 8.2. Respuesta inmune humoral.

Para determinar los niveles de IgG totales contra células tumorales de colon por ELISA se sensibilizaron placas de 96 pocillos con lisado de células CT26 en PBS, ON a 4°C en cámara húmeda (CH). Las placas se bloquearon con 1% BSA en PBS-Tween por 1 hora a 37°C en CH. Luego se incubaron los sueros de los ratones (diluciones 1/5 o 1/10, dependiendo de la cantidad de suero obtenida) por duplicado ON a 4°C en CH. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo policlonal biotinilado anti-ratón hecho en cabra (Southern Biotech), se incubó 1 hora a 37°C en CH. Se agregó ExtrAvidin-peroxidasa (Sigma), se incubó por 30 minutos a temperatura de ambiente en cámara oscura. La reacción fue revelada utilizando TMB Sigma, se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N y se midió la absorbancia a 450 nm.

## 9. Valoración de la respuesta inmune antitumoral de memoria.

### 9.1. Evaluación mediante desafío con un segundo tumor.

A los animales que se evaluó el potencial terapéutico de *Salmonella* LVR01 en combinación con aptámeros anti-PD1 en el modelo de cáncer de colon CT26 subcutáneo (punto 6 en M&M) y no desarrollaron tumor primario se los desafió mediante la implantación de un segundo tumor en el flanco opuesto al que se inoculó el tumor primario, siguiendo el mismo protocolo. Cada 2-3 días se midieron los tumores y se registró la sobrevida como fue descrito anteriormente.

### 9.2. Ensayo de Winn modificado.

#### 9.2.1. Puesta a punto en CT26.

A partir de bazos de ratones naïve se obtuvieron esplenocitos. Se mezclaron con células tumorales CT26 en diferentes relaciones, 0/25/50/100:1 (esplenocitos:células CT26), siendo siempre la concentración final de CT26 de  $8 \times 10^5$  células/mL.

Ratones BALB/C se dividieron al azar en 4 grupos: 0:1, 25:1, 50:1 y 100:1. Los animales fueron inoculados a nivel flanco derecho por punción subcutánea (s.c.) con 100  $\mu$ l de cada suspensión ( $8 \times 10^4$  células CT26, junto con esplenocitos). Cada 2-3 días se midieron los tumores y se registró la sobrevida global.

#### 9.2.2. Evaluación en CT26.

A partir de bazos de ratones a los que se les implantó tumor y no desarrollaron tumor primario, y de ratones naïve se obtuvieron esplenocitos, que se resuspendieron con células CT26 en una relación 100:1 ( $8 \times 10^7$  esplenocitos:  $8 \times 10^5$  células CT26 por mL). Ratones naïve se dividieron al azar en 8 grupos: CT26, Naïve, SF, Apt-anti-PD1+LVR01, Ac-anti-PD1, Ac-anti-PD1+LVR01, A20 y A20+LVR01 (según Tabla 2.6), y fueron inoculados a nivel flanco derecho por punción s.c. con 100  $\mu$ l de las suspensiones esplenocitos:CT26.

Tabla 2.6 - Descripción grupos del ensayo de Winn.

Grupo	Esplenocitos ( $8 \times 10^6$ células)	CT26 ( $8 \times 10^4$ células)
CT26	-	✓
Naïve	De ratones naïve (sin tratar).	✓
SF	De ratones portadores de CT26 que recibieron suero fisiológico y no desarrollaron tumor primario.	✓
Apt-anti-PD1 +LVR01	De ratones portadores de CT26 tratados con aptámero anti-PD1 y <i>Salmonella</i> que no desarrollaron tumor primario.	✓
Ac-anti-PD1	De ratones portadores de CT26 tratados con anticuerpo anti-PD1 y no desarrollaron tumor primario.	✓
Ac-anti-PD1 +LVR01	De ratones portadores de CT26 tratados con anticuerpo anti-PD1 y <i>Salmonella</i> que no desarrollaron tumor primario.	✓
A20	De ratones portadores de tumores de linfoma A20 y que no desarrollaron tumor primario.	✓
A20+LVR01	De ratones portadores de tumores A20 tratados con <i>Salmonella</i> y que no desarrollaron tumor primario.	✓

Cada 2-3 días se midieron los tumores y se registró la sobrevida global.

## 10. Análisis estadístico

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

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE *SALMONELLA* LVR01 EN COMBINACIÓN CON MOLÉCULAS QUE BLOQUEAN PUNTOS DE CONTROL INHIBIDORES DEL SISTEMA INMUNE EN UN MODELO DE MELANOMA B16F1 SUBCUTÁNEO.

#### 1.1. Puesta a punto del tratamiento con *Salmonella* LVR01 en combinación con los aptámeros contra CTLA4, PD1 y TIM3 en un modelo de melanoma B16F1 subcutáneo.

La puesta a punto de la terapia combinada de LVR01 con los aptámeros inhibidores de puntos de control del sistema inmune tenía por objetivos, por un lado, definir un esquema terapéutico donde se pueda apreciar los efectos de las terapias y, por otro lado, definir un aptámero cuyo potencial terapéutico (solo o en combinación con *Salmonella*) sea superior al resto y continuar los ensayos con ese candidato.

En una primera aproximación se utilizó un diseño experimental en donde los animales recibieron *Salmonella* y la primera dosis de aptámeros en tiempos muy cercanos, aproximadamente al día 10 post inoculación del tumor (p.i.t). Este esquema fue pensado así porque en experiencias previas con terapias combinadas en modelo de melanoma murino, la administración de LVR01 en neoadyuvancia tuvo resultados exitosos, disminuyendo el tamaño tumoral y aumentando la sobrevida global del grupo de ratones tratados (Chilibroste et al., 2021; Vola et al., 2018). El régimen de tratamiento fue entonces: al día 0 se implantaron las células tumorales B16F1 de manera s.c. en el flanco derecho de los ratones, al día 9 p.i.t. se administró LVR01 i.t. junto con la primera dosis de los aptámeros por distintas vías, a los días 11 y 14 p.i.t. se administraron la segunda y tercera dosis de aptámeros (Figura 3.1 A). El crecimiento tumoral fue monitorizado cada 2-3 días, y la sobrevida registrada. La figura 3.1 muestra que no hubo diferencias significativas entre los resultados obtenidos con las terapias combinadas (*Salmonella* LVR01 más aptámero) y la monoterapia con LVR01, y las diferencias que se observaron respecto al grupo control fueron modestas. Sin embargo, se pudieron obtener algunos datos relevantes de estos resultados. (1) El aptámero anti-TIM3 fue administrado por dos vías diferentes, tanto intravenosa como intraperitoneal, ya que en el trabajo de referencia este aptámero se administraba vía intravenosa y nos interesaba saber si el uso de vías diferentes afectaba el efecto terapéutico. No se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos por las dos vías, por lo que se seleccionó la vía intraperitoneal como más apropiada para la administración frecuente de aptámeros (Figura 3.1 B, E-F). (2) El aptámero anti-CTLA4 en combinación con LVR01 fue el que demostró tener el menor potencial terapéutico. No se observaron diferencias significativas en el tamaño tumoral ni en la sobrevida global en el grupo que recibió la terapia combinada con anti-CTLA4 y el grupo control (Figura 3.1 G-H). (3) Los aptámeros anti-TIM3 y anti-PD1 resultaron ser potenciales candidatos para la terapia combinada, ya que se observó un aumento significativo de la sobrevida en los grupos que recibieron *Salmonella*

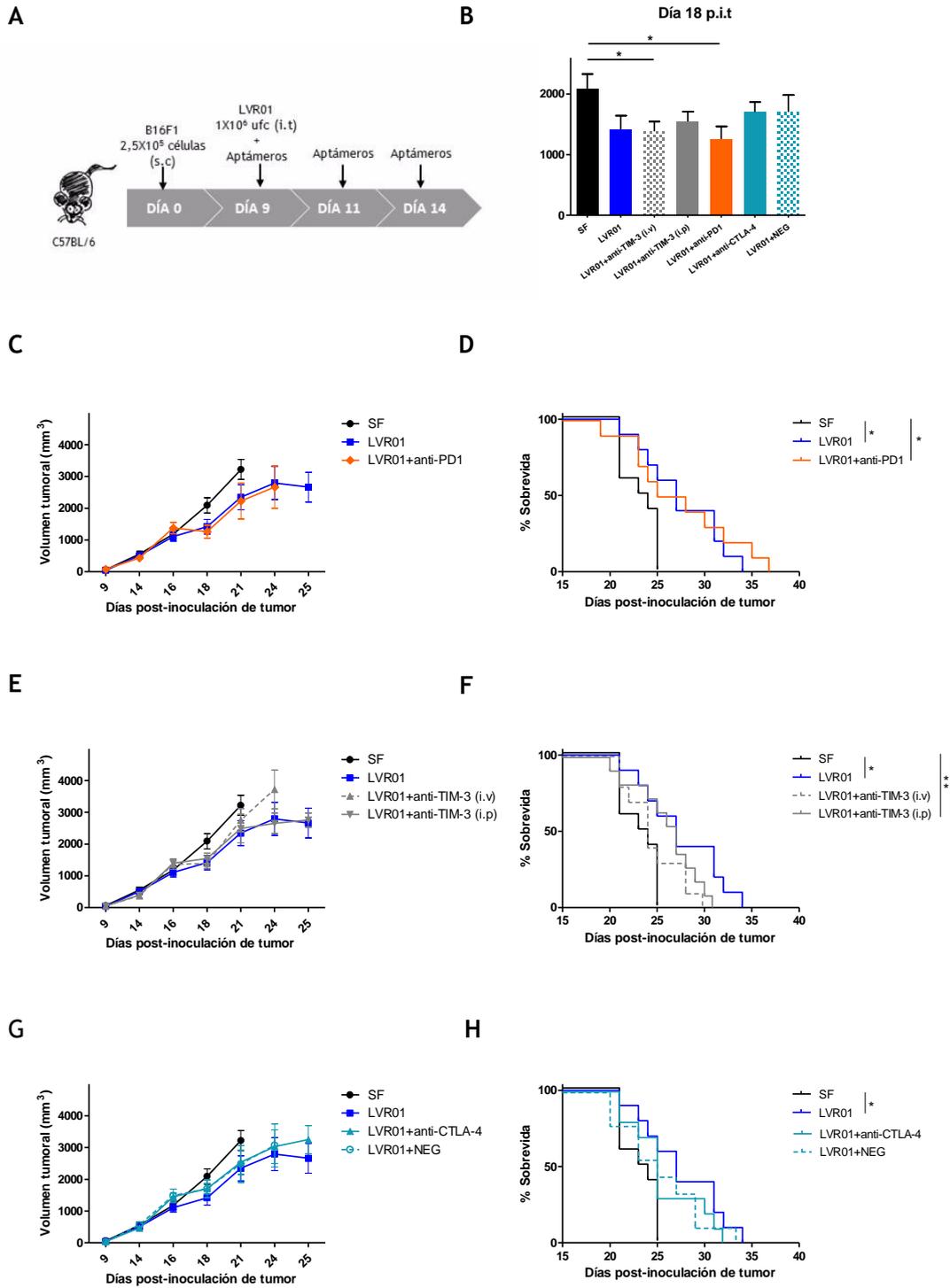
combinada con éstos, respecto al grupo control. La mediana de supervivencia del grupo control fue de 23 días p.i.t., mientras que para el grupo LVR01+anti-TIM3 (i.p) fue de 27 días p.i.t. ( $p=0,0086$ , log rank test) y para el grupo LVR01+anti-PD1 fue de 26 días p.i.t. ( $p=0,0448$ , log rank test) (Figura 3.1 D, F). Además, se observó una modesta disminución del tamaño tumoral en ambas terapias combinadas respecto al grupo control. Al día 18 p.i.t., las medias de volumen tumoral para los grupos control, LVR01+anti-TIM3 (i.v) y LVR01+anti-PD1 fueron  $2092 \pm 239 \text{ mm}^3$ ,  $1387 \pm 159 \text{ mm}^3$  y  $1261 \pm 208 \text{ mm}^3$ , respectivamente. Ambos grupos tratados presentaron un tamaño significativamente menor que el grupo control (LVR01+anti-TIM3 (i.v) vs SF  $p=0,0244$ ; LVR01+anti-PD1 vs SF  $p=0,0172$ , t test) (Figura 3.1, B). Por otro lado, cabe mencionar que los resultados obtenidos con LVR01 no fueron los esperados, ya que si bien se observó un aumento en la supervivencia global del grupo tratado con LVR01 respecto al grupo control (mediana de supervivencia 27 días p.i.t.,  $p=0,0102$  log rank test), no se observaron las ya reportadas diferencias en los tamaños tumorales entre los grupos LVR01 y control (Chilibroste et al., 2021; Mónaco et al., 2021b; Vola et al., 2018).

Debido al modesto efecto que se observó en las terapias combinadas (LVR01+anti-PD1 y LVR01+anti-TIM3), no se pudo definir una terapia con un mayor potencial terapéutico en el modelo utilizado. Nos propusimos realizar la puesta a punto del tratamiento en base al aptámero anti-PD1, ya que se contaba con suficiente material para trabajar, quedando sujeto de disponibilidad de aptámero los ensayos con anti-TIM3.

### 1.2. Puesta a punto de la evaluación del potencial terapéutico de *Salmonella* LVR01 en combinación con aptámero contra PD1 en un modelo de melanoma B16F1 subcutáneo.

Se evaluó el potencial terapéutico *in vivo* del aptámero anti-PD1 en combinación con *Salmonella* aplicando diferentes protocolos. Los principales parámetros modificados para optimizar el efecto fueron: la cantidad de dosis de aptámero (se planteó aumentar a un esquema de 4 dosis, manteniendo la misma concentración por dosis), el tiempo de inicio del tratamiento (comenzar en tiempos más tempranos) y la concentración de *Salmonella* (se aumentó la dosis de LVR01 a  $2 \times 10^6$  ufc), según se describe en cada esquema.

En una primera instancia se inició el tratamiento al día 7 p.i.t., como se muestra en la figura 3.2 A. Se observó un enlentecimiento del crecimiento tumoral en los ratones que recibieron la terapia combinada LVR01+anti-PD1 respecto al grupo control y al grupo que recibió la monoterapia anti-PD1 (Figura 3.2 B). Al día 14 p.i.t., las medias de volumen tumoral para los grupos control, anti-PD1 y LVR01+anti-PD1 fueron de  $768 \pm 142 \text{ mm}^3$ ,  $658 \pm 98 \text{ mm}^3$  y  $304 \pm 58 \text{ mm}^3$ , respectivamente. El grupo LVR01+anti-PD1 tuvo un volumen tumoral significativamente menor que el grupo anti-PD1 (LVR01+anti-PD1 vs anti-PD1  $p=0,0447$ , t test) y que el grupo control (LVR01+anti-PD1 vs SF  $p=0,0090$ , t test) (Figura 3.2 D).



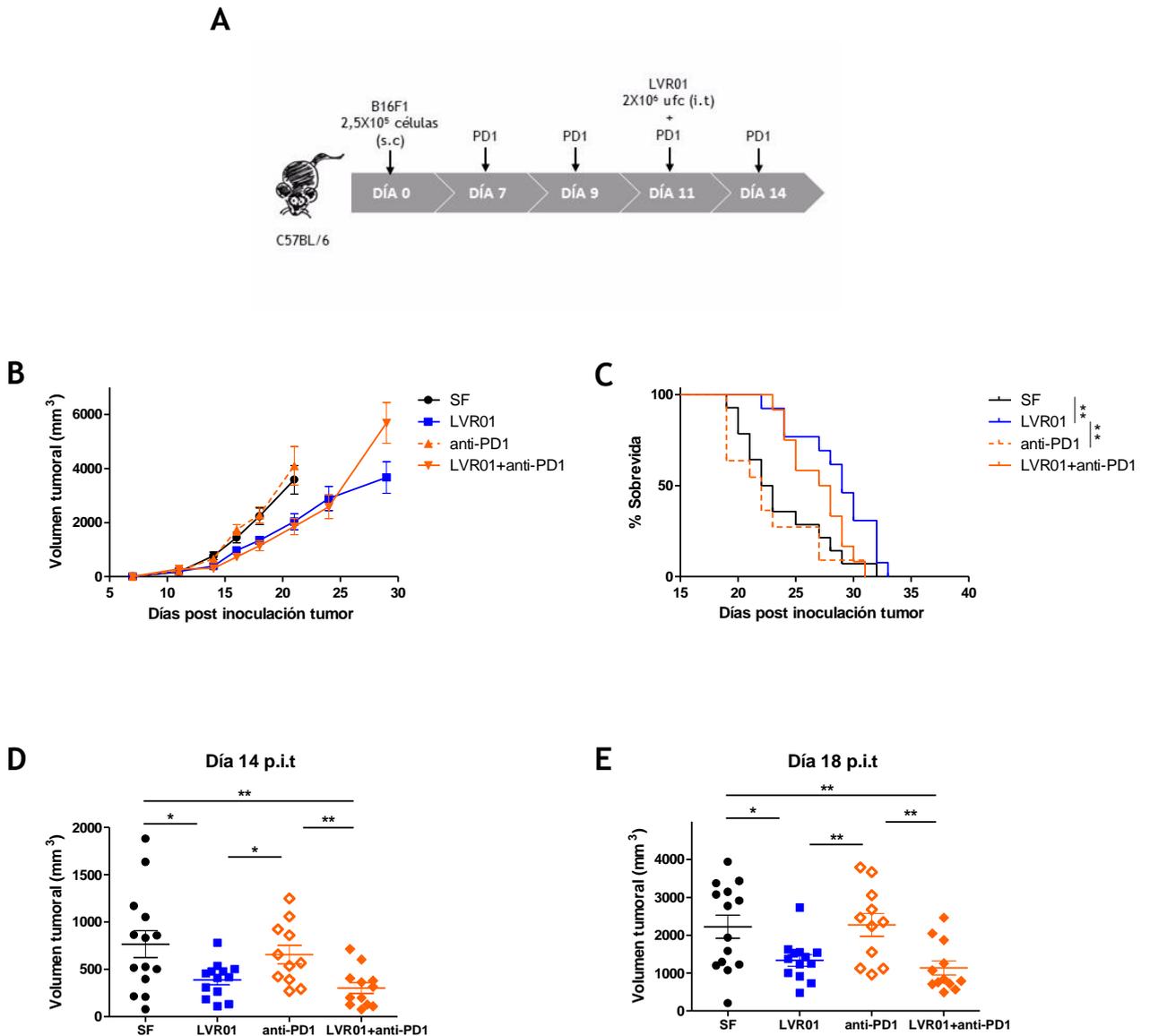
**Figura 3.1** - Puesta a punto de la terapia combinada LVR01+Aptámeros en modelo de melanoma murino. Esquema del diseño experimental (A). Comparación de los volúmenes tumorales al día 18 p.i.t. (B). Curvas de crecimiento tumoral y supervida de LVR01+anti-PD1 (C, D), LVR01+anti-TIM3 (E, F), LVR01+anti-CTLA4 y LVR01+NEG (G, H). Resultados representativos de 2 ensayos independientes. N=10 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, LVR01+anti-PD1: *Salmonella* combinada con aptámero anti-PD1, LVR01+anti-TIM3 (i.p): *Salmonella* combinada con aptámero anti-TIM3 administrado vía intraperitoneal, LVR01+anti-TIM3 (i.v): *Salmonella* combinada con aptámero anti-TIM3 administrado vía intravenosa, LVR01+anti-CTLA4: *Salmonella* combinada con aptámero anti-CTLA4, LVR01+NEG: *Salmonella* combinada con aptámero control negativo. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \* p<0,05 y \*\* p<0,01.

Al día 18 p.i.t, las medias de volumen tumoral para los grupos control, anti-PD1 y LVR01+anti-PD1 fueron de  $2229 \pm 304 \text{ mm}^3$ ,  $2275 \pm 301 \text{ mm}^3$  y  $1139 \pm 186 \text{ mm}^3$ , respectivamente. El grupo LVR01+anti-PD1 tuvo un volumen tumoral significativamente menor que el grupo anti-PD1 (LVR01+anti-PD1 vs anti-PD1  $p=0,0080$ , t test) y que el grupo control (LVR01+anti-PD1 vs SF  $p=0,0073$ , t test) (Figura 3.2 E). El efecto antitumoral observado fue modesto y puede deberse a la administración de *Salmonella*, ya que no se observan diferencias entre los ratones tratados con la terapia combinada respecto a los tratados con *Salmonella* como monoterapia. Las medias de volumen tumoral en el grupo LVR01 fueron de  $389 \pm 52 \text{ mm}^3$  (LVR01 vs LVR01+anti-PD1  $p=0,2850$ , t test) y  $1338 \pm 151 \text{ mm}^3$  (LVR01 vs LVR01+anti-PD1  $p=0,4109$ , t test) a los días 14 y 18 p.i.t, respectivamente (Figura 3.2 D, E). Dicho efecto en el tamaño tumoral se reflejó en la sobrevida global de los animales tratados con LVR01, pero no en los que recibieron la terapia combinada (Figura 3.2 C). La mediana de sobrevida del grupo LVR01 fue de 29 días p.i.t., mientras que para el grupo control fue de 22,5 días p.i.t. (LVR01 vs SF  $p=0,0046$ , log rank test) y para el grupo anti-PD1 fue de 22 días p.i.t. (LVR01 vs anti-PD1  $p= 0,0014$ , log rank test).

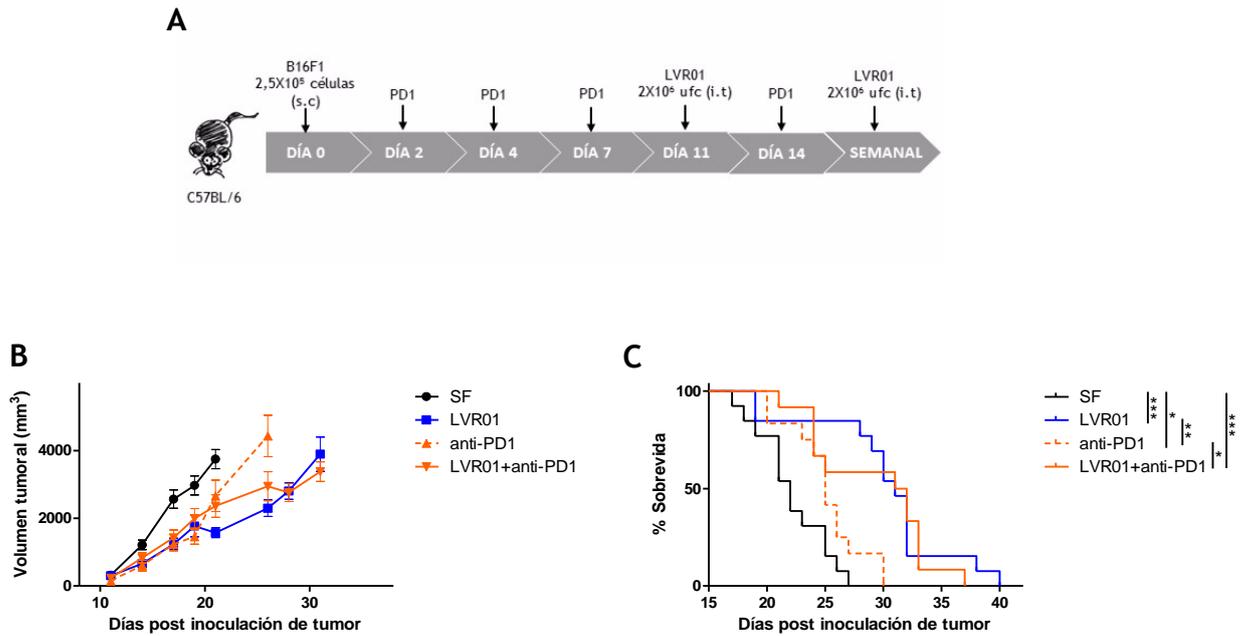
Se optó por modificar nuevamente el esquema de inmunización con el fin de obtener mejores resultados terapéuticos. En el nuevo esquema se planteó un inicio aún más temprano del tratamiento, al día 2 p.i.t. (Figura 3.3 A), en un esquema idéntico al que utilizan en el trabajo de referencia donde se describe el efecto antitumoral del aptámero anti-PD1 (Prodeus et al., 2015). Si pensamos en la eventual traslación a la clínica de este tipo de tratamiento se podría discutir que este esquema se aleja un poco de la experiencia clínica, ya que se requeriría de un diagnóstico temprano de la patología y frecuentemente se realiza el diagnóstico en etapas más avanzadas de la enfermedad, por lo que no podríamos comenzar un tratamiento en etapas tan tempranas. Sin embargo, a medida que se estudian y desarrollan nuevas terapias frente al cáncer, el campo de los métodos diagnósticos también se encuentra en continuo desarrollo. Por lo tanto, es posible pensar en la traslación a la clínica de este tipo de esquemas, si se aplican técnicas diagnósticas que lo permitan.

Para dicho esquema, se observó un enlentecimiento en el crecimiento tumoral de los animales que recibieron tratamiento, tanto en la terapia combinada como en las monoterapias, respecto al grupo control (Figura 3.3 B). También, se observó un aumento en la sobrevida global de los animales que recibieron la terapia combinada con respecto al grupo control y al grupo que recibió solo anti-PD1. La mediana de sobrevida del grupo LVR01+anti-PD1 fue de 31,5 días p.i.t., mientras que para el grupo control fue de 22 días p.i.t. (LVR01+anti-PD1 vs SF  $p=0,0007$ , log rank test) y para el grupo anti-PD1 fue de 25 días p.i.t. (LVR01+anti-PD1 vs anti-PD1  $p= 0,0129$ , log rank test). Además, se observó un aumento de la sobrevida global en el grupo anti-PD1 respecto al grupo control (anti-PD1 vs SF  $p=0,0403$ , log rank test). En los ratones tratados con LVR01 se observó un aumento de la sobrevida global respecto al grupo control (LVR01 vs SF  $p<0,0001$ , log rank test) y al grupo anti-PD1 (LVR01 vs anti-PD1  $p=0,0012$ , log rank test) (Figura 3.3 C). Nuevamente podemos inferir que el efecto antitumoral de la terapia combinada se debe a la acción de *Salmonella* en el

tumor, ya que no se observaron diferencias en la sobrevida global de los ratones que recibieron LVR01 respecto a los que recibieron LVR01+anti-PD1. En base a estas observaciones surge la pregunta de si la ausencia de efecto es debida a que el eje PD1/PD-L1 no tiene relevancia biológica en este modelo y por tanto no tiene sentido el bloqueo de PD1, o si es debida a la falta de funcionalidad por parte del aptámero.



**Figura 3.2** - Evaluación de la terapia combinada LVR01+anti-PD1 en modelo de melanoma murino. Esquema del diseño experimental (A). Curvas de crecimiento tumoral (B). Curvas de sobrevida (C). Comparación de volúmenes tumorales al día 14 p.i.t. (D) y al día 18 p.i.t. (E). Resultado de 1 experimento. N=12 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, anti-PD1: aptámero anti-PD1, LVR01+anti-PD1: *Salmonella* combinada con aptámero anti-PD1. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ .



**Figura 3.3** - Evaluación de la terapia combinada LVR01+anti-PD1 en modelo de melanoma murino. Esquema del diseño experimental (A). Curvas de crecimiento tumoral (B). Curvas de supervivencia (C). Resultados representativos de 2 experimentos independientes. N=12 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, anti-PD1: aptámero anti-PD1, LVR01+anti-PD1: *Salmonella* combinada con aptámero anti-PD1. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \* p<0,05, \*\* p<0,01 y \*\*\* p<0,001.

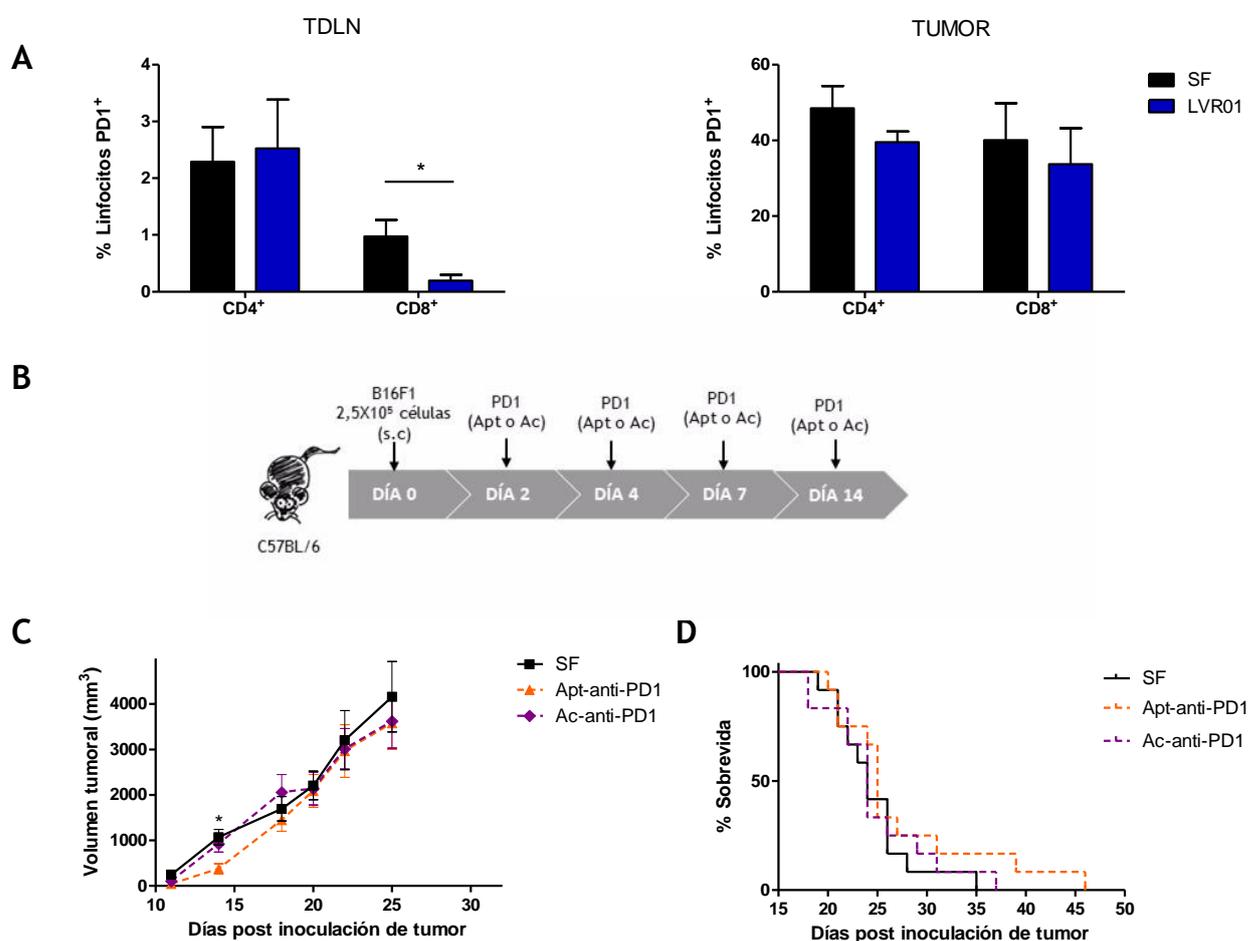
### 1.3. Estudio del eje PD1/PD-L1 y comparación del potencial terapéutico del aptámero contra PD1 con el del anticuerpo monoclonal comercial contra PD1 en el modelo de melanoma B16F1 subcutáneo.

Ante la ausencia de efecto terapéutico utilizando el aptámero anti-PD1 surge la interrogante de si los resultados mostrados anteriormente se debieron a que el bloqueo de PD1 en las distintas aproximaciones carece de efecto antitumoral relevante. Sabemos que la línea tumoral B16F1 expresa PD-L1 (Duarte, n.d.). Por tanto, nuestro siguiente paso fue analizar la expresión del receptor PD1. Para ello, se analizaron muestras de tumor y TDLN de ratones portadores de melanoma (Figura 3.4 A). Se observó que tanto los linfocitos T CD4<sup>+</sup> como los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ambos tejidos expresan PD1. Además, el tratamiento con *Salmonella* genera una reducción en la expresión de PD1 en los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en TDLN, lo que demuestra que el eje PD1/PD-L1 se somete a una regulación y sugiere que el mismo podría ser relevante en la respuesta antitumoral efectora producida por la terapia. Es decir, sería un blanco terapéutico funcional.

A pesar de demostrar la expresión de moléculas del eje PD1/PD-L1 y su regulación en el modelo utilizado, el bloqueo de PD1 no tiene impacto en la respuesta antitumoral. La hipótesis que surge de estas observaciones es que el aptámero no sea una molécula eficaz para realizar este bloqueo. Para responder esto se evaluó en paralelo el efecto terapéutico de un anticuerpo

comercial anti-PD1 y el aptámero anti-PD1, aplicando el esquema de inmunización que se muestra en la figura 3.4 B.

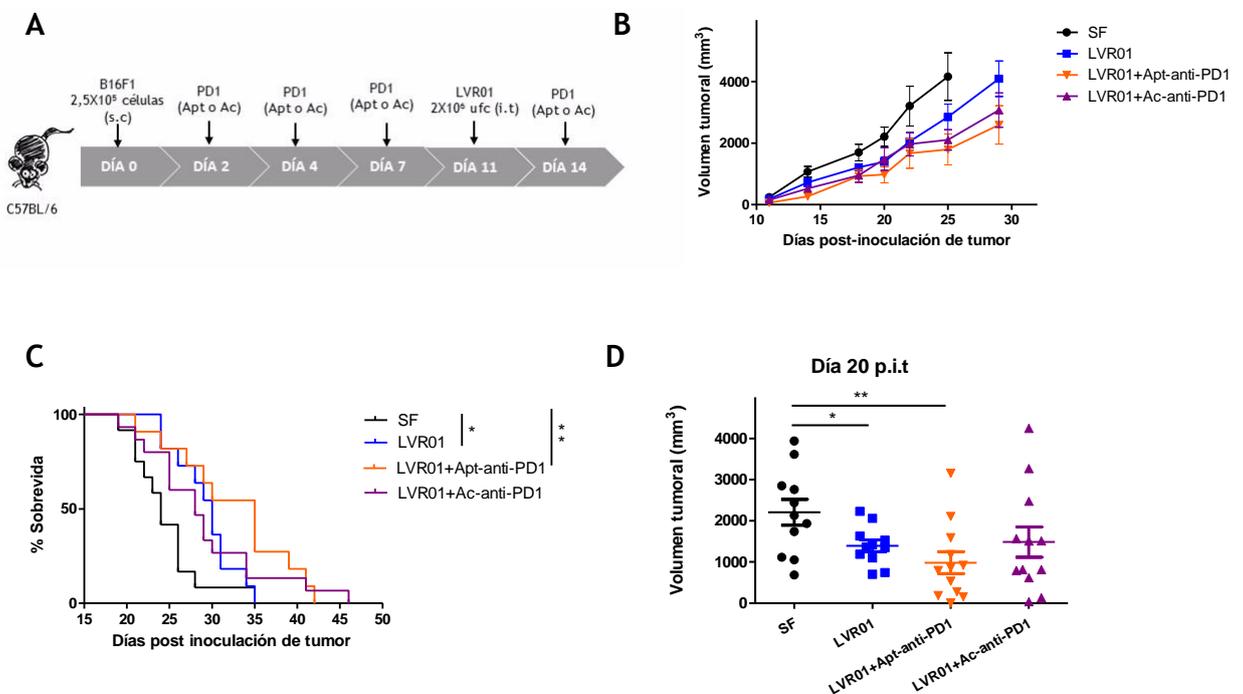
En este experimento, no se observaron diferencias significativas en las respuestas de los animales que recibieron la monoterapia con el anticuerpo anti-PD1 (Ac-anti-PD1) respecto a los que recibieron la monoterapia con aptámero anti-PD1 (Apt-anti-PD1) (Figura 3.4 C). Si bien al día 14 p.i.t. el grupo que recibió el aptámero anti-PD1 presentó un menor tamaño tumoral que el grupo tratado con anticuerpo anti-PD1, este comportamiento fue puntual y no se mantuvo a lo largo del tiempo. En cuanto a la sobrevida global no se observaron diferencias entre los grupos; las medianas de sobrevida fueron de 25 y 24 días p.i.t. para los grupos Apt-anti-PD1 y Ac-anti-PD1, respectivamente ( $p=0,2481$ , log rank test) (Figura 3.4 D).



**Figura 3.4** - Estudio del eje PD1/PD-L1 y comparación del potencial terapéutico del aptámero anti-PD1 vs el anticuerpo anti-PD1 en modelo de melanoma murino. Expresión de PD1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en TDLN y tumor (A). Esquema del diseño experimental (B). Curvas de crecimiento tumoral (C). Curvas de sobrevida (D). Resultado de 1 experimento. N=12 por grupo. SF: suero fisiológico, Apt-anti-PD1: aptámero anti-PD1, Ac-anti-PD1: anticuerpo anti-PD1. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*  $p < 0,05$ .

Cuando fueron ensayados en combinación con *Salmonella*, se observó un modesto enlentecimiento del crecimiento de los grupos que recibieron LVR01, ya sea como monoterapia o en terapia combinada, respecto al grupo control

(Figura 3.5 B). Al día 20 p.i.t., las medias de volumen tumoral para los grupos control, LVR01, LVR01+Ac-anti-PD1 y LVR01+Apt-anti-PD1 fueron de  $2206 \pm 315 \text{ mm}^3$ ,  $1393 \pm 143 \text{ mm}^3$ ,  $1484 \pm 368 \text{ mm}^3$  y  $982 \pm 267 \text{ mm}^3$ , respectivamente. El tamaño tumoral de LVR01 y LVR01+Apt-anti-PD1 fueron significativamente menores con respecto al grupo control (SF vs LVR01  $p=0,0289$ ; SF vs Apt-LVR01  $p=0,0071$ , t test) (Figura 3.5 D). En cuanto a la sobrevida, se observó un aumento de la sobrevida global en los grupos LVR01 y LVR01+Apt-anti-PD1, respecto al grupo control. La mediana de sobrevida en el grupo control fue de 24 días p.i.t., en el grupo LVR01 fue de 30 días p.i.t. (SF vs LVR01  $p=0,0356$ , log rank test) y en el grupo LVR01+Apt-anti-PD1 de 35 días p.i.t. (SF vs LVR01+Apt-anti-LVR01  $p=0,0026$ , log rank test) (Figura 3.5 C). Tal como se discutió en el apartado anterior, se infiere que la modesta reducción en el tamaño tumoral y aumento de la sobrevida global observada en los ratones tratados es principalmente por acción de la *Salmonella* en el microambiente tumoral.



**Figura 3.5** - Comparación del potencial terapéutico de las terapias combinadas LVR01 con aptámero anti-PD1 vs LVR01 con anticuerpo anti-PD1 en modelo de melanoma murino. Esquema del diseño experimental (A). Curvas de crecimiento tumoral (B). Curvas de sobrevida (C). Comparación de los volúmenes tumorales al día 20 p.i.t. (D). Resultado de 1 experimento. N=12 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, LVR01+Apt-anti-PD1: *Salmonella* con aptámero anti-PD1, LVR01+Ac-anti-PD1: *Salmonella* con anticuerpo anti-PD1. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ .

Con estos resultados se puede decir que el plan terapéutico propuesto para el modelo murino de melanoma B16F1 subcutáneo carece de un potencial antitumoral significativo, independientemente de la naturaleza de la molécula bloqueadora de PD1 que se utilice.

Una hipótesis que puede explicar estos resultados es que el eje PD1/PD-L1 no sea relevante en el modelo utilizado, confirmado por la ausencia de efecto con

las monoterapias con bloqueadores de PD1. Sumado a esto, se ha descrito que uno de los mecanismos por el cual *Salmonella* ejerce su efecto antitumoral es mediante la inducción de la disminución de la expresión de PD-L1 (Chen et al., 2020), esto también podría explicar por qué no observamos un efecto sinérgico al combinar ambas terapias, ya que actúan sobre el mismo eje.

En cuanto a la relevancia del bloqueo del eje PD1/PD-L1 en melanoma, la experiencia en clínica utilizando anticuerpos monoclonales tanto anti-PD1 como anti-PD-L1 ha sido exitosa. De hecho, en el año 2014 pembrolizumab y nivolumab, anticuerpos monoclonales que bloquean PD1, fueron aprobados por la FDA para el tratamiento de melanoma refractario y no resecable (Waldman et al., 2020). Esta evidencia nos demuestra que el eje sí cumple un rol relevante en la patología y nos reconduce a reflexionar sobre el modelo animal que utilizamos en este estudio.

Si observamos los antecedentes preclínicos que existen del uso de anticuerpos que bloquean puntos de control inhibitorios del sistema inmune en modelos murinos de melanoma, podemos ver que no siempre se obtuvieron resultados prometedores en estos ensayos. Sin embargo, al trasladar estas moléculas a la clínica se observa su efecto terapéutico. Sucedió en el caso de Ipilimumab (anticuerpo anti-CTLA4) que, a pesar de no obtener los resultados preclínicos esperados, al trasladarse la terapia a la clínica se demostró que el anticuerpo poseía un efecto terapéutico significativo en pacientes con melanoma fase III/IV (Waldman et al., 2020). En el modelo de melanoma esto sucede con frecuencia, ya que es un tipo de cáncer sumamente complejo y no siempre los modelos animales pueden reflejar lo que sucede en el humano. Por definición un modelo de una enfermedad no va a replicar todos los aspectos de la patología. Sin embargo, los modelos murinos de melanoma han aportado valiosa información: permitieron identificar mecanismos moleculares involucrados en la biología del melanoma, testear nuevos agentes terapéuticos y predecir algunos biomarcadores. En las últimas décadas las aproximaciones inmunoterapéuticas para tratar patologías oncológicas han tomado un gran protagonismo, principalmente por los resultados exitosos obtenidos en la clínica; y es justamente con estas aproximaciones que la traslación a la clínica de resultados obtenidos en modelos murinos no es tan reproducible. La relación entre las células tumorales, las células inmunes y el microambiente tumoral que se genera es difícil de reproducir en modelos preclínicos de melanoma. En el año 2003, el centro de investigación de cáncer del Instituto Nacional del Cáncer (NCI, EE.UU) promovió el programa de oncología comparativa para fomentar el uso de animales domésticos, principalmente perros, que generaron cáncer espontáneamente, como modelos de cáncer humanos. Una de las principales ventajas de estos modelos es que la ubicación anatómica del tumor y las características fisiológicas del mismo se asemejan a lo que ocurre en el humano (Barutello et al., 2018). A pesar de las evidentes ventajas que representan estos modelos aún nos encontramos lejos de poder utilizarlos rutinariamente, ya que también cuentan con diversas limitaciones: mayor variabilidad, dificultad de trabajar con un número grande de animales, falta de infraestructura para el alojamiento, falta de reactivos de investigación, entre otras.

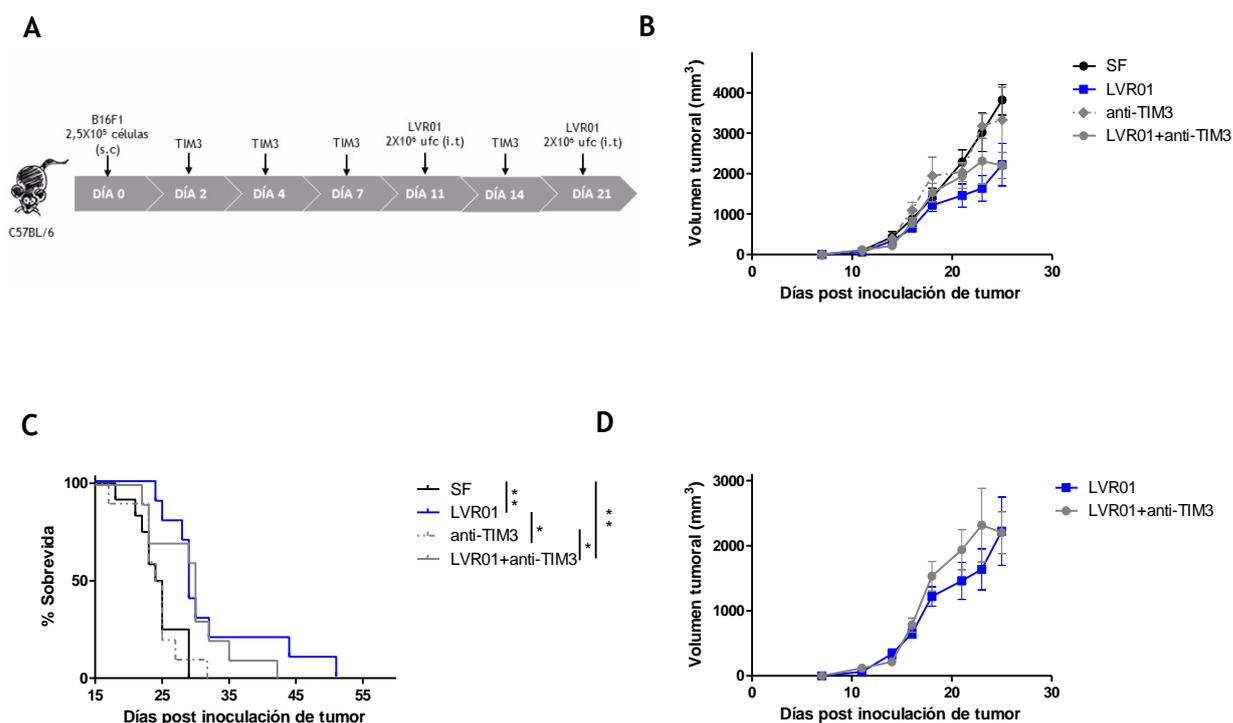
Debido a esto, surge la necesidad de encontrar un modelo animal de cáncer que nos brinde una ventana de tiempo de trabajo más amplia, tanto para administrar los tratamientos como para poder analizar la respuesta terapéutica en plazos más extendidos. Además, esto nos permitiría administrar mayor cantidad de dosis de los agentes inmunoterapéuticos a lo largo del tiempo.

#### **1.4. Optimización de la evaluación del potencial terapéutico de *Salmonella* LVR01 en combinación con aptámeros contra TIM3 en un modelo de melanoma B16F1 subcutáneo.**

En ausencia de los resultados esperados con la terapia anti-PD1, trabajamos en la optimización de la terapia combinada con *Salmonella* y el aptámero anti-TIM3, ya que el bloqueo de este punto de control en la puesta a punto con ratones portadores de tumores B16F1 mostró un potencial terapéutico moderado. Para ello se utilizó la aproximación experimental que arrojó los resultados terapéuticos de mayor potencial con anti-PD1. Se administraron 4 dosis del aptámero anti-TIM3 a los días 2, 4, 7 y 14 p.i.t., y 2 dosis de LVR01 a los días 11 y 21 p.i.t., como se muestra en la figura 3.6 A y se describe en detalle en M&M.

En este caso se observó un enlentecimiento en el crecimiento tumoral de los animales que recibieron LVR01 y la terapia combinada respecto al grupo control (Figura 3.6 B). Al día 25 p.i.t., las medias de volumen tumoral para los grupos control, LVR01 y LVR01+anti-TIM3 fueron de  $3824 \pm 337 \text{ mm}^3$ ,  $2223 \pm 525 \text{ mm}^3$  y  $2201 \pm 321 \text{ mm}^3$ , respectivamente (LVR01 vs SF  $p=0,0439$ ; LVR01+anti-TIM3 vs SF  $p=0,0071$ , t test). Se observó un aumento en la sobrevida de los animales que recibieron la terapia combinada con respecto al grupo control y al grupo que recibió anti-TIM3 (Figura 3.6 C). La mediana de sobrevida en el grupo control y del grupo TIM3 fueron de 24,5 días p.i.t., y la del grupo LVR01+anti-TIM3 fue de 30 días p.i.t. (LVR01+anti-TIM3 vs SF  $p=0,0070$ , log rank test; LVR01+anti-TIM3 vs anti-TIM3  $p=0,0437$ , log rank test). No se observaron diferencias significativas entre los ratones que recibieron la terapia combinada en comparación con aquellos que recibieron la monoterapia con *Salmonella*. Por lo que podemos inferir nuevamente que el efecto observado se debe a la acción antitumoral de *Salmonella*.

Resulta interesante observar el comportamiento que tiene la curva de volumen tumoral de los ratones del grupo LVR01+anti-TIM3 en comparación con el grupo LVR01 (Figura 3.6 D). Si bien no hay diferencias estadísticamente significativas en los volúmenes graficados, la curva de crecimiento tumoral de LVR01+anti-TIM3 muestra una tendencia a un crecimiento tumoral más acelerado al inicio y en el entorno del día 24 p.i.t. observamos que el crecimiento comienza a enlentecerse, pudiendo inferir que podría estar dándose una respuesta inmune tardía. Esto toma sentido si pensamos en el rol fisiológico de la expresión de TIM3 en los linfocitos, descrito para los linfocitos T exhaustos. De hecho, se postula TIM3 como un marcador adicional a la expresión de PD1 para identificar linfocitos con un fenotipo exhausto (Tsai and Hsu, 2017).



**Figura 3.6** - Evaluación de la terapia combinada LVR01+anti-TIM3 en modelo de melanoma murino. Esquema del diseño experimental (A). Curvas de crecimiento tumoral (B). Curvas de sobrevivida (C). Comparación de curvas de crecimiento tumoral LVR01 vs LVR01+anti-TIM3 (D). Resultado de 1 experimento. N=12 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, anti-TIM3: aptámero anti-TIM3, LVR01+anti-TIM3: *Salmonella* combinada con aptámero anti-TIM3. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \* p<0,05 y \*\* p<0,01.

Una limitante del modelo de melanoma murino que utilizamos en este trabajo es que el tumor se desarrolla rápidamente. Esto dificulta realizar un análisis de la respuesta inmune tardía, ya que los animales (principalmente los del grupo control) alcanzan el punto final de volumen tumoral de 4000 mm<sup>3</sup> en tiempos cortos. Debido a esto, surge la necesidad de encontrar un modelo animal de cáncer que nos brinde una ventana de tiempo de trabajo más amplia, tanto para administrar los tratamientos como para poder analizar la respuesta terapéutica en plazos más extendidos.

A pesar de la posible potencialidad terapéutica que se puede observar en los resultados, el aptámero anti-TIM3 se dejó de utilizar en este trabajo debido a limitaciones de tiempo y costo que conllevaba obtenerlo.

## 2. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE *SALMONELLA* LVR01 EN COMBINACIÓN CON MOLÉCULAS QUE BLOQUEAN PD1 EN UN MODELO DE CÁNCER DE COLON CT26 SUBCUTÁNEO.

### 2.1. Puesta a punto del tratamiento con *Salmonella* LVR01 en el modelo de cáncer de colon CT26 subcutáneo.

Ante la ausencia de efecto del bloqueo de PD1 en el modelo murino de melanoma B16F1 subcutáneo, se optó por evaluar la estrategia terapéutica en otro modelo, carcinoma de colon CT26, en el cual el potencial terapéutico de la inhibición de PD1 ya fue descrita. Para ello, primero se realizó la puesta a punto del modelo murino tumoral y del tratamiento con LVR01 en este modelo.

En el primer ensayo de la puesta a punto, se administraron dos dosis de LVR01: al día 11 p.i.t., manteniendo el criterio que utilizábamos en el modelo de melanoma de tumor palpable, y la segunda al día 26 p.i.t. (Figura 3.7 A). Se observó un enlentecimiento en el crecimiento tumoral del grupo LVR01 respecto al grupo control, se registró un tamaño tumoral significativamente menor en los días 13, 15, 18, 21, 29 y 32 p.i.t. (Figura 3.7 B). Sin embargo, no se observó una diferencia significativa en la sobrevida global entre ambos grupos (Figura 3.7 C), a pesar de que la mediana de sobrevida del grupo SF fue de 33 días p.i.t. y la del grupo LVR01 fue de 42 días p.i.t. (SF vs LVR01  $p=0,0652$ , log rank test).

A raíz de estos resultados se decidió modificar levemente el diseño experimental con dosis de LVR01 administradas semanalmente (Figura 3.8 A). Se observó un enlentecimiento del crecimiento tumoral en ratones tratados con LVR01 respecto a los que recibieron suero fisiológico, y este efecto se vio reflejado en la sobrevida (Figura 3.8 B, C). La mediana de sobrevida del grupo control fue de 36 días p.i.t. y la del grupo LVR01 fue de 44 días p.i.t. (SF vs LVR01  $p=0,0058$ , log rank test).

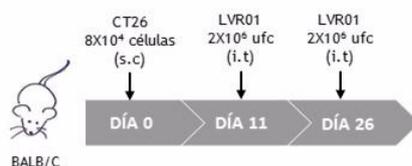
La administración semanal de LVR01 permitió observar las diferencias en el tamaño tumoral y sobrevida esperadas, y brindó esa ventana temporal más amplia para trabajar. Cabe mencionar que en este modelo alrededor de un 5% de los tumores implantados no se desarrollan, posiblemente debido a la baja carga tumoral que implantamos lo que permite que las células tumorales sean eliminadas por la respuesta inmune de los ratones. Si bien existen trabajos en que los modelos tumorales con CT26 difieren del utilizado aquí, donde se inoculan una alta carga de células tumorales ( $1 \times 10^6$  vs  $8 \times 10^4$  células) esta aproximación permite un efecto más notorio de *Salmonella*, ajustándose los objetivos que se propuso evaluar.

### 2.2. Análisis del potencial terapéutico de *Salmonella* LVR01 en combinación con aptámeros anti-PD1 en un modelo de cáncer de colon CT26 subcutáneo.

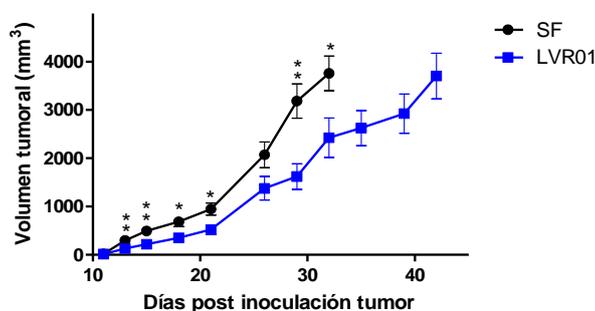
Para evaluar los efectos de la terapia combinada se utilizó como base el esquema terapéutico que mostró mejores resultados en el modelo de melanoma y la puesta a punto que observamos en la sección anterior. Por ende, los aptámeros se administraron a los días 2, 4, 7 y 14 p.i.t., y LVR01 se

administró al día 11 p.i.t. y luego semanalmente (Figura 3.9 A). En este ensayo, se observó un enlentecimiento del crecimiento tumoral del grupo de ratones que recibieron la terapia combinada respecto a los grupos que recibieron las monoterapias y el grupo control (Figura 3.9 B). Al día 24 p.i.t., las medias de volumen tumoral para los grupos control, LVR01, anti-PD1 y LVR01+anti-PD1 fueron de  $1340 \pm 305 \text{ mm}^3$ ,  $1100 \pm 200 \text{ mm}^3$ ,  $1253 \pm 305 \text{ mm}^3$  y  $550 \pm 139 \text{ mm}^3$ , respectivamente. El tamaño tumoral de LVR01+Apt-anti-PD1 fue significativamente menor que respecto grupo control (SF vs LVR01+anti-PD1  $p=0,0279$ , t test), al grupo LVR01 (LVR01 vs LVR01+anti-PD1  $p=0,0344$ , t test) y al grupo anti-PD1 (anti-PD1 vs LVR01+anti-PD1  $p=0,0479$ , t test) (Figura 3.9 D). Se observó un aumento en la supervivencia global de los ratones que recibieron la terapia combinada respecto al grupo que recibió la terapia anti-PD1; se registró una mediana de supervivencia para el grupo anti-PD1 de 32,5 días p.i.t. y para el grupo LVR01+anti-PD1 de 46 días p.i.t. (anti-PD1 vs LVR01+anti-PD1  $p=0,0406$ , log rank test) (Figura 3.9 C).

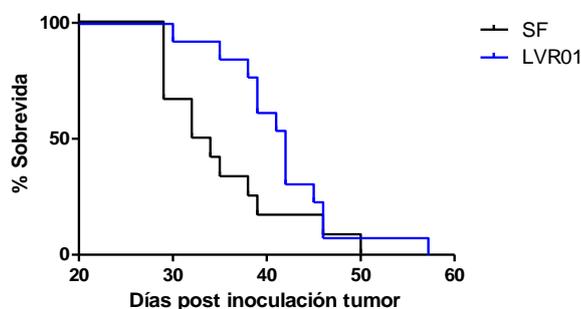
A



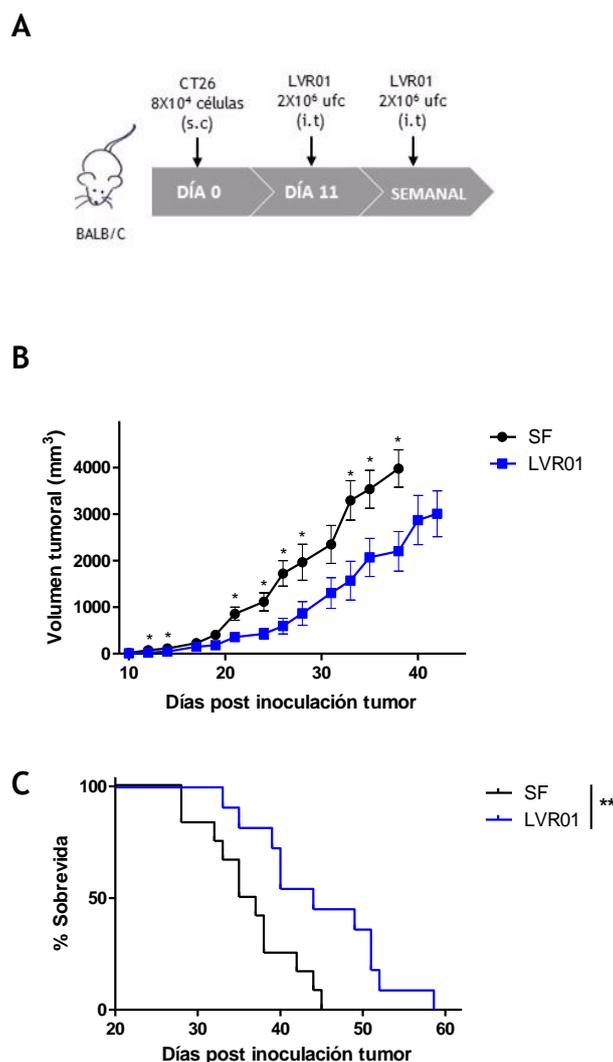
B



C

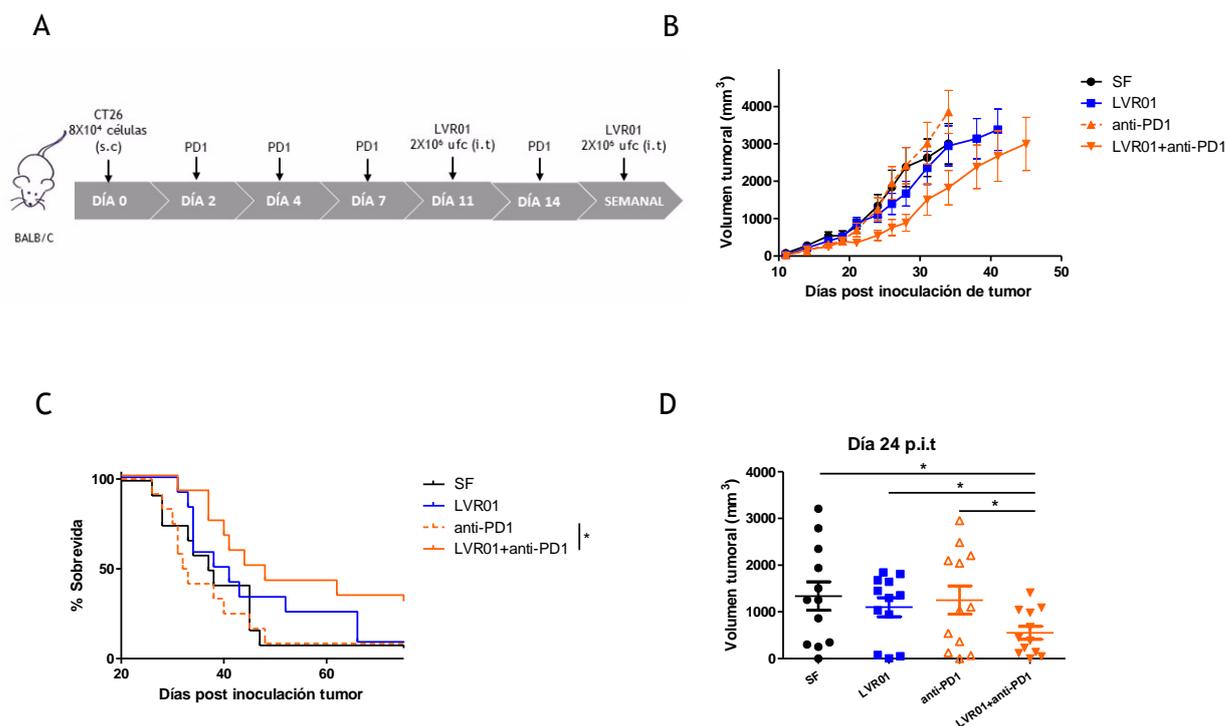


**Figura 3.7** - Puesta a punto de la terapia LVR01 en modelo de cáncer de colon murino. Esquema del diseño experimental (A). Curvas de crecimiento tumoral (B). Curvas de supervivencia (C). Resultado representativo de 2 experimentos independientes. N=12 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*  $p < 0,05$  y \*\*  $p < 0,01$ .



**Figura 3.8** - Evaluación de la terapia LVR01 en modelo de cáncer de colon murino. Esquema del diseño experimental (A). Curvas de crecimiento tumoral (B). Curvas de supervivencia (C). Resultado representativo de 2 experimentos independientes. N=12 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \* p<0,05 y \*\* p<0,01.

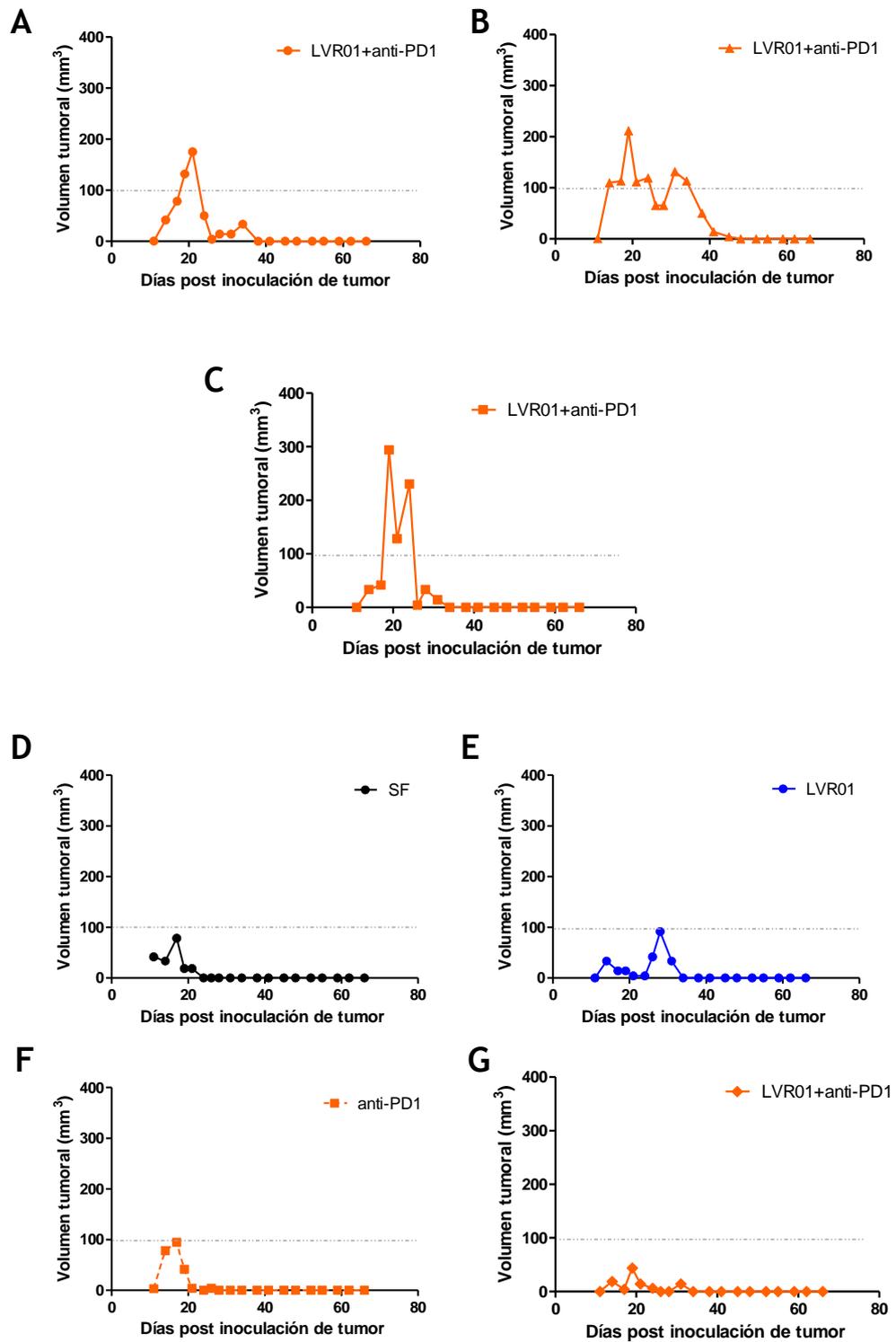
Cabe destacar que 7 (15 %) de los ratones del ensayo sobrevivieron, ya que no desarrollaron tumor o presentaron remisión completa del tumor. Como se mencionó anteriormente aproximadamente el 5% de los tumores implantados no se desarrollan, independientemente de la terapia. Al tener los ratones individualizados se pudo hacer el seguimiento de la evolución del volumen tumoral en cada animal. Pudimos entonces inferir que 3 de los 12 ratones tratados con LVR01+anti-PD1 presentaron una remisión completa del tumor (Figura 3.10 A, B, C) y 4 ratones no desarrollaron tumor (1 del grupo SF, 1 del grupo LVR01, 1 del grupo anti-PD1 y 1 del grupo LVR01+anti-PD1) (Figura 3.10 D, E, F, G). Esta inferencia se realizó considerando que en los ratones que presentaron un volumen tumoral mayor a 100 mm<sup>3</sup>, el tumor implantado se desarrolló y hubo una remisión; mientras que en los ratones que presentaron volúmenes tumorales menores a 100 mm<sup>3</sup>, el tumor no se desarrolló. En los ratones que no desarrollaron tumor, el volumen tumoral que es detectado al inicio puede deberse al proceso inflamatorio que se produce al implantar el tumor.



**Figura 3.9** - Evaluación de la terapia combinada LVR01+anti-PD1 en modelo de cáncer de colon murino. Esquema del diseño experimental (A). Curvas de crecimiento tumoral (B). Curvas de supervivencia (C). Comparación de volúmenes tumorales al día 24 p.i.t. (D). Resultado representativo de 2 experimentos independientes. N=12 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, anti-PD1: aptámero anti-PD1, LVR01+anti-PD1: *Salmonella* combinada con aptámero anti-PD1. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*  $p < 0,05$ .

A pesar de no poder apreciar efecto terapéutico del aptámero antagonista de PD1 como monoterapia como estaba descrito en la bibliografía, estos resultados nos permiten afirmar que contamos con un modelo tumoral donde la terapia combinada evidencia un potencial terapéutico superior a cualquiera de las dos monoterapias. Esto amerita que se continúen estudiando y elucidando los mecanismos inmunes subyacentes a esta respuesta antitumoral.

La administración de una carga tumoral baja y el inicio temprano del tratamiento podrían permitir al sistema inmune controlar el desarrollo tumoral desde estadios tempranos y esto podría explicar parcialmente el mayor potencial terapéutico que se observa con la terapia combinada en este modelo.



**Figura 3.10** - Curvas de crecimiento tumoral de ratones individualizados tratados con la terapia combinada LVR01+anti-PD1 que presentaron remisión del tumor (A, B, C) y de ratones que no desarrollaron tumor de los grupos SF (D), LVR01 (E), anti-PD1 (F), LVR01+anti-PD1 (G). La línea discontinua color gris indica el volumen tumoral de 100 mm<sup>3</sup>. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, anti-PD1: aptámero anti-PD1, LVR01+anti-PD1: *Salmonella* combinada con aptámero anti-PD1.

### 2.3. Comparación del potencial terapéutico del aptámero anti-PD1 con el del anticuerpo monoclonal comercial en el modelo de cáncer de colon CT26 subcutáneo.

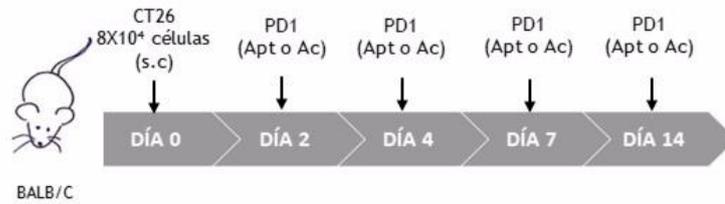
Antes de evaluar la respuesta inmune que produce la terapia combinada de *Salmonella* combinada con aptámeros anti-PD1 en el modelo murino de cáncer de colon, se comparó el potencial del aptámero con su respectivo anticuerpo en este modelo. Para esto, se evaluó en paralelo el efecto terapéutico del anticuerpo comercial y del aptámero anti-PD1 aplicando el esquema terapéutico que se observa en la figura 3.11 A. No se observaron diferencias significativas en las respuestas de los animales que recibieron la monoterapia con el anticuerpo anti-PD1 (Ac-anti-PD1) respecto a los que recibieron la monoterapia con aptámero anti-PD1 (Apt-anti-PD1). Sin embargo, al comparar el efecto antitumoral de ambas monoterapias con respecto al grupo control, vemos un discreto enlentecimiento en el crecimiento tumoral en el grupo que recibió Ac-anti-PD1 (Figura 3.11 B) y un aumento significativo en la supervivencia global. La mediana de la supervivencia del grupo SF fue de 33 días p.i.t. y la del grupo Ac-anti-PD1 fue de 38 días p.i.t. (SF vs Ac-anti-PD1  $p=0,0397$ , log rank test) (Figura 3.11 C).

Se observó un comportamiento similar con las terapias combinadas. El grupo que LVR01+Ac-anti-PD1 presentó un enlentecimiento del crecimiento tumoral respecto al grupo control y un aumento en la supervivencia más marcado. La mediana de supervivencia del grupo control fue de 33 días p.i.t. y la del grupo LVR01+Ac-anti-PD1 fue de 40 días p.i.t. (SF vs LVR01+Ac-anti-PD1  $p=0,0074$ , log rank test) (Figura 3.12).

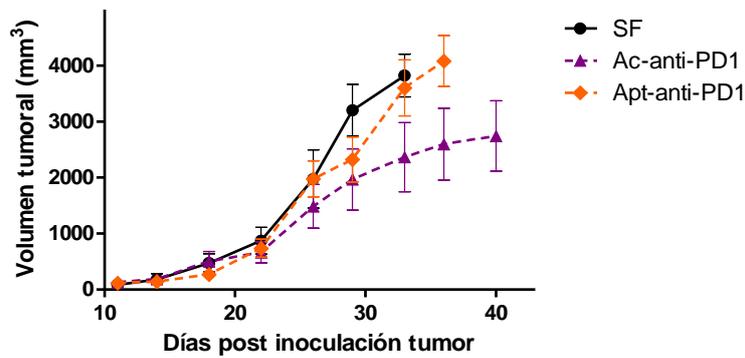
La terapia combinada en el modelo de cáncer de colon resultó tener un mayor potencial terapéutico que en melanoma. Se observa un enlentecimiento del crecimiento tumoral y un porcentaje de animales que presentan remisión completa del tumor o no llegan a desarrollarlo.

Para entender estas diferencias entre los modelos se plantearon diversas preguntas a responder en los siguientes experimentos: (1) ¿La molécula anti-PD1 tiene una mayor llegada al sitio de acción en el modelo de cáncer de colon murino CT26 subcutáneo respecto al modelo de melanoma murino B16F1 subcutáneo?, (2) ¿En el modelo de cáncer de colon murino CT26 hay una mayor expresión de PD1 que en el modelo de melanoma murino B16F1?

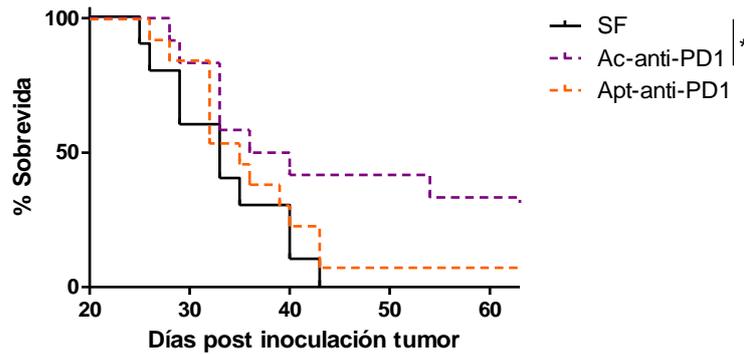
A



B

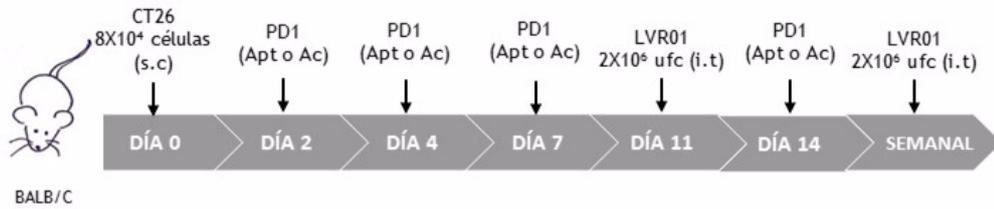


C

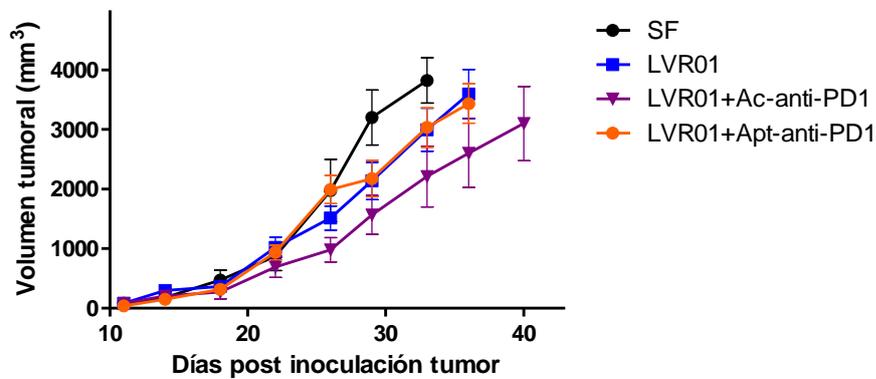


**Figura 3.11** - Comparación del potencial terapéutico del aptámero anti-PD1 vs el anticuerpo anti-PD1 en modelo de cáncer de colon murino. Esquema del diseño experimental (A). Curvas de crecimiento tumoral (B). Curvas de supervivencia (C). Resultado representativo de 2 experimentos independientes. N=12 por grupo. SF: suero fisiológico, Apt-anti-PD1: aptámero anti-PD1, Ac-anti-PD1: anticuerpo anti-PD1. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*  $p < 0,05$ .

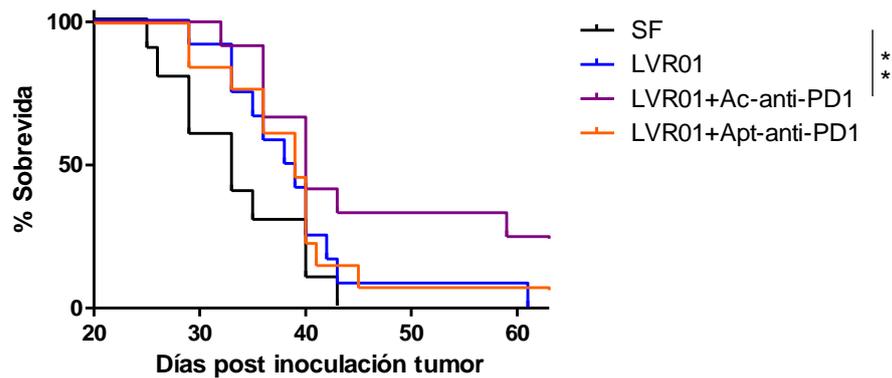
**A**



**B**



**C**

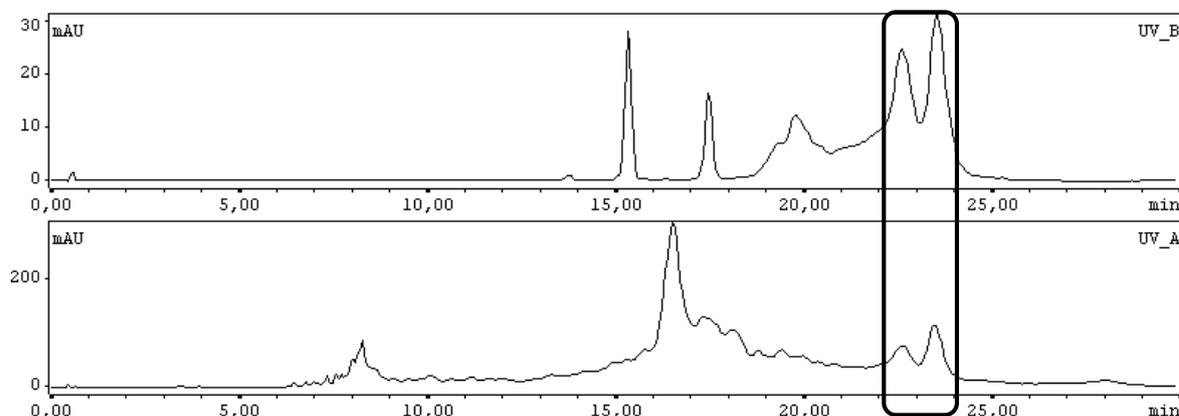


**Figura 3.12** - Comparación del potencial terapéutico de las terapias combinadas LVR01 con aptámero anti-PD1 vs LVR01 con anticuerpo anti-PD1 en modelo de cáncer de colon murino. Esquema del diseño experimental (A). Curvas de crecimiento tumoral (B). Curvas de sobrevida (C). Resultado representativo de 2 experimentos independientes. N=12 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, LVR01+Apt-anti-PD1: *Salmonella* con aptámero anti-PD1, LVR01+Ac-anti-PD1: *Salmonella* con anticuerpo anti-PD1. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*\*  $p < 0,01$ .

### 3. EVALUACIÓN DE LA BIODISTRIBUCIÓN DEL APTÁMERO CONTRA PD1 EN EL MODELO MURINO DE MELANOMA Y DE CÁNCER DE COLON.

#### 3.1. Derivatización del aptámero.

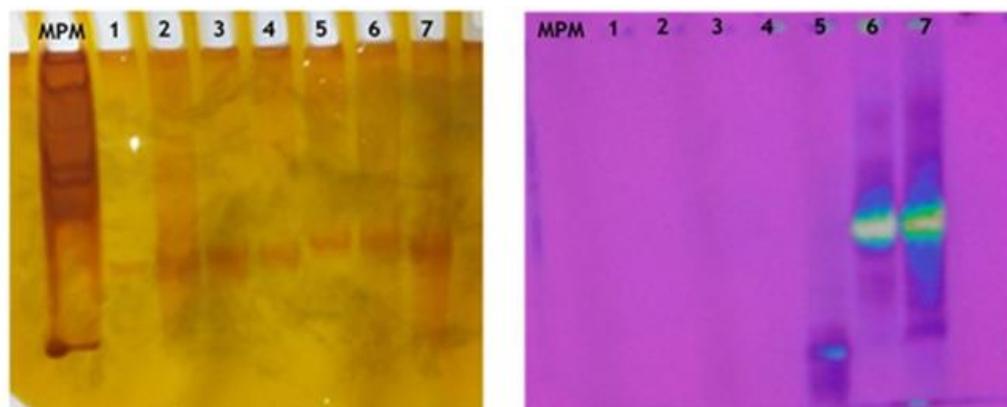
Para poder abordar las preguntas mencionadas anteriormente se necesitó generar una sonda del aptámero anti-PD1. Para ello se realizó la marcación con un fluoróforo, a modo de poder realizar su seguimiento mediante imagenología molecular, y evaluar si existen diferencias en la expresión *in vivo* de PD1. Para ello, se realizó una reacción de derivatización del aptámero anti-PD1 con Alexa-647. Esta reacción fue posible ya que todos los aptámeros adquiridos fueron solicitados con un grupo aminohexilo en el extremo 5' terminal que sirve de *linker* para conjugar otros compuestos como Alexa-647-NHS (Alexa-647 con un grupo reactivo éster N- hidroxisuccinidilo) (Calzada et al., 2017). Los ésteres activos como la N- hidroxysuccinimida (NHS) se pueden usar para formar un enlace amida entre las aminas primarias (R-NH<sub>2</sub>) de proteínas, oligonucleótidos u otras biomoléculas y un fluoróforo (Thermo-Fisher, n.d.). Se realizó una reacción de 2 horas donde se colocó el aptámero anti-PD1 junto a Alexa-647-NHS en una relación molar 2:1 (Alexa647-NHS:PD1). Luego se procedió a confirmar si la conjugación fue exitosa, para lo cual se estudió el producto de la reacción por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). En la figura 3.14 se observan los resultados obtenidos, el seguimiento de las señales se realizó por detector UV a las longitudes de onda 647 nm y 260 nm (referenciados en la figura 3.14 como UV\_B y UV\_A) donde se observa Alexa-647 y aptámero, respectivamente. Se observaron 6 picos a 647 nm, 2 de ellos muy cercanos entre sí y candidatos a ser los correspondientes aptámeros conjugados, ya que coinciden con 2 picos que se observan a 260 nm.



**Figura 3.14** - Cromatograma del aptámero derivatizado. UV\_B: detector UV a 647nm, donde se espera encontrar Alexa-647 (arriba); UV\_A: detector UV a 260 nm, donde se espera encontrar al aptámero (abajo). En el recuadro negro están señalados los picos donde se sospecha que están los aptámeros conjugados Apt-anti-PD1-Alexa-647.

Se purificaron los productos de las 6 fracciones observadas por HPLC, y mediante electroforesis se determinó que efectivamente el aptámero conjugado se encontraba en las fracciones correspondientes al quinto y sexto pico (Figura 3.14), en los carriles 6 y 7 de gel (Figura 3.15). Mediante HPLC se purificó el producto identificado y se procedió a la cuantificación del mismo por espectrofotometría. El rendimiento de la reacción fue bajo (9,1%): se

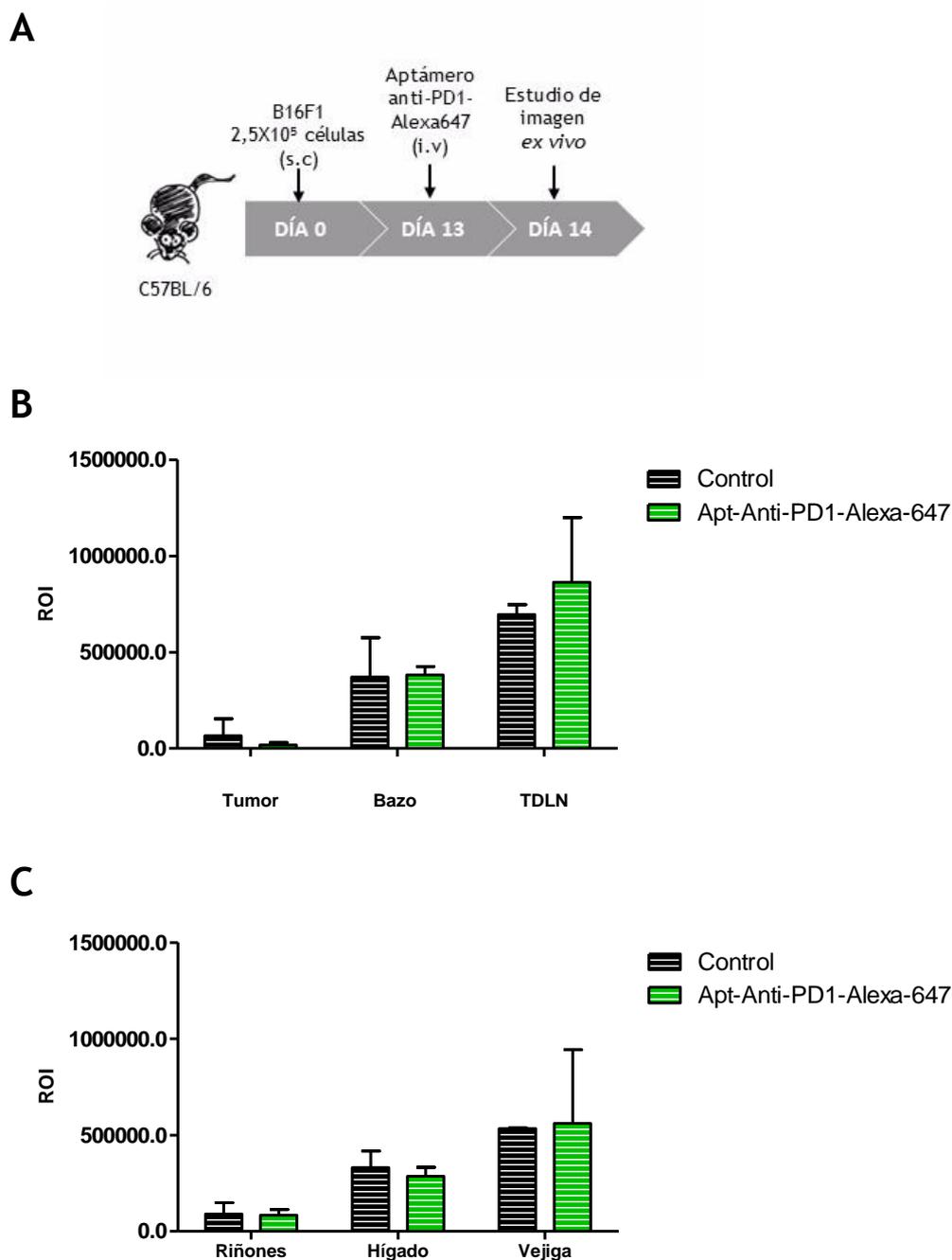
obtuvieron 91  $\mu\text{g}$  del aptámero anti-PD1 conjugado a Alexa-647 de 1000  $\mu\text{g}$  de aptámero anti-PD1 que se puso en inicialmente en la reacción. Considerando que para realizar un estudio de imagen se requiere de un mínimo de 10  $\mu\text{g}$  de sonda por ratón, se obtuvo cantidad suficiente como para poder realizar los ensayos previstos en el modelo murino.



**Figura 3.15** - Determinación de fracción que contiene el aptámero anti-PD1-Alexa647 por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Revelado por tinción con nitrato de plata (izquierda) y por medición de fluorescencia utilizando In-Vivo MS FX PRO (derecha). MPM: marcador de peso molecular; los carriles 1-7 corresponden a las fracciones que contienen los picos 1-6 del cromatograma, de la siguiente manera: Carril 1: Pico 1; Carril 2: Pico 2; Carril 3: Pico 3; Carriles 4 y 5: Pico 4; Carril 6: Pico 5; Carril 7: Pico 6.

### 3.2. Evaluación de la biodistribución del aptámero contra PD1 en el modelo murino de melanoma a las 24 horas.

En una primera instancia, se evaluó la biodistribución del aptámero anti-PD1-Alexa-647 administrado de forma intravenosa en el modelo de melanoma a las 24 horas mediante un estudio de imagen *ex vivo* (Figura 3.16 A). Se hizo particular énfasis en el tumor y los tejidos linfoides asociados (TDLN y bazo), donde esperamos encontrar los linfocitos T expresando PD1, y los órganos involucrados en la eliminación de sustancias del organismo (vejiga, riñón e hígado). A nivel de tumor no se observó una captación del aptámero, ya que no se hallaron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia entre los tumores del grupo control y del que recibió el aptámero conjugado. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia entre los órganos linfáticos, y los encargados de la eliminación (Figura 3.16 B, C). Con estos resultados podemos inferir que a las 24 horas se eliminó casi todo el aptámero conjugado administrado a los animales.



**Figura 3.16** - Biodistribución del aptámero anti-PD1 en el modelo murino de melanoma B16F1 a las 24 horas. Esquema del diseño experimental (A). Intensidad de fluorescencia neta corregida por peso en órganos linfáticos (B) y órganos encargados de la eliminación (C).

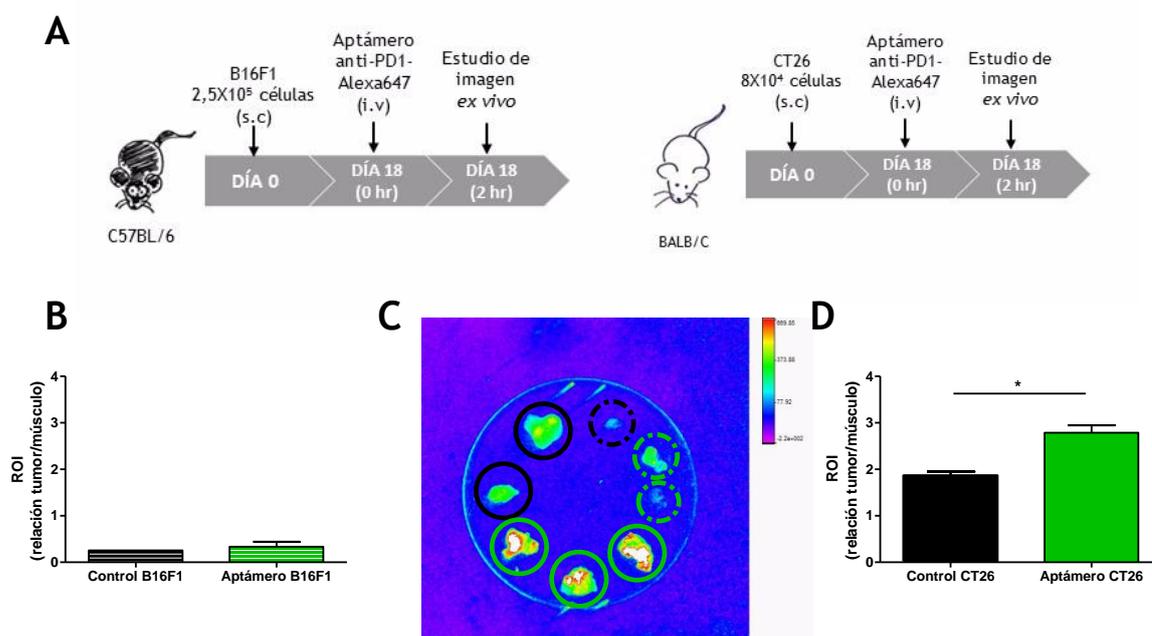
El pequeño tamaño molecular de los aptámeros constituye tanto una ventaja como una desventaja cuando se aplica *in vivo*. Por un lado, facilita la penetración a los tejidos ya que el impedimento estérico es menor comparado con otras moléculas de mayor tamaño, esto puede ser ventajoso tanto para aplicaciones terapéuticas como de imagenología molecular. Por otro lado, es eliminado rápidamente del organismo, lo que puede constituir una desventaja desde una perspectiva de aplicación terapéutica (Fu and Xiang, 2020). Por tanto, el resultado obtenido en la biodistribución del aptámero conjugado a las 24 horas se encuentra dentro de un comportamiento esperado, donde a causa

de su tamaño molecular parecería depurarse rápidamente del organismo. Sin embargo, en experiencias previas del grupo de investigación utilizando aptámeros dirigidos contra moléculas altamente expresadas en tumores (aptámero Sgc8-c) como herramientas imagenológicas, se observó su presencia en tumores (melanomas y linfomas) a las 24 horas e incluso a las 48 horas luego de la administración del mismo (Calzada, 2020; Calzada et al., 2017; Sicco et al., 2020). Podemos inferir que en el modelo murino utilizado puede haber una baja expresión de la molécula PD1, y que, por tanto, el aptámero no está siendo captado el tiempo suficiente como para visualizarlo a las 24 horas. Nos pareció importante evaluar la biodistribución del aptámero a tiempos más tempranos y comprar la biodistribución en los dos modelos tumorales que están puestos a punto (melanoma y cáncer de colon), de modo de poder identificar diferencias que nos permitan comprender el efecto de la terapia en cada uno de ellos.

### 3.3. Evaluación de la biodistribución del aptámero contra PD1 en el modelo murino de melanoma y de cáncer de colon a las 2 horas.

Se procedió entonces a evaluar la biodistribución del aptámero anti-PD1-Alexa647 en los modelos murinos de melanoma (B16F1) y cáncer de colon (CT26). Se administraron los aptámeros conjugados por vía intravenosa, y a las 2 horas se realizó el estudio de imagen *ex vivo* (Figura 3.17 A). Se observó una mayor señal de fluorescencia en los tumores CT26 que recibieron el aptámero conjugado respecto al grupo control ( $p=0,0230$ , t test) (Figura 3.17 D), mientras que no se observaron diferencias en los tumores B16F1 (Figura 3.17 B). Este resultado nos da un indicio para poder explicar por qué el potencial terapéutico de la terapia combinada es mayor en el modelo de cáncer de colon respecto al modelo de melanoma. Encontrar diferencias únicamente en el modelo CT26 nos sirve de insumo para fundamentar que existe una mayor captación de PD1 en el órgano blanco al que va dirigida la terapia. Si bien en este trabajo no se evaluó qué sucede con la biodistribución del aptámero conjugado en el modelo CT26 en tiempos más tardíos y no podemos afirmar que esta captación se sostiene en el tiempo, el mayor potencial terapéutico observado en los ensayos *in vivo* indicaría que es plausible. También resulta de interés analizar más en profundidad si esta captación diferencial que se observa en ambos modelos tumorales se correlaciona con una expresión diferencial de PD1 *in vitro*, esto ayudaría a comprender las diferencias observadas.

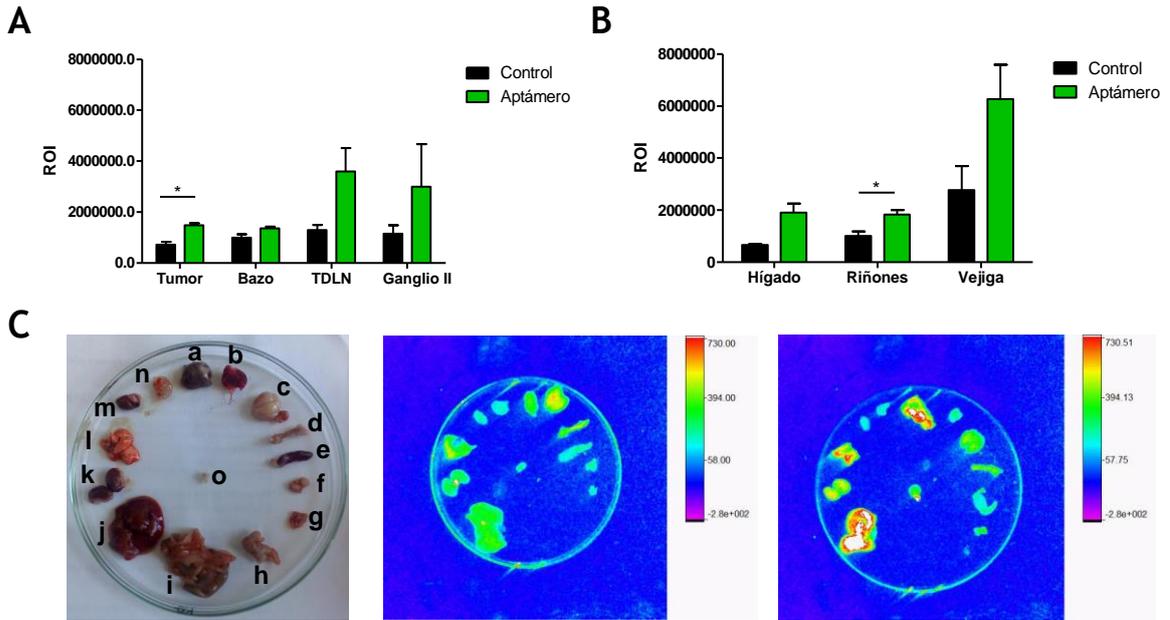
En el modelo de cáncer de colon CT26, además de la mayor intensidad de fluorescencia a nivel de tumor discutida anteriormente ( $p=0,0118$ , t test), se observó una tendencia a una mayor intensidad de fluorescencia en los órganos linfáticos de los grupos que recibieron el aptámero conjugado respecto al control (Figura 3.18 A). Al analizar los órganos encargados de la eliminación del aptámero, se observó un aumento significativo de la intensidad de fluorescencia en riñón ( $p=0,0473$ , t test) y una tendencia a un aumento en el resto de los órganos del grupo que recibió el aptámero conjugado respecto al grupo control (Figura 3.18 B).



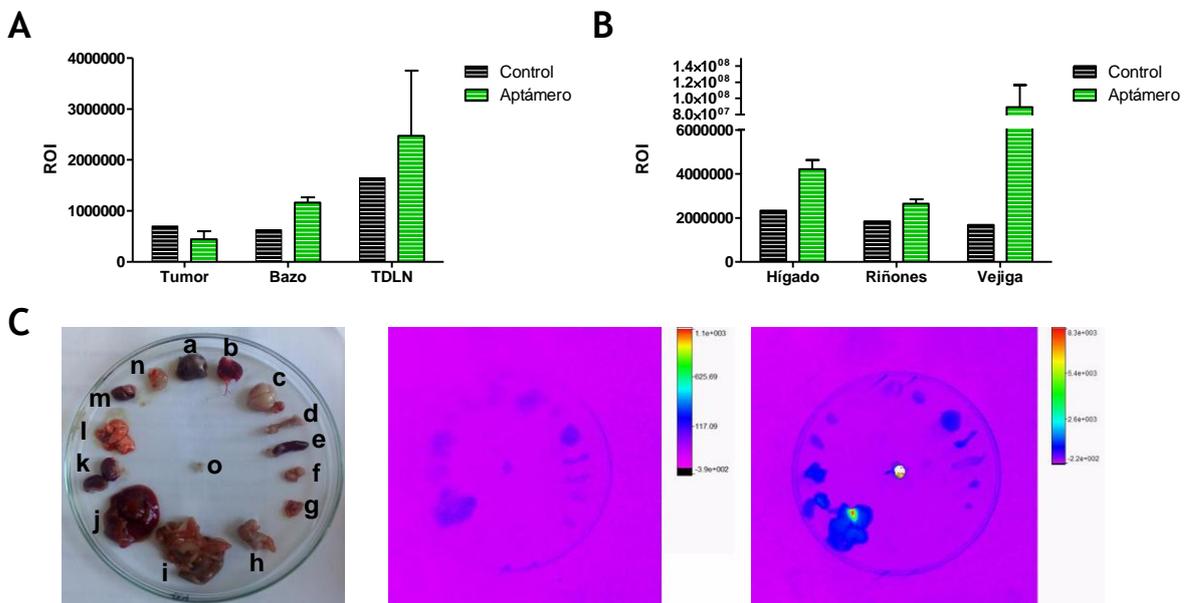
**Figura 3.17** - Comparación de la biodistribución en tumor del aptámero anti-PD1 en el modelo murino de melanoma B16F1 y cáncer de colon CT26 a las 2 horas. Esquema del diseño experimental (A). Intensidad de fluorescencia media de los tumores B16F1 (B). Imagen de fluorescencia de tumores dispuestos en placa de Petri, los círculos negros enmarcan los tumores de los grupos control (línea punteada: B16F1, línea continua: CT26) y los círculos verdes enmarcan los tumores de los grupos que recibieron el aptámero conjugado (línea punteada: B16F1, línea continua: CT26) (C). Intensidad de fluorescencia media de los tumores CT26 (D). Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*  $p < 0,05$ .

De estos resultados podemos interpretar que, si bien hay una mayor retención del aptámero en los órganos blanco, se está llevando a cabo en simultáneo la depuración activa del mismo. Como se mencionó anteriormente sería relevante determinar qué sucede con la biodistribución del aptámero en tiempos más tardíos en este modelo, a las 24 y 48 horas, teniendo en cuenta el diseño del esquema terapéutico planteado en este trabajo. El escenario ideal para este aptámero terapéutico sería que se mantuviera retenido en los órganos blanco por un período de 48 horas, ya que de este modo se podría mantener la molécula en el lugar de acción por un período de al menos 7 días continuos.

En el modelo de melanoma B16F1, a las 2 horas se observó una tendencia a una mayor intensidad de fluorescencia en los órganos encargados de la eliminación, principalmente en la vejiga, mientras que en el resto de los órganos no parecería haber diferencias en cuanto a la biodistribución del aptámero. El bajo n utilizado en este estudio no nos permitió realizar un análisis estadístico (Figura 3.19). Sin embargo, este resultado apoya la hipótesis generada de que quizás en el modelo B16F1 utilizado en este trabajo no hay una gran expresión de PD1 y por esto no observamos una captación del aptámero ni a nivel del tumor ni a nivel de los órganos linfáticos en tiempos tempranos. A diferencia de lo observado a las 24 horas, en este estudio sí podemos ver un aumento a nivel de la vejiga, lo que nos indica que el aptámero está siendo eliminado del organismo del animal.



**Figura 3.18** - Biodistribución del aptámero anti-PD1 en el modelo murino de cáncer de colon CT26 a las 2 horas. Intensidad de fluorescencia neta corregida en órganos linfáticos (A) y órganos encargados de la eliminación (B). Imagen de fluorescencia de los órganos dispuestos en placa de Petri (C), de izquierda a derecha: fotografía representativa de placa con la distribución de los órganos, imagen de fluorescencia de los órganos del grupo control e imagen de fluorescencia de los órganos del grupo que recibió el aptámero anti-PD1-Alexa647. a: tumor, b: sangre, c: cerebro, d: hueso, e: bazo, f: TDLN, g: ganglio linfático opuesto al TDLN (Ganglio II), h: estómago, i: intestino, j: hígado, k: riñones, l: pulmones, m: corazón, n: músculo, o: vejiga. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*  $p < 0,05$ .

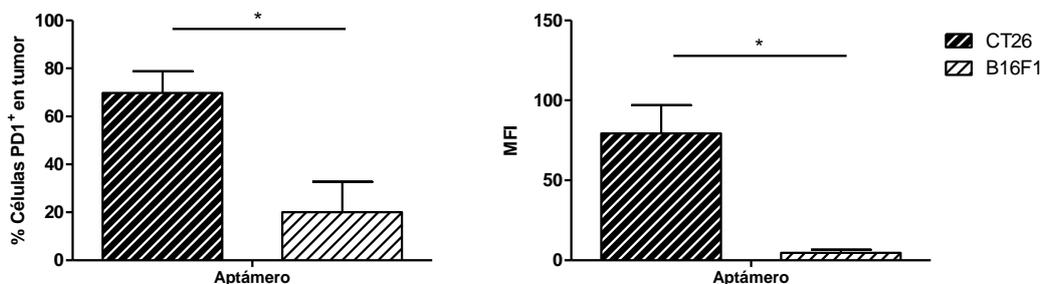


**Figura 3.19** - Biodistribución del aptámero anti-PD1 en el modelo murino de melanoma B16F1 a las 2 horas. Intensidad de fluorescencia neta corregida por peso en órganos linfáticos (A) y órganos encargados de la eliminación (B). Imagen de fluorescencia de los órganos dispuestos en placa de Petri (C), de izquierda a derecha: fotografía de placa con la distribución de los órganos, imagen de fluorescencia de los órganos del grupo control e imagen de fluorescencia de los órganos del grupo que recibió el aptámero anti-PD1-Alexa647. a: tumor, b: sangre, c: cerebro, d: hueso, e: bazo, f: TDLN, g: ganglio linfático opuesto al TDLN, h: estómago, i: intestino, j: hígado, k: riñones, l: pulmones, m: corazón, n: músculo, o: vejiga.

Por tanto, con estos resultados podemos inferir que el mayor potencial terapéutico de la terapia combinada en el modelo murino de cáncer de colon (CT26) podría deberse a una mayor captación del aptámero anti-PD1 en el sitio blanco a tiempos tempranos.

### 3.4. Evaluación de la expresión de PD1 en células provenientes de tumor.

Las diferencias en la captación del aptámero conjugado a nivel de tumor observadas en los ensayos *in vivo* podrían explicarse, al menos en parte, si existiese una expresión diferencial de la molécula blanco, PD1, entre los modelos estudiados. Por esto, nos planteamos estudiar la expresión de PD1 en muestras de tumor provenientes de ambos modelos murinos (B16F1 y CT26) mediante citometría de flujo. Se observó una mayor expresión de PD1, tanto en porcentaje de células que lo expresan como en nivel de expresión, en el microambiente tumoral de CT26 respecto al de B16F1 (CT26 vs B16F1  $p=0,0445$  y  $p=0,0461$ , t test) (Figura 3.20).



**Figura 3.20** - Expresión de PD1 en células provenientes de tumor CT26 y B16F1 analizada por citometría de flujo utilizando aptámeros anti-PD1-Alexa647. MFI: intensidad de fluorescencia media. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*  $p<0,05$ .

La mayor expresión de PD1 en los tumores CT26 pone de manifiesto por qué observamos una mayor captación del aptámero anti-PD1 en los ensayos de biodistribución en este modelo en comparación con el modelo de melanoma. Sumado a ello, en el modelo de cáncer de colon murino la terapia combinada presentó un mayor potencial terapéutico en los ensayos *in vivo*. Por tanto, una mayor expresión de la molécula blanco en el sitio de acción podría explicar las diferencias observadas en las respuestas de ambos modelos tumorales frente a las terapias administradas.

Actualmente, para realizar la estadificación de un tumor se toman en cuenta múltiples parámetros además del tamaño tumoral, entre ellos se encuentra la expresión de puntos de control inhibidores del sistema inmune. Se ha visto que tumores con una alta expresión de estos puntos de control tienden a responder mejor a las inmunoterapias en comparación con aquellos tumores con una baja expresión. Los tumores que responden pobremente a las inmunoterapias también son conocidos como “tumores fríos”, poco inmunogénicos. Existen diversas estrategias terapéuticas que pueden convertir a estos tumores en “tumores calientes”, más inmunogénicos, y luego de esa intervención sí suelen responder bien a las inmunoterapias (Galon and Bruni, 2019). La

administración de *Salmonella* atenuada es un tipo de inmunoterapia que se postula que puede efectuar este *switch* de frío a caliente en el tumor. Sin embargo, consideramos que un motivo por el que en este trabajo no es tan evidente el efecto inmunoterapéutico del anti-PD1 cuando se administra la terapia combinada es porque uno de los mecanismos por los que *Salmonella* ejerce su efecto antitumoral es disminuyendo la expresión de PD-L1 (Chen et al., 2020). Además, en este trabajo se demostró que LVR01 también reduce la expresión de PD1 en linfocitos T citotóxicos a nivel sistémico. Otros investigadores del grupo han reportado que la línea celular B16F1 tiene una mayor expresión de PD-L1 que la línea celular CT26 (Duarte, n.d.). Estos resultados fundamentan (1) por qué la monoterapia con LVR01 funciona en el modelo de melanoma murino, al disminuir la expresión de PD-L1 en las células tumorales, lo que contribuye a la generación de un microambiente tumoral proinflamatorio; (2) por qué no observamos una acción sinérgica con anti-PD1 en melanoma (ambas terapias actúan sobre el mismo eje). Sería interesante analizar la expresión de PD-L1 en células tumorales de animales luego del tratamiento con LVR01 para verificar el mecanismo de acción descrito anteriormente y comprender las diferencias que observamos en las respuestas frente a la terapia en ambos modelos.

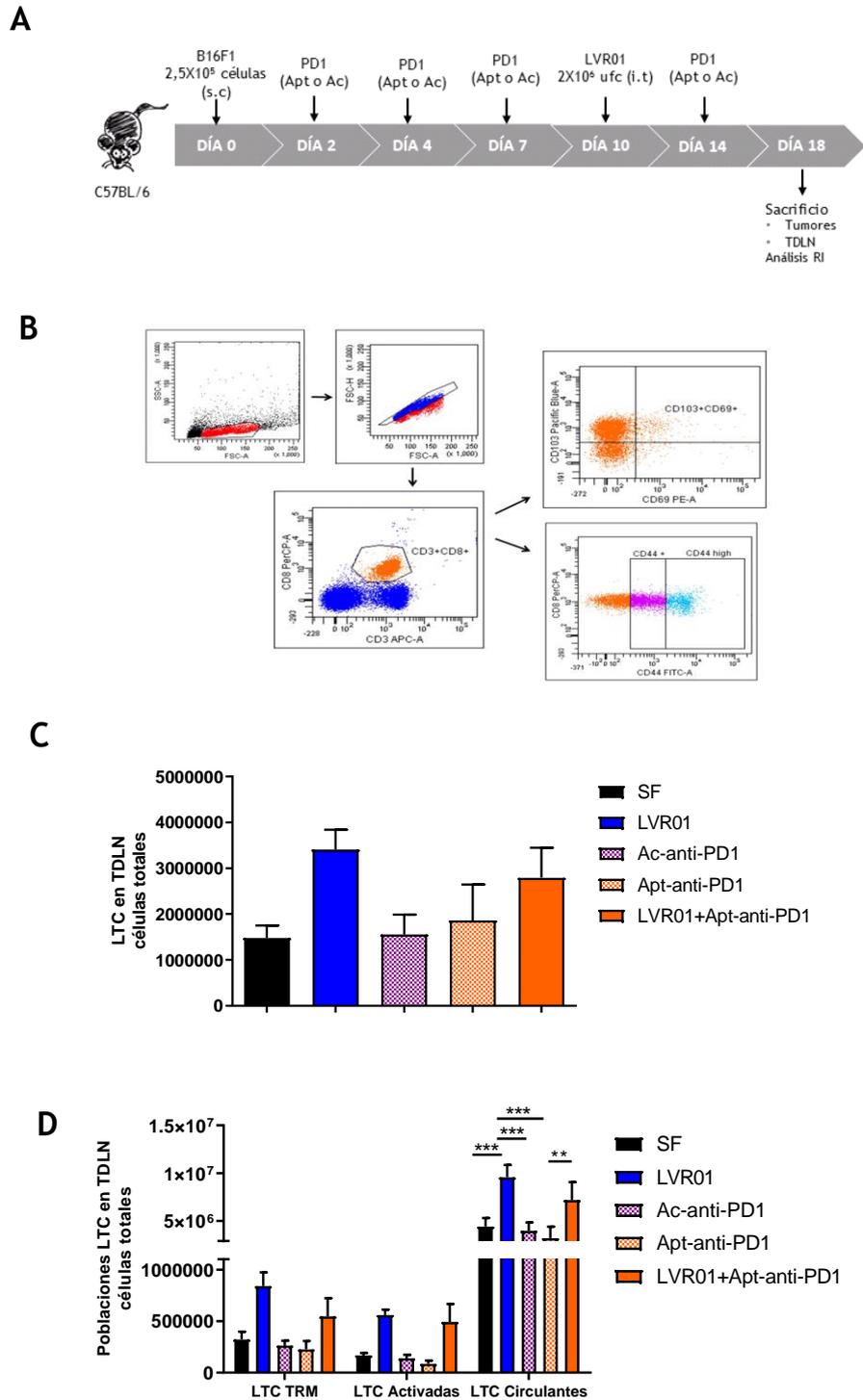
#### **4. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR EJERCIDA POR *SALMONELLA* EN COMBINACIÓN CON MOLÉCULAS QUE BLOQUEAN PD1 EN EL MODELO MURINO DE MELANOMA Y DE CÁNCER DE COLON.**

##### **4.1. Evaluación de los linfocitos T citotóxicos en modelo murino de melanoma B16F1 subcutáneo por citometría de flujo.**

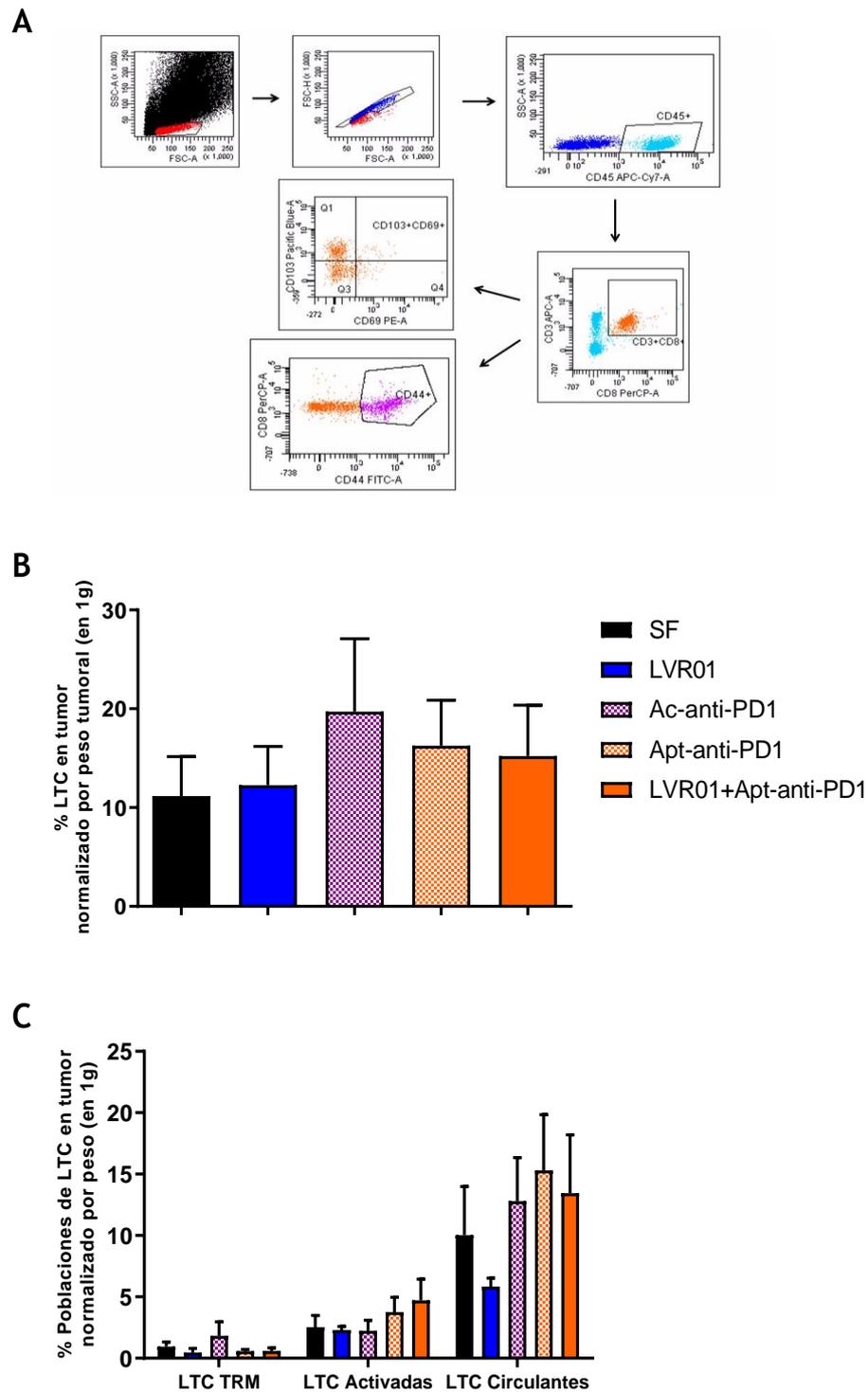
Una óptima inmunoterapia frente al cáncer debería inducir una respuesta inmune efectiva y de memoria frente al tumor primario, de modo que pueda evitar recurrencias y la generación de procesos metastásicos. Se han descrito células de memoria circulantes, dentro de ellas encontramos a los linfocitos T de memoria centrales (Tcm), y células de memoria residentes, como los linfocitos T de memoria residentes (Trm). Estudios en pacientes con cáncer de pulmón y ovario han correlacionado la infiltración de tumores por linfocitos T citotóxicos con un fenotipo Trm con mejoras en la supervivencia, de hecho, se postula como un biomarcador para pronosticar la respuesta a las inmunoterapias (Enamorado et al., 2017). Además, se ha demostrado la plasticidad de los linfocitos Tcm que pueden pasar a un fenotipo del tipo Trm. Estudios en modelo murino de melanoma han probado que la transferencia adoptiva de linfocitos Tcm en conjunto con un tratamiento anti-PD1 aumentan significativamente la población de linfocitos infiltrantes de tumor tipo Trm (*Trm-like*) y tienen un efecto sinérgico en la respuesta anti-tumoral (Enamorado et al., 2017). Resultados previos obtenidos en el marco de mi pasantía de final de carrera demostraron que animales con melanoma tratados con *Salmonella* exhiben menor cantidad de Tcm, sugiriendo la generación de Trm con efecto anti-tumoral (Chilibroste, 2018). Nos resultó entonces interesante investigar qué sucedía con la población celular Trm en el modelo murino de melanoma B16F1 subcutáneo luego de administrar la terapia combinada (Figura 3.21 A). Al día 18 p.i.t. se realizó el sacrificio de los animales, se obtuvieron muestras de tumores y TDLNs. Mediante citometría de

flujo se analizó la presencia de linfocitos T citotóxicos activados ( $CD3^+CD8^+CD69^+$ ), circulantes ( $CD3^+CD8^+CD44^{high}$ ) y residentes de memoria ( $CD3^+CD8^+CD69^+CD103^+$ ) en TDLN (Figura 3.21). Cabe mencionar que no se observaron variaciones en los porcentajes de estas poblaciones para los distintos grupos de animales (resultados no mostrados). Cuando el análisis se realizó en base a número absolutos de células en TDLN, si bien no se observó un número significativamente mayor de linfocitos T citotóxicos en los ganglios de los animales que recibieron LVR01, se observa una tendencia a un aumento de esta población respecto a los demás grupos (Figura 3.21 C). Al analizar los diferentes fenotipos de la población de LTC, observamos que el grupo LVR01 presenta un aumento significativo de los LTC circulantes respecto a los grupos SF, Ac-anti-PD1, Apt-anti-PD1 ( $p=0,0001$ ,  $p=0,0003$ ,  $p<0,0001$  respectivamente, ANOVA). Además, hay un aumento en la población de LTC circulantes en el grupo LVR01+Apt-anti-PD1 respecto al grupo Apt-anti-PD1 ( $p=0,0044$ , ANOVA) (Figura 3.21 D). El grupo que recibió LVR01 como monoterapia tiene un número absoluto de células a nivel del TDLN mayor que el resto de los grupos. El aumento de celularidad en los órganos linfáticos es un efecto previamente reportado en respuesta a la terapia con LVR01 (Chilibroste et al., 2021).

Se realizó el mismo estudio mencionado anteriormente en las muestras de tumor (Figura 3.22). A nivel del tumor no se observan diferencias en los porcentajes de la población de linfocitos T citotóxicos infiltrantes (normalizado por peso) entre los ratones del grupo control y aquellos que recibieron las diversas terapias al día 18 p.i.t. (Figura 3.22 B). En el caso del tumor no se realizó el análisis sobre el número absoluto de células tumorales porque la presencia de debris y células muertas dificulta el recuento. El resultado obtenido es coherente con lo observado en los ensayos *in vivo*, donde no se observa un mayor potencial terapéutico en el modelo murino de melanoma luego de la administración de las terapias combinadas. En el grupo que recibió la monoterapia con LVR01, donde sí observamos un efecto antitumoral *in vivo*, continúa siendo coherente este resultado ya que hay trabajos previos de nuestro grupo de investigación que describen que las células inmunes infiltrantes tumor, luego de la administración de *Salmonella* en tiempos tempranos, son neutrófilos, macrófagos, células NK y células dendríticas (Mónaco, 2021). Ensayos de depleción de poblaciones celulares demostraron que el efecto antitumoral de *Salmonella* depende de la presencia de células NK y macrófagos, y no es dependiente de la presencia de linfocitos TCD8 (Mónaco, 2021; Plata, 2021). Además, se evaluó el efecto terapéutico de *Salmonella* en ratones IL-17 KO y no se observó un cambio en la respuesta respecto a los ratones WT, por lo que de manera indirecta nos habla de que no existe dependencia con la población de neutrófilos (Chilibroste et al., 2021). Nuevamente nos enfrentamos a la limitante de que se trata de un modelo tumoral de evolución rápida, por lo que resulta muy difícil realizar un análisis de las poblaciones celulares infiltrantes de tumor en tiempos más tardíos luego de la administración de *Salmonella*.



**Figura 3.21** - Evaluación de los linfocitos T citotóxicos en ganglio drenante de tumor (TDLN) de ratones portadores de melanoma B16F1 subcutáneo, luego del tratamiento con LVR01 en conjunto con moléculas que bloquean a anti-PD1. Esquema del diseño experimental (A). Estrategia de gating para el análisis de las distintas poblaciones (B). Número absoluto de LTC (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) en TDLN (C). Número absoluto de subpoblaciones de LTC en TDLN: LTC Trm (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>), LTC activadas (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>), LTC circulantes (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD44<sup>high</sup>) (D). Resultado representativo de 1 experimento. N=5 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, Ac-anti-PD1: anticuerpo anti-PD1, Apt-anti-PD1: aptámero anti-PD1, LVR01+Apt-anti-PD1: *Salmonella* con aptámero anti-PD1. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*\* p<0,01, \*\*\*p<0,001.



**Figura 3.22** - Evaluación de los linfocitos T citotóxicos en células tumorales de ratones portadores de melanoma B16F1 subcutáneo, luego del tratamiento con LVR01 en conjunto con moléculas que bloquean a anti-PD1. Estrategia de gating para el análisis de las distintas poblaciones (A). Porcentajes de LTC (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) en tumor, normalizado por peso (B). Porcentajes de subpoblaciones de LTC en tumor, normalizado por peso: LTC Trm (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>), LTC activadas (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>), LTC circulantes (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) (C). Resultado representativo de 1 experimento. N=5 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, Ac-anti-PD1: anticuerpo anti-PD1, Apt-anti-PD1: aptámero anti-PD1, LVR01+Apt-anti-PD1: *Salmonella* con aptámero anti-PD1.

Debido a que el efecto de la terapia combinada en el modelo murino de melanoma no fue de gran potencial terapéutico, este fue el único análisis que se realizó de la respuesta inmune en B16F1 en el contexto de esta tesis. Consideramos importante y un aporte novedoso evaluar el comportamiento de las poblaciones de linfocitos T citotóxicos residentes en este modelo tumoral. Además, como mencionábamos anteriormente, se ha descrito que el infiltrado tumoral por linfocitos Trm o Trm-like tiene un valor pronóstico importante frente a la respuesta a las inmunoterapias, por lo que los resultados obtenidos son congruentes con la ausencia de respuesta terapéutica.

Sumado a las limitantes mencionadas anteriormente, el análisis de poblaciones linfocitarias en muestras tumorales conlleva una mayor dificultad, ya que se trata de muestras biológicas que se componen por poblaciones celulares muy heterogéneas, su estructura anatómica es compleja y esto se puede observar en la calidad de los resultados obtenidos. Si comparamos los análisis de las mismas poblaciones en ganglio, podemos ver que cuando se analizan estructuras menos complejas y con menor heterogeneidad en las poblaciones, las poblaciones son fácilmente detectables. Ya que el análisis de las poblaciones celulares en el tumor resulta más difícil pensamos que nuestro estudio podría ser complementado con un análisis histológico del tumor, para identificar la distribución de estas poblaciones en relación con las zonas necróticas del tumor. Este análisis no fue realizado en el contexto de este trabajo, pero lo planteamos como una perspectiva.

En lo que resta de este trabajo se decidió concentrar los estudios de análisis de la respuesta inmune en el modelo de cáncer de colon, ya que allí es donde se obtuvieron mejores resultados terapéuticos y la información que obtengamos nos puede brindar herramientas para comprender los procesos inmunológicos que subyacen a las respuestas observadas.

#### **4.2. Evaluación de la respuesta inmune linfocitaria en modelo de cáncer de colon CT26 subcutáneo por citometría de flujo.**

El análisis de la respuesta inmune realizado en este trabajo se centró principalmente en evaluar las poblaciones de linfocitos involucradas en la respuesta antitumoral. Se priorizó el análisis de las poblaciones linfocitarias ya que es en estas donde las moléculas inhibitoras de puntos de control del sistema inmune ejercen principalmente su función potenciando su acción efectora, y además es una población con un rol fundamental en la eliminación de células tumorales. Debido a limitantes en el tiempo de desarrollo de este trabajo, no se realizó un análisis de otras poblaciones celulares inmunes involucradas en la respuesta antitumoral. Si bien la respuesta inmune luego de la administración de LVR01 se encuentra bien caracterizada para el modelo de melanoma murino, este no es el caso para el modelo de cáncer de colon y es, por ende, una de las perspectivas que se desprenden de este trabajo.

Como se muestra en el esquema de la Figura 3.23 se administró el régimen terapéutico que demostró tener mayor potencial en los ensayos *in vivo*. Al día 14 p.i.t. se realizó el sacrificio de los animales, se obtuvieron muestras de

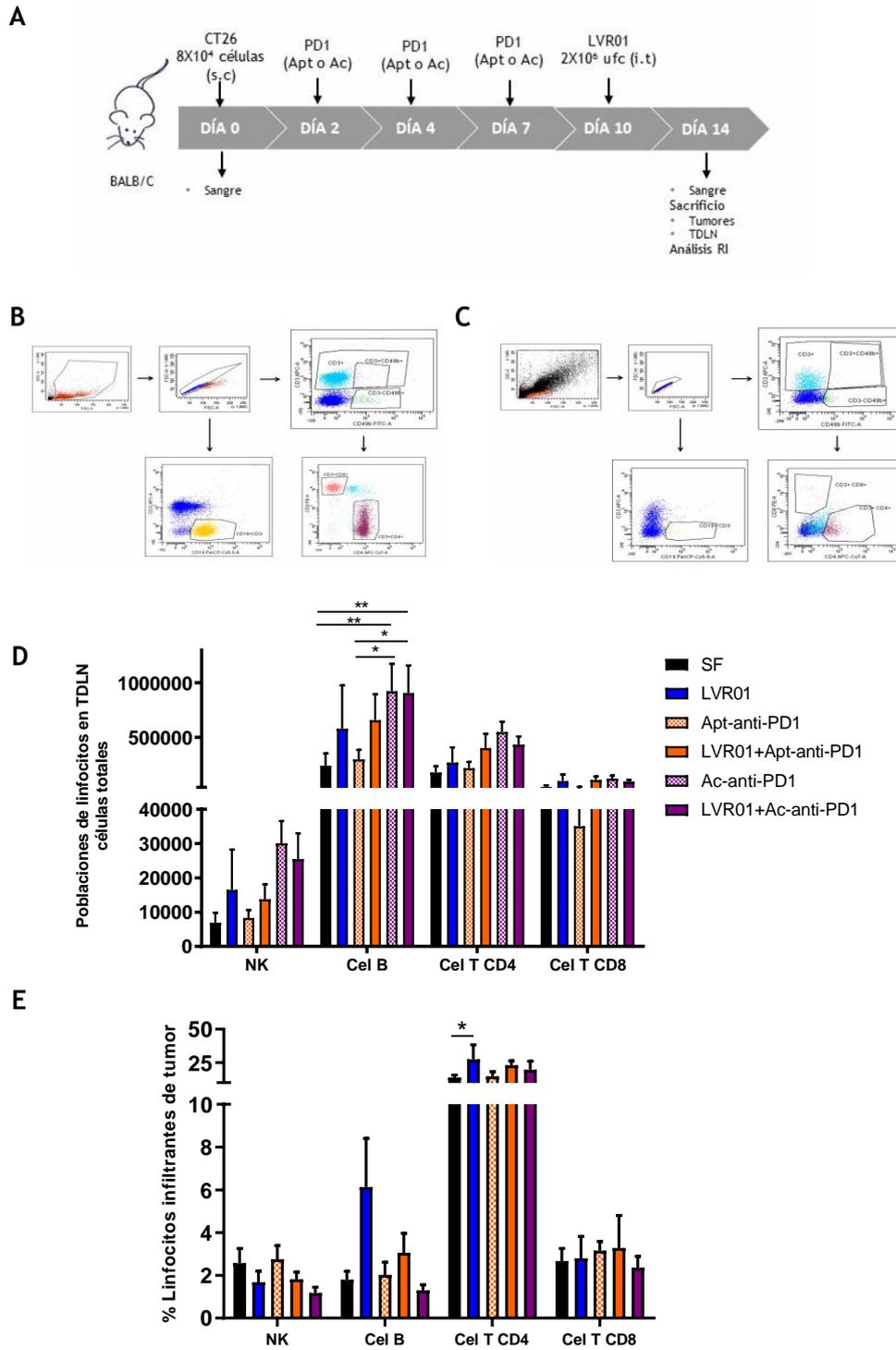
tumor y TDLNs. Se analizó la presencia de células NK ( $CD3^+CD49b^+$ ), NKT ( $CD3^+CD49b^+$ ), linfocitos B ( $CD3^+CD19^+$ ), linfocitos T colaboradores ( $CD3^+CD4^+CD8^-$ ) y linfocitos T citotóxicos ( $CD3^+CD4^+CD8^+$ ) en células totales de TDLNs mediante citometría de flujo (Figura 3.23 D). Se observó un aumento significativo en la población linfocitos B en los animales que recibieron la monoterapia con Ac-anti-PD1 respecto a los grupos Apt-anti-PD1 ( $p=0,0152$ , ANOVA) y control ( $p=0,0056$ , ANOVA); también se observó un aumento de esta población en los animales que recibieron la terapia combinada LVR01+Ac-anti-PD1 respecto a los grupos Apt-anti-PD1 ( $p=0,0200$ , ANOVA) y control ( $p=0,0076$ , ANOVA). No se observaron diferencias significativas en el resto de las poblaciones linfocitarias estudiadas. Estos resultados infieren que la respuesta inmune generada frente a la administración del anticuerpo es superior a la respuesta producida por el aptámero. También se realizó un análisis de las poblaciones mencionadas en muestras de tumor, y se observó un aumento significativo de los linfocitos T colaboradores en el grupo que recibió la monoterapia con LVR01 respecto al grupo control ( $p=0,0453$ , ANOVA) (Figura 3.23 E).

No contamos con antecedentes que caractericen la respuesta inmune de LVR01 en este modelo tumoral, por lo que no existen resultados previos para comparar si éste es el comportamiento esperado frente a la terapia. Si pensamos en la puesta a punto que se realizó para este modelo terapéutico, observamos que al administrar una dosis de LVR01 al día 10 p.i.t. no observábamos diferencias en las curvas de crecimiento tumoral ni en las curvas de supervivencia global. Sin embargo, al administrar múltiples dosis semanales el efecto de la terapia se hace más evidente (enlentecimiento del crecimiento tumoral y aumento significativo de la supervivencia global). Por esto nos planteamos que sería útil realizar un análisis de todas las poblaciones linfocitarias infiltrantes de tumor luego de recibir al menos 3 dosis de LVR01. Esta caracterización no se realizó en este trabajo, pero consideramos que es una de las perspectivas importantes que se desprenden del mismo.

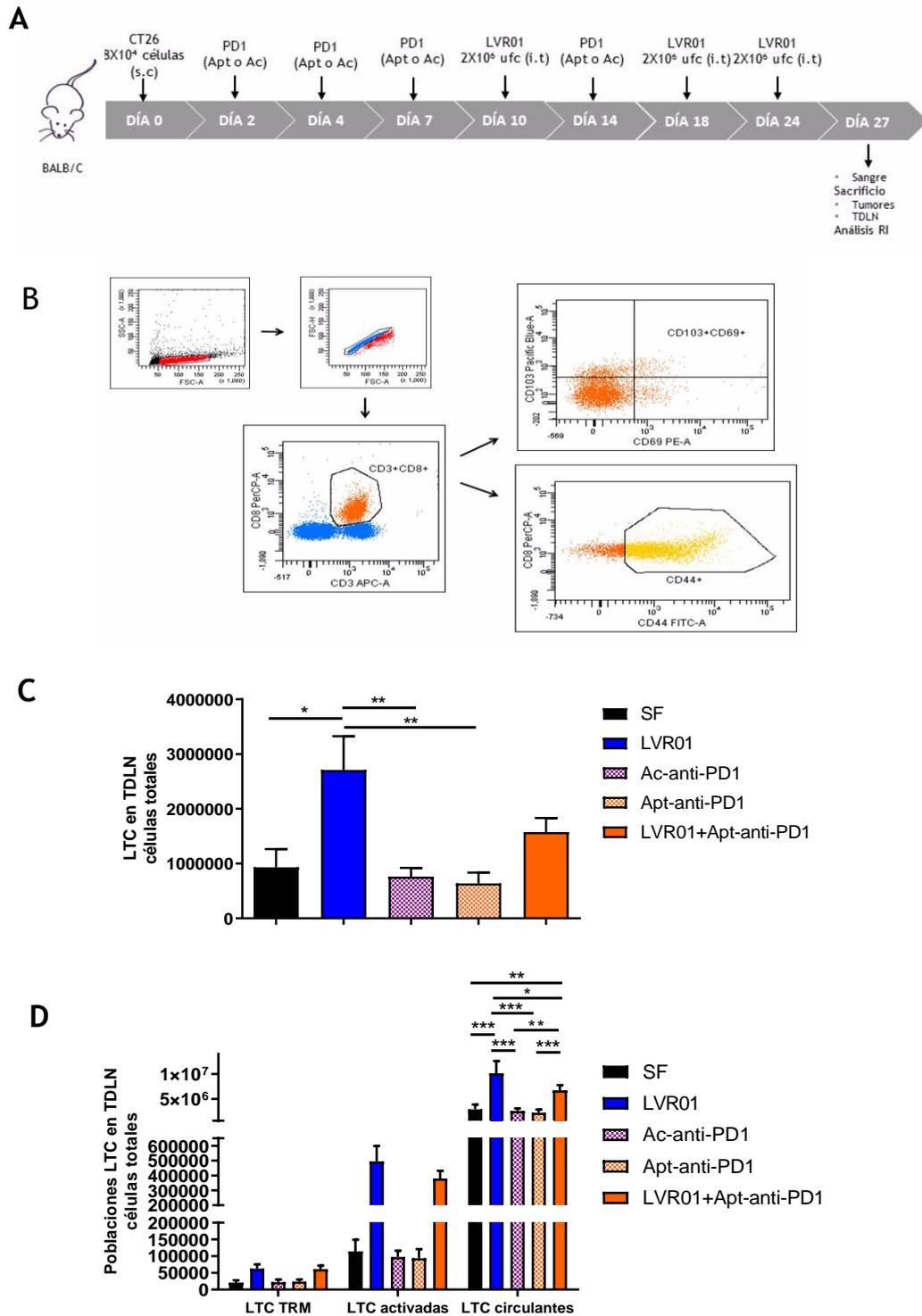
Al igual que en el modelo de melanoma, se analizó qué sucedía con las poblaciones de linfocitos T citotóxicos residentes de memoria, activados y circulantes en el modelo murino de cáncer de colon CT26 subcutáneo luego de administrar la terapia combinada LVR01+Apt-anti-PD1 (Figura 3.24 y 3.25). Al día 27 p.i.t. se realizó el sacrificio de los animales, y se obtuvieron muestras de tumores y TDLNs. Se analizó la presencia de linfocitos T citotóxicos activados ( $CD3^+CD8^+CD69^+$ ), circulantes ( $CD3^+CD8^+CD44^+$ ) y residentes de memoria ( $CD3^+CD8^+CD69^+CD103^+$ ) en TDLN (Figura 3.24). Se observó un aumento significativo de la población de linfocitos T citotóxicos en el grupo LVR01 respecto a los grupos control ( $p=0,0151$ , ANOVA), Ac-anti-PD1 ( $p=0,0070$ , ANOVA) y Apt-anti-PD1 ( $p=0,0041$ , ANOVA) (Figura 3.24 C). Al analizar las subpoblaciones de LTC, Figura 3.24 D, observamos que hay un aumento significativo de los LTC circulantes en los grupos que recibieron LVR01, ya sea como monoterapia o combinada con aptámero, respecto a los demás grupos (LVR01 vs SF,  $p<0,0001$ ; LVR01 vs Ac-anti-PD1,  $p<0,0001$ ; LVR01 vs Apt-anti-PD1,  $p<0,0001$ ; LVR01+Apt-anti-PD1 vs SF,  $p=0,0066$ ; LVR01+Apt-anti-PD1 vs Ac-anti-PD1,  $p=0,0025$ ; LVR01+Apt-anti-PD1 vs Apt-anti-PD1,  $p=0,0009$ ; ANOVA). Además, se observó un aumento en la población de LTC circulantes en el grupo

LVR01 respecto al grupo LVR01+Apt-anti-PD1 ( $p=0,0199$ , ANOVA). Aquí el estudio estuvo restringido a un tipo de población linfocitaria, a un tiempo determinado. Es necesario hacer una caracterización de la respuesta inmune más exhaustiva, a diferentes tiempos, que nos pueda aportar información relevante que fundamente el efecto anti-tumoral observado a lo largo del tiempo.

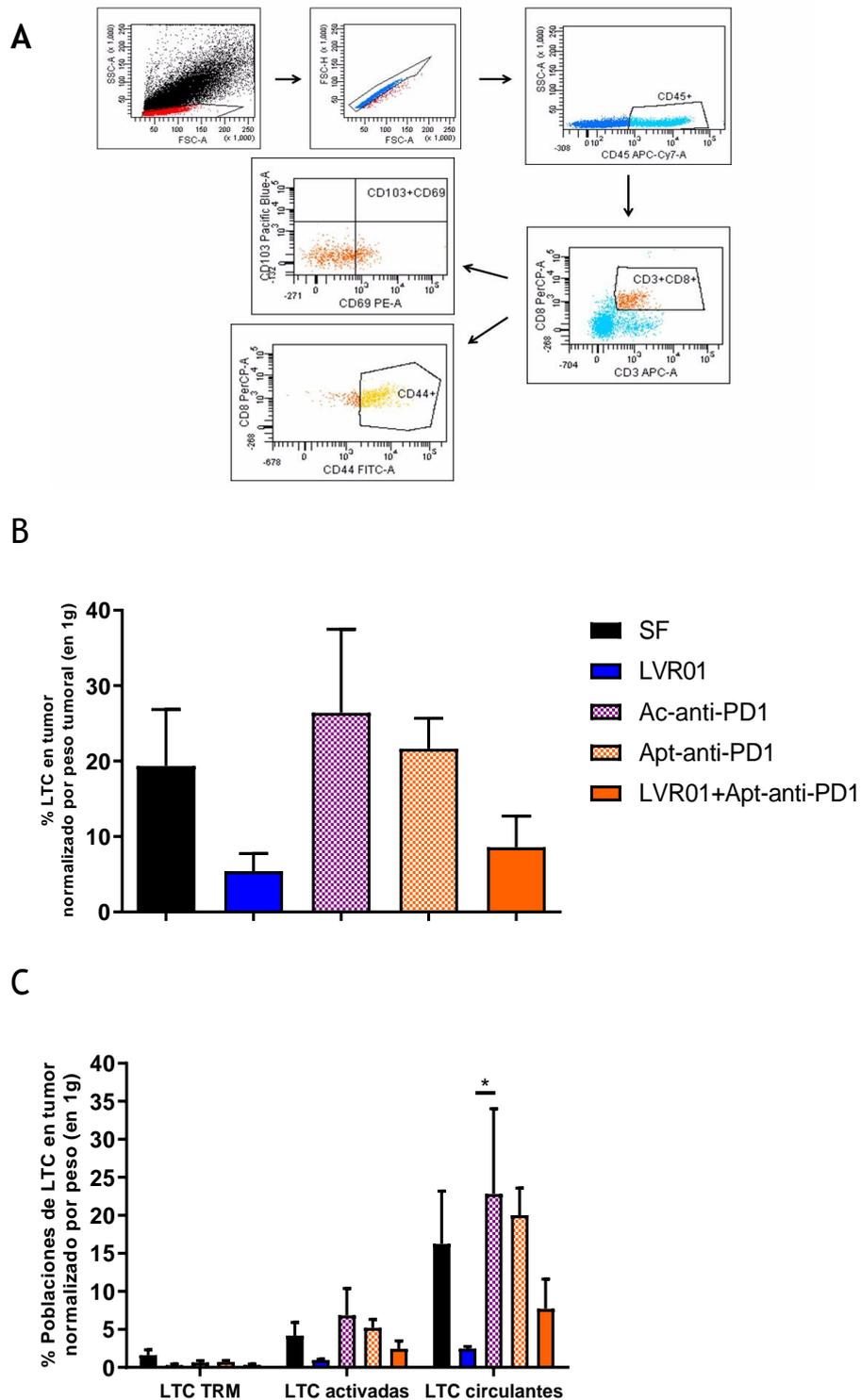
Se realizó el mismo análisis en las muestras tumorales (Figura 3.25). No se observaron diferencias significativas en las poblaciones de linfocitos T citotóxicos entre los grupos estudiados. Existe una tendencia en el grupo LVR01 de una disminución de LTC respecto a los demás grupos. Al estudiar las subpoblaciones de LTC encontramos diferencia significativa entre los grupos LVR01 vs Ac-anti-PD1 ( $p=0,0296$ , ANOVA). Estos resultados llamaron nuestra atención ya que se contraponen a lo que esperábamos encontrar. En este experimento la extracción de los tumores resultó desafiante en algunos animales, ya que encontramos casos donde había infiltraciones y otros donde, debido a las características morfológicas del tumor, resultó más complejo separar completamente el TDLN. Estas observaciones que notamos durante la extracción luego se vieron reflejadas en algunos de los resultados de la citometría donde encontramos que algunas poblaciones tumorales analizadas presentaban características de muestra de ganglio. Por tanto, si bien no se realizó en este trabajo debido a limitaciones de tiempo y reactivos, es evidente la necesidad de repetir el ensayo en lo posible con un número más grande de ratones. Debido a la falta de antecedentes en este modelo sería valioso estudiar la respuesta inmune citotóxica en otros tiempos luego de administrar la terapia para tener información más robusta y determinar una cinética en la respuesta, tal como se menciona anteriormente.



**Figura 3.23** - Evaluación de poblaciones linfocitarias en muestras de ganglio drenante de tumor (TDLN) y de tumor de ratones portadores de cáncer de colon CT26 subcutáneo, luego del tratamiento con LVR01 en conjunto con moléculas que bloquean a anti-PD1. Esquema del diseño experimental (A). Estrategias de gating para el análisis de las distintas poblaciones en TDLN y tumor (B y C). Números absolutos de linfocitos en TDLN (D). Porcentaje de poblaciones linfocitarias infiltrantes de tumor (E). Poblaciones linfocitarias: NK (CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>), Cel B (CD3<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>), Cel T CD4 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) y Cel T CD8 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). Resultados de 1 experimento. N=6 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, Ac-anti-PD1: anticuerpo anti-PD1, Apt-anti-PD1: aptámero anti-PD1, LVR01+Apt-anti-PD1: *Salmonella* con aptámero anti-PD1. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*p<0,05, \*\* p<0,01.



**Figura 3.24** - Evaluación de los linfocitos T citotóxicos en ganglio drenante de tumor (TDLN) de ratones portadores de cáncer de colon CT26 subcutáneo, luego del tratamiento con LVR01 en conjunto con moléculas que bloquean a anti-PD1. Esquema del diseño experimental (A). Estrategia de gating para el análisis de las distintas poblaciones (B). Número absoluto de LTC (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) en TDLN (C). Número absoluto de subpoblaciones de LTC en TDLN: LTC Trm (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>), LTC activadas (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>), LTC circulantes (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) (D). Resultado de 1 experimento. N=5 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, Ac-anti-PD1: anticuerpo anti-PD1, Apt-anti-PD1: aptámero anti-PD1, LVR01+Apt-anti-PD1: *Salmonella* con aptámero anti-PD1. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

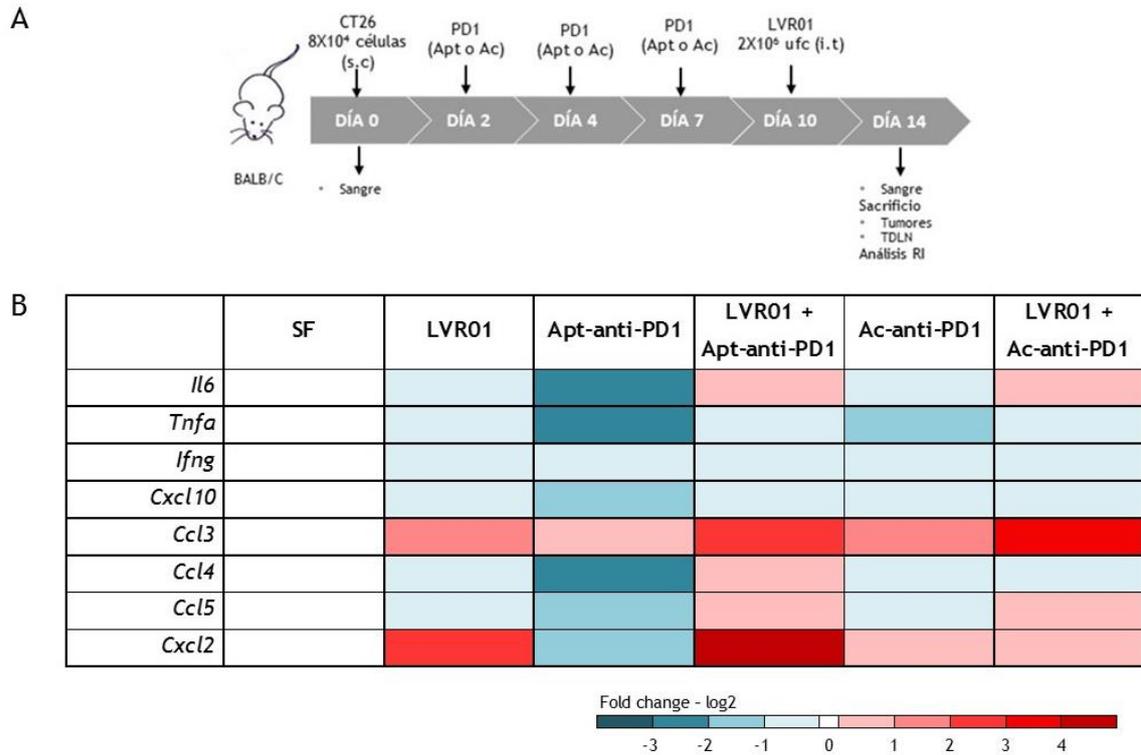


**Figura 3.25** - Evaluación de los linfocitos T citotóxicos en células tumorales de ratones portadores de cáncer de colon CT26 subcutáneo, luego del tratamiento con LVR01 en conjunto con moléculas que bloquean a anti-PD1. Estrategia de gating para el análisis de las poblaciones estudiadas (A). Porcentaje de LTC (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) en tumor, normalizado por peso (B). Porcentaje de subpoblaciones de LTC en tumor, normalizado por peso: LTC Trm (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>), LTC activadas (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>), LTC circulantes (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) (C). Resultado de 1 experimento. N=5 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, Ac-anti-PD1: anticuerpo anti-PD1, Apt-anti-PD1: aptámero anti-PD1, LVR01+Apt-anti-PD1: *Salmonella* con aptámero anti-PD1. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*p<0,05.

#### 4.3. Evaluación de la expresión diferencial de genes en muestras de tumor CT26 por RT-qPCR.

Mediante PCR cuantitativa en Tiempo Real se evaluó la expresión diferencial de genes en muestras tumorales obtenidas al día 14 p.i.t., con el objetivo de identificar perfiles de citoquinas y quimioquinas inducidos por las diversas inmunoterapias en tiempos tempranos en el modelo murino de cáncer de colon CT26 (Figura 3.26). Si bien no se observaron diferencias significativas en la expresión de genes en los animales tratados respecto al grupo control, se puede inferir que en los animales que recibieron las terapias combinadas (LVR01+Apt-anti-PD1 y LVR01+Ac-anti-PD1) hay una tendencia a generar un microambiente tumoral con un perfil más proinflamatorio. Se observó una tendencia en el aumento de la expresión de IL-6, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL12, principalmente en las terapias combinadas. La IL-6 es una citoquina proinflamatoria, promueve la inflamación, el reclutamiento de efectores de la inmunidad innata en el sitio de inflamación y la producción de proteínas de fase aguda. El rol de la IL-6 en la patología oncológica es dual, ya que se ha descrito que por un lado puede contribuir a generar una respuesta inmune antitumoral efectiva y también se ha descrito que puede contribuir a una progresión tumoral. Su rol en la respuesta inmune dependerá en gran medida del microambiente tumoral, ya que según qué otras moléculas se estén expresando polarizarán a un perfil de respuesta más regulador o del tipo citotóxico (Martin et al., 2012; Toyoshima et al., 2019). Las quimioquinas que presentaron una mayor expresión (CCL3, CCL4, CCL5, CXCL2) participan en el reclutamiento de leucocitos PMN al microambiente tumoral, principalmente neutrófilos. Además, CCL4 es un quimioatrayente de monocitos y células NK; CCL5 también recluta al sitio de inflamación linfocitos T y es capaz de inducir la proliferación y activación de ciertas poblaciones de células NK (CHAK, *CC-Chemokine-activated killer cells*) (Bule et al., 2021; Hembruff and Cheng, 2009).

Como ya se discutió en resultados anteriores el hecho de que la respuesta con LVR01 no se encuentre caracterizada en este modelo tumoral no nos permite realizar un análisis más profundo sobre lo que esperábamos encontrar. Si se encuentra caracterizado el perfil de expresión de genes de citoquinas y quimioquinas en melanoma, y allí a los 3 días post inoculación de LVR01 se observa un marcado perfil proinflamatorio con aumento significativo de *Ifng*, *Tnfa*, *Cxcl10*, *Ccl3*, *Ccl5* y *Cxcl2*, entre otros genes (Mónaco, 2021). En este modelo al observar el efecto *in vivo* luego de administrar múltiples dosis, sería relevante determinar la expresión de citoquinas y quimioquinas en diferentes tiempos.



**Figura 3.26** - Análisis de expresión diferencial de genes de citoquinas y quimioquinas en muestras de tumor CT26 por PCR en Tiempo Real. Esquema del diseño experimental (A). Heat map representando cambios relativos en los niveles de ARNm de los grupos tratados respecto al control, valores representados como el logaritmo en base 2 (B). Resultado de 1 experimento. N=6 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, Ac-anti-PD1: anticuerpo anti-PD1, Apt-anti-PD1: aptámero anti-PD1, LVR01+Apt-anti-PD1: *Salmonella* con aptámero anti-PD1, LVR01+Ac-anti-PD1: *Salmonella* con anticuerpo anti-PD1.

## 5. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL EJERCIDA POR *SALMONELLA* EN COMBINACIÓN CON MOLÉCULAS QUE BLOQUEAN PD1 EN EL MODELO MURINO DE CÁNCER DE COLON.

Las respuestas inmunes antitumorales se caracterizan por tener un componente celular y otro humoral, ambos tienen un rol clave para llevar a cabo una respuesta inmune efectiva frente al cáncer. Nos propusimos evaluar en el modelo murino de cáncer de colon la presencia de anticuerpos específicos contra CT26 en el suero de los animales involucrados en el ensayo a diferentes tiempos, de modo de poder establecer una cinética de la respuesta. Es así que se extrajo suero de los animales a los días 0, 14 y 40 p.i.t. y mediante la técnica de ELISA se evaluó la presencia de anticuerpos IgG totales anti-CT26 (Figura 3.27).

Se observó un aumento en el título de anticuerpos en los animales que fueron tratados con anticuerpos anti-PD1, ya sea como monoterapia o como terapia combinada, a tiempos tempranos. En el resto de los animales que recibieron tratamiento se observa un aumento en el título de anticuerpos más tardío. Al día 40 p.i.t. los grupos tratados presentan niveles similares de título de anticuerpos y en el grupo control decae el título. Los resultados obtenidos al día 40 p.i.t. en parte se encuentran sesgados, porque el análisis se realizó en aquellos animales que lograron sobrevivir hasta este día. De hecho, se podían identificar dentro de cada grupo dos subgrupos: aquellos animales que habían desarrollado tumor y aquellos animales que no desarrollaron tumor, ya sea porque el crecimiento tumoral fue controlado por una respuesta inmune efectiva o porque el tumor no se implantó correctamente. Al tener los animales individualizados y contar con el seguimiento de los mismos, pudimos realizar otros análisis complementarios.

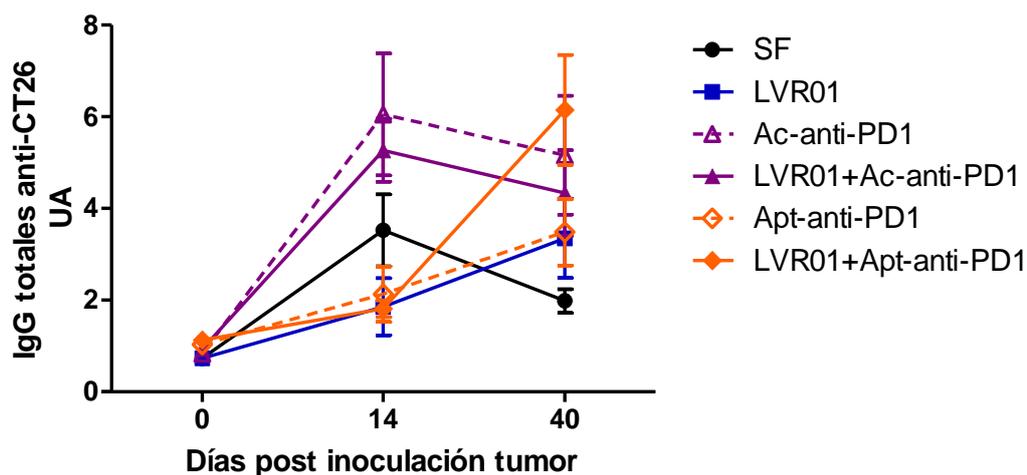


Figura 3.27 - Evaluación de la respuesta inmune humoral en el modelo murino de cáncer de colon CT26 subcutáneo luego del tratamiento con LVR01 en conjunto con moléculas que bloquean a anti-PD1. Título de IgG totales anti-CT26 a los días 0, 14 y 40 p.i.t. Resultado de 1 experimento. N=6 por grupo. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, Ac-anti-PD1: anticuerpo anti-PD1, Apt-anti-PD1: aptámero anti-PD1, LVR01+Apt-anti-PD1: *Salmonella* con aptámero anti-PD1, LVR01+Ac-anti-PD1: *Salmonella* con anticuerpo anti-PD1.

Nos pareció interesante comparar el título de anticuerpos de los sueros de aquellos ratones que desarrollaron tumor versus los que no tenían tumor palpable y ver si podíamos identificar diferencias en las respuestas (Figura 3.28). Observamos que en los animales del grupo control, que no recibieron ningún tipo de tratamiento, el nivel de anticuerpos era similar independientemente de si los animales tenían tumor o no. Sin embargo, cuando comparamos los animales que sí recibieron tratamiento vemos que hay un aumento significativo del título de anticuerpos en aquellos que no tienen tumor respecto a los que desarrollaron el tumor. Este resultado nos permite sugerir que en los animales sin tumor que fueron sometidos a una terapia se desarrolló una respuesta inmune frente al tumor y que probablemente gracias a la esta respuesta se controló el crecimiento tumoral en estos animales. Y podemos inferir que en los animales del grupo control en los que no se palpa un tumor, seguramente la explicación a esto sea que no se hayan implantado correctamente los tumores. Los resultados obtenidos no son suficientes como para afirmar estas inferencias, pero nos permiten hipotetizar sobre lo que podría estar sucediendo.

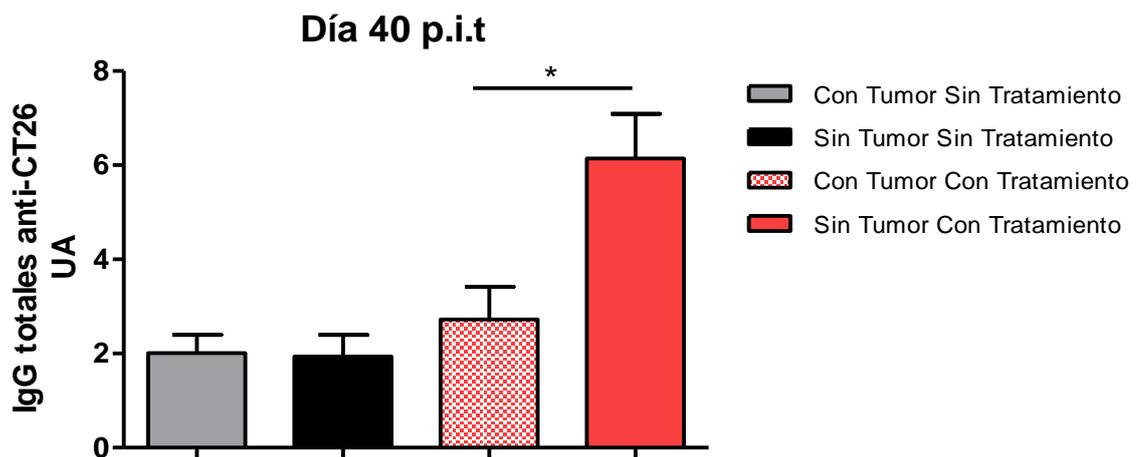


Figura 3.28 - Comparación del título de anticuerpos IgG totales anti-CT26 al día 40 p.i.t. entre animales con tumor y sin tumor, que recibieron tratamiento o no. Resultado de 1 experimento. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*p<0,05.

## 6. VALORACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ANTI-TUMORAL DE MEMORIA INDUCIDA POR *SALMONELLA* EN COMBINACIÓN CON MOLÉCULAS QUE BLOQUEAN PD1 EN MODELO DE CÁNCER DE COLON SUBCUTÁNEO.

### 6.1. Evaluación mediante desafío con un segundo tumor.

Una estrategia eficiente para la evaluación de la respuesta inmune de memoria es desafiar a los animales con antígenos a los que fueron expuestos previamente y ver si son capaces de montar una respuesta inmune efectiva. Esta aproximación se puede utilizar con múltiples antígenos y dependiendo del objetivo del estudio será la respuesta que esperamos en los animales. En este trabajo al utilizar modelos tumorales los resultados que esperamos ver luego del desafío son que aquellos animales que desarrollaron una respuesta inmune antitumoral sean capaces de controlar el crecimiento tumoral, o directamente que impidan la implantación de éste, eliminando las células tumorales rápidamente, y que este efecto se vea reflejado también en la supervivencia global de estos animales. Como se muestra en el esquema de la figura 3.29, los animales que no desarrollaron el tumor primario luego de 62 días p.i.t. fueron desafiados mediante la implantación de un segundo tumor en el flanco opuesto al que se inoculó el tumor primario. En ninguno de los animales desafiados se observó un crecimiento tumoral y esta respuesta se refleja en la supervivencia de los mismos (Figura 3.29 B). Esto puede deberse a la acción de algún mecanismo intrínseco, por el cual tampoco desarrollaron el tumor primario, o porque anteriormente desarrollaron una respuesta inmune de memoria frente al tumor. Para intentar responder esta pregunta se realizó el ensayo de Winn, que permite evaluar la funcionalidad de los linfocitos de ratones portadores de tumor que fueron tratados y respondieron bien a la terapia.

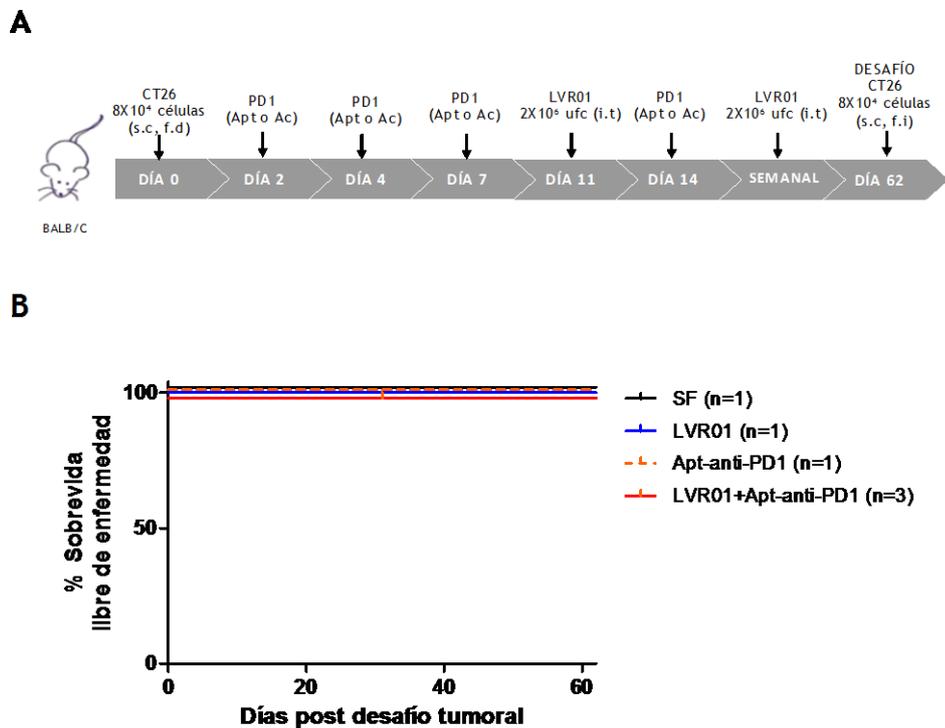
### 6.2. Ensayo de Winn modificado

Este ensayo consiste en la administración *in vivo* de antígenos, que pueden ser de diversa naturaleza (células tumorales, patógenos, etc) dependiendo de la pregunta que se quiere responder, en conjunto con linfocitos que fueron preincubados con el antígeno de interés (Genovesi et al., 1984). El hecho de que exista este encuentro con el antígeno previo a la inoculación y se administren en conjunto es la principal diferencia entre este tipo de aproximaciones y la transferencia adoptiva de células. En este trabajo pusimos a punto una modificación de este ensayo, donde se administraron células tumorales en conjunto con esplenocitos a animales naïve, y se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral y la supervivencia.

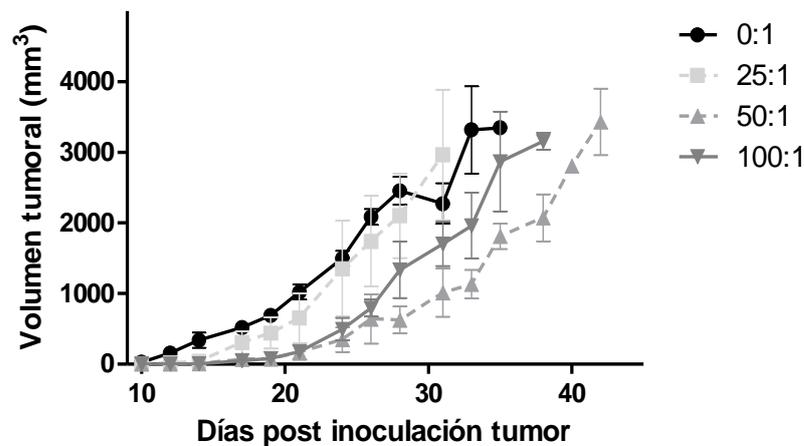
#### 6.2.1. Puesta a punto en CT26

Para esto, se obtuvieron esplenocitos a partir de bazo de ratones naïve, y se evaluaron diferentes relaciones de esplenocitos:células CT26 (0:1, 25:1, 50:1, 100:1) (Figura 3.30). Observamos que en todos los casos los ratones desarrollaron tumor. En las relaciones mayores (50:1 y 100:1) se observó un enlentecimiento en el crecimiento tumoral respecto al grupo control, pero el crecimiento tumoral fue igualmente evidente. A partir de estos resultados decidimos realizar los siguientes ensayos con la relación

100:1 de esplenocitos y células tumorales, ya que el tumor creció sin mayor impedimento, y permitirá la mayor posibilidad de tener linfocitos tumor- específicos.



**Figura 3.29** - Valoración de la respuesta inmune de memoria en el modelo murino de cáncer de colon CT26 subcutáneo luego del tratamiento con LVR01 en conjunto con moléculas que bloquean a anti-PD1, mediante desafío con segundo tumor. Esquema del diseño experimental (A). Curva de sobrevida libre de enfermedad (B). Resultado de 1 experimento. SF: suero fisiológico, LVR01: *Salmonella*, Apt-anti-PD1: aptámero anti-PD1, LVR01+Apt-anti-PD1: *Salmonella* con aptámero anti-PD1.



**Figura 3.30** - Puesta a punto del ensayo de Winn modificado en el modelo murino de cáncer de colon CT26 subcutáneo. Curva de crecimiento tumoral. Resultados de 1 experimento. N=3 por grupo. Ratios esplenocitos:CT26, 0:1, 25:1, 50:1, 100:1.

### 6.2.2. Evaluación en CT26.

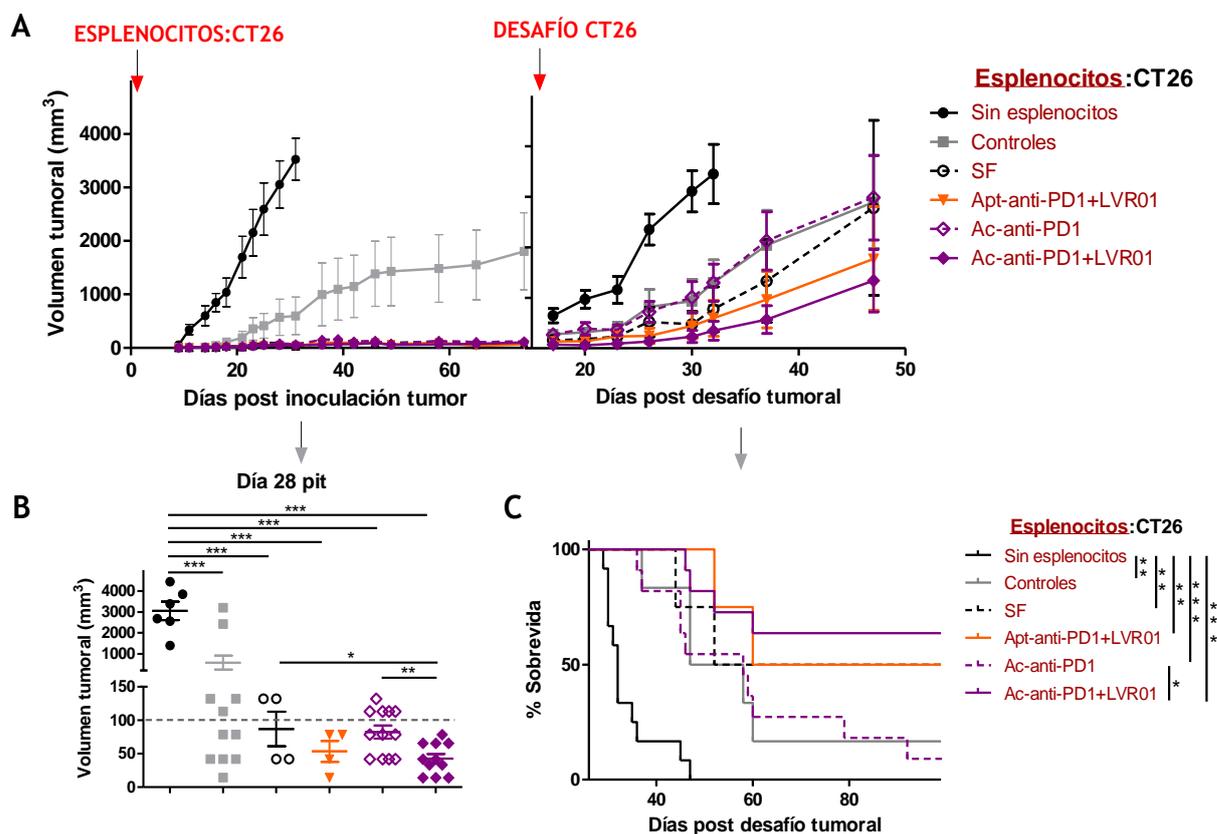
Se llevó a cabo el ensayo de Winn modificado con el fin de evaluar el potencial anti-tumoral de esplenocitos de ratones que no desarrollaron tumor o tuvieron un control en el crecimiento tumoral y sobrevivieron en los ensayos de evaluación del potencial terapéutico de *Salmonella* en combinación con moléculas bloqueadoras de PD1. A este tipo de ensayos también se los conoce como ensayos de citotoxicidad *in vivo* (Genovesi et al., 1984). Se extrajo los bazo de ratones pertenecientes a los grupos: SF, LVR01+Apt-anti-PD1, Ac-anti-PD1, LVR01+Ac-anti-PD1. Además, se utilizaron como grupo control de especificidad tumoral: ratones naïve, ratones con tumores de linfoma A20, y ratones con tumores A20 tratados con LVR01, todos ellos sin contacto previo antígeno de CT26 (representados como un grupo solo para facilitar la visualización). Por último, se agregó un grupo sin esplenocitos, donde podemos observar cómo se da el desarrollo habitual del tumor en este modelo (Figura 3.31 A).

El grupo sin esplenocitos desarrolló tumor tal como ya reportáramos. En el grupo que contiene los controles de especificidad tumoral observamos también un desarrollo de tumores aunque enlentecido con respecto al grupo control (anteriormente descrito en la puesta a punto). Con respecto a los ratones que recibieron esplenocitos de ratones que ya habían tenido un encuentro previo con el tumor CT26, se observó un control del crecimiento tumoral en todos los ratones, independientemente de haber recibido terapia o no (Figura 3.31 A). En la figura 3.31 C vemos representado el volumen tumoral al día 28 p.i.t.. El grupo control presentó un volumen tumoral significativamente mayor que el resto de los grupos. Se observó una diferencia significativa en el tamaño tumoral entre el volumen tumoral del grupo LVR01+Ac-anti-PD1 respecto a los grupos Ac-anti-PD1 y SF. En el gráfico se marcó con una línea gris discontinua el volumen correspondiente a 100 mm<sup>3</sup>, anteriormente habíamos definido este punto de corte para discriminar entre tumores detectables y tumores no detectables. Resulta de interés observar que en tiempos tempranos se observa el desarrollo tumoral en algunos grupos como SF y Ac-anti-PD1, pero a medida que transcurre el tiempo observamos que estos tumores no evolucionan y se está dando un control sobre el crecimiento.

Con estos resultados podemos inferir que en los esplenocitos que fueron transferidos de animales que tuvieron un encuentro previo con el antígeno tumoral, y se administraron en conjunto con las células tumorales a los animales, hay células inmunes con una mayor capacidad antitumoral. Desconocemos si se trata de una respuesta específica o inespecífica frente al tumor; nos planteamos hacer un ensayo de desafío en los ratones que sobrevivieron para poder elucidar un poco más este aspecto.

Al día 74 p.i.t. los ratones fueron desafiados mediante la implantación de un segundo tumor en el flanco opuesto al que se inoculó el tumor primario (Figura 3.31 A). Nuevamente se agregó un grupo control para observar cómo evoluciona el desarrollo tumoral en un ratón naïve. Se observó que los animales que recibieron esplenocitos de ratones que habían sido tratados originalmente con la terapia combinada, ya sea LVR01+Apt-anti-PD1 o LVR01+Ac-anti-PD1, presentaron un enlentecimiento del crecimiento tumoral post-desafío con

respecto a los demás grupos. Este efecto de las terapias combinadas se ve reflejado en la supervivencia global de los animales (Figura 3.31 C). Si bien la estadística tal vez no lo refleje, en ambos grupos al menos un 50% de los animales sobreviven y no desarrollaron nunca el tumor. Este efecto que observamos post desafío nos indica que probablemente se haya desarrollado una respuesta inmune de memoria específica frente al tumor.



**Figura 3.31** - Ensayo de Winn modificado y ensayo de desafío con segundo tumor en el modelo murino de cáncer de colon CT26 subcutáneo. Curvas de crecimiento tumoral post inoculación del tumor y post desafío tumoral (A). Comparación de volúmenes tumorales al día 28 p.i.t. (B). Curva de supervivencia post desafío tumoral (C). Resultados de 1 experimento. La línea discontinua color gris indica el volumen tumoral de 100 mm<sup>3</sup>. Grupos: Sin esplenocitos; Controles: esplenocitos de ratones Naive, A20 y A20+LVR01; SF: esplenocitos del grupo PBS; Apt-anti-PD1+LVR01: esplenocitos del grupo *Salmonella* con aptámero anti-PD1; Ac-anti-PD1: esplenocitos del grupo anticuerpo anti-PD1; Ac-anti-PD1+LVR01: esplenocitos del grupo *Salmonella* con anticuerpo anti-PD1. Las diferencias significativas se señalan con asteriscos (\*): \*p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\*p<0,001.

## DISCUSIÓN FINAL Y PERSPECTIVAS

En esta tesis se planteó estudiar el uso de *Salmonella* como inmunoterapia frente al cáncer en combinación con otros agentes terapéuticos, de modo de darle continuidad a la línea de trabajo del equipo de investigación del Departamento de Desarrollo Biotecnológico en donde se han generado robustos antecedentes sobre el uso de *Salmonella* LVR01, principalmente en melanoma (Mónaco, 2021; Mónaco et al., 2021b). Hasta la fecha, se ha evaluado el uso de terapias combinadas en diversos modelos tumorales buscando una sinergia o una potenciación en el efecto terapéutico. Por ejemplo, se evaluó la combinación de *Salmonella* LVR01 con Imiquimod, un agonista de TLR7, o con quimioterapia (DTIC, dacarbazina), en el modelo murino de melanoma. En ambos casos se observó una potenciación en el efecto antitumoral de las terapias combinadas (Chilibroste et al., 2021; Vola et al., 2018).

Por otro lado, en el Área de Radiofarmacia del CIN (Centro de Investigaciones Nucleares) se encuentra establecida una línea de investigación que estudia el uso de aptámeros como agentes de imagenología molecular (Calzada, 2015; Calzada et al., 2017). Por ejemplo, se ha utilizado el aptámero Sgc8-c, el cual reconoce un marcador tumoral, PTK7. Dicho aptámero fue modificado, derivatizándolo con sondas fluorescentes o con radioisótopos, lográndose una herramienta de diagnóstico. Su aplicabilidad se corroboró en modelos de melanoma, linfoma y leucemias (Calzada, 2020; Calzada et al., 2017; Sicco et al., 2021, 2020). Estos antecedentes generados indican que los aptámeros funcionan muy bien como herramientas de imagen molecular, pero el grupo aún no había explorado su uso como agente terapéutico.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la combinación de *Salmonella* LVR01 con aptámeros que bloquean puntos de control inhibidores del sistema inmune para el tratamiento de tumores sólidos. El plan inicial de este trabajo estaba enfocado en el modelo murino de melanoma, para el cual contábamos con mayor experiencia en el uso de *Salmonella*. Además, el uso de las moléculas inhibidoras de puntos de control del sistema inmune ha cambiado drásticamente el pronóstico de los pacientes con melanoma (Grosso and Jure-Kunkel, 2013; Robert et al., 2015; Waldman et al., 2020). Por lo mencionado anteriormente, se planeó la evaluación del efecto terapéutico del tratamiento con *Salmonella* en combinación con aptámeros anti-PD1, anti-CTLA4 y anti-TIM3 (los tres aptámeros descritos a la fecha de inicio del proyecto) en modelo de melanoma B16F1 subcutáneo. A pesar de los innumerables esfuerzos, en ninguna de las tres aproximaciones se observó una potenciación de la respuesta antitumoral inducida por *Salmonella* (Figura 3.1-6). Allison y colaboradores demostraron inicialmente que la neutralización con anticuerpos anti-CTLA4 aumenta la respuesta antitumoral en animales con cáncer de colon y fibrosarcoma que expresan B7-1 (ligando de CTLA4 humano) (Leach et al., 1996). La monoterapia con anti-CTLA4 se estudió en diversos modelos tumorales con resultados heterogéneos, mostrando una respuesta favorable en algunos modelos como cáncer de cerebro, ovario, vejiga, próstata y tejidos blandos, mientras que en cáncer de mama SM1 y melanoma B16BL6 no se observa respuesta (Waldman et al., 2020). Pese a las discordancias en los resultados preclínicos, los anticuerpos anti-CTLA4 probaron ser efectivos en ensayos clínicos en pacientes con melanoma avanzado. En el año 2011 las agencias reguladoras de EEUU, Europa y Australia aprobaron el uso de Ipilimumab (anti-CTLA4) en pacientes

con melanoma metastásico no resecable (Grosso and Jure-Kunkel, 2013). Por lo cual la ausencia de efecto antitumoral en el modelo estudiado en el proyecto, en concordancia con lo observado previamente por Allison, no denota necesariamente que la estrategia aquí planteada no es válida en una traslación a la clínica.

Por otro lado, se demostró que la neutralización de PD1 con anticuerpos anti-PD1 en modelos tumorales que sobre-expresan PD-L1 (ligando de PD1) aumenta la respuesta antitumoral, potenciando la respuesta T citotóxica. Además, esta terapia es efectiva disminuyendo las metástasis en los animales tratados. Incluso se planteó evaluar la expresión de PD1 en TILs (linfocitos infiltrantes de tumor) y PD-L1 en células tumorales, como potenciales biomarcadores que permitan predecir la respuesta de los pacientes a la inmunoterapia (Waldman et al., 2020). En el año 2014 la FDA aprobó el uso de Nivolumab y Pembrolizumab (ambos anticuerpos anti-PD1) en pacientes con melanoma refractario no resecable. En los ensayos clínicos fase III se demuestra, entre otras cosas, que el bloqueo de PD1 es más eficaz y menos tóxico que la terapia anti-CTLA4 (Robert et al., 2015; Waldman et al., 2020). Si bien los resultados en la clínica son prometedores, los mecanismos que subyacen al efecto antitumoral de los anticuerpos anti-CTLA4 y anti-PD1 no son totalmente comprendidos. Es necesario profundizar en el entendimiento de estos mecanismos para poder mejorar los resultados de las terapias ya aprobadas y realizar un diseño racional de nuevas estrategias terapéuticas combinando tratamientos (Wei et al., 2017). La respuesta antitumoral luego de la administración de inhibidores de puntos de control del sistema inmune varía según el tipo de tumor. Cada tumor genera un microambiente tumoral y una respuesta inmune diferente, esto conlleva a un amplio rango de respuestas frente a una misma terapia. Sería interesante evaluar el uso de terapias combinadas en modelos preclínicos que presenten mutaciones en el gen BRAF, acercándonos así a los pacientes refractarios y a los que generan resistencias al tratamiento. De hecho, tanto en los ensayos clínicos como preclínicos se observan grupos de individuos que responden al tratamiento y otros en los que no se aprecia una respuesta objetiva (Wang et al., 2016; Wei et al., 2017). A pesar de que: (1) el modelo no representaría heterogeneidad entre animales, (2) las moléculas del eje PD/PD-L1 se expresan en el microambiente tumoral, y (3) el tratamiento con inmunoterapias (como LVR01) regula su expresión (Figura 3.4), el bloqueo de PD1 no tiene potencial antitumoral, al menos en nuestro modelo, independientemente de la molécula que se utilice para esto (aptámero o anticuerpo). Aún así, queda por analizar PD-L2, ligando también de PD1, que se expresa principalmente en células presentadoras de antígeno (Zak et al., 2017). Igualmente el bloqueo de PD1 contempla la inhibición de ambos ejes, PD-L1 y PD-L2.

Como se mencionó anteriormente, las respuestas a los inhibidores de puntos control en cáncer son heterogéneas, dependen mucho del tumor y microambiente tumoral. Sumado a esto, la variación inter-especie puede ser crítica en algunos casos y se encuentra vigente el debate sobre si el modelo murino es el más adecuado para el estudio de inmunoterapias frente al cáncer, ya que la traslación a la clínica puede diferir bastante de lo observado en el ratón. Esto no debe interpretarse necesariamente como algo negativo, porque de hecho los anticuerpos anti-CTLA4 y anti-PD1 tienen un gran potencial terapéutico en la clínica. Sin embargo, pone en evidencia la necesidad de generar nuevos modelos y estrategias para que esta traslación sea consistente con los resultados reportados.

A pesar de la limitante respecto al modelo, al inicio del proyecto confiábamos en que al menos una de las aproximaciones evaluadas iba a presentar un efecto terapéutico

más claro. Santulli-Marotto y colaboradores evaluaron el efecto terapéutico de un aptámero ARN anti-CTLA4 en un modelo murino de melanoma, demostrando que tanto el aptámero seleccionado como el anticuerpo monoclonal anti-CTLA4 tienen un efecto antitumoral cuando se administran como monoterapias, determinado por aumento de la supervivencia libre de enfermedad de los animales tratados con respecto a los del grupo control. Además, demostraron que la supervivencia libre de enfermedad aumenta aún más al tetramerizar el aptámero (Santulli-Marotto et al., 2003). La secuencia del aptámero que utilizamos en esta tesis fue obtenida del trabajo mencionado anteriormente, así como la dosis a administrar. En nuestras manos, el aptámero anti-CTLA4 en combinación con *Salmonella* no tuvo impacto en el progreso de la enfermedad de los animales. Con este aptámero sólo evaluamos un único esquema de administración, que fue con el que se puso a punto inicialmente el modelo. Sabemos que CTLA4 se expresa y regula negativamente luego del tratamiento con LVR01 en el modelo melanoma (resultados no mostrados). Por tanto, tal vez exista un régimen adecuado en donde se pueda visualizar un potencial terapéutico. Como es un aptámero ARN, su síntesis es más compleja ya que requiere de modificaciones que le aportan estabilidad, y por ende tiene mayor costo y requiere tiempos más largos para su adquisición (Figura 3.1). Por tanto, en este trabajo se priorizó continuar los ensayos con los otros aptámeros que mostraron tener resultados más prometedores con menores dificultades de adquisición.

Hervas-Stubbs y colaboradores reportaron que el aptámero ARN anti-TIM3 en combinación con el anticuerpo anti-PD-L1 administrado en dosis sub-óptimas tenía un efecto antitumoral en el modelo murino de cáncer de colon CT26 subcutáneo. Observaron un enlentecimiento del tamaño tumoral de los animales que recibían la terapia combinada respecto al grupo control (Hervas-Stubbs et al., 2016). De este trabajo se obtuvo la secuencia del aptámero anti-TIM3 y la cantidad de dosis a administrar. No había antecedentes del uso de este aptámero en modelo de melanoma. En este caso el efecto de la terapia combinada fue modesto respecto al grupo control (Figura 3.1), por lo que se contempló como potencial candidato para continuar su evaluación en nuestro modelo. A pesar de tratarse de un aptámero ARN, de síntesis compleja, consideramos de interés continuar trabajando con esta molécula a futuro.

Por último, Prodeus y colaboradores, trabajaron con un aptámero ADN anti-PD1 pegilado y evaluaron su efecto terapéutico en un modelo murino de cáncer de colon MC38.CEA intraperitoneal. Observaron que al administrar tanto el aptámero pegilado como el anticuerpo monoclonal anti-PD1 había una disminución en la cantidad de nódulos tumorales y en el volumen tumoral de los mismos (Prodeus et al., 2015). La secuencia del aptámero anti-PD1 se obtuvo de este trabajo, así como la dosis a ser administrada. La terapia combinada utilizando este aptámero resultó también tener un efecto modesto en el modelo de melanoma (Figura 3.1). Nos enfrentamos nuevamente a la limitante de que el trabajo de referencia utiliza un modelo tumoral diferente al que nosotros evaluamos. Sin embargo, se conoce que el bloqueo de PD1 tiene un efecto beneficioso en la clínica cuando se aplica en pacientes con melanoma, por lo que nuestras expectativas eran más altas a la hora pensar en los resultados esperados por esta terapia. La evidencia clínica, sumado al efecto observado, fundamentaron la elección de este aptámero para continuar los estudios. Además, al tratarse de un aptámero ADN, su síntesis resulta menos compleja, obteniéndose cantidades grandes del aptámero en tiempos relativamente cortos, lo que permitió realizar todos los ensayos previstos. Otro aspecto relevante es que en todos los casos utilizamos los aptámeros sin ninguna derivatización (tetramerización, pegilación, etc).

Inicialmente estaba planificado pegilar el aptámero anti-PD1, pero luego por el transcurso de este trabajo y los resultados obtenidos, dicha aproximación no se concretó.

Debemos considerar que los aptámeros presentan algunas características que pueden interpretarse como limitaciones al momento de pensarlos como un agente terapéutico. Su pequeño tamaño conlleva a una rápida eliminación, lo que dificulta su permanencia en el organismo el tiempo suficiente para surtir su efecto. En este caso, esta desventaja se vuelve más evidente, ya que lo necesitamos en el sitio de acción bloqueando su blanco molecular por un período largo de tiempo. Igualmente, es interesante pensar que la misma característica es lo que lo hace una herramienta promisoría para diagnóstico (Lakhin et al., 2013). Una estrategia para solucionar la limitación del tamaño es pegilar al aptámero. Esta modificación le confiere un mayor tamaño a la biomolécula y aumenta la vida media en el organismo. Anteriormente se mencionaba que esta derivatización no se realizó en el marco de esta tesis, porque se comparó el potencial terapéutico del aptámero anti-PD1 con el anticuerpo monoclonal comercial, de mayor tamaño, y tampoco se observó el efecto terapéutico esperado (Figuras 3.4 y 3.5). Cabe mencionar que si bien no existen diferencias en el potencial terapéutico entre ambas moléculas, la respuesta inmune inducida difiere (Figura 3.23). Sumado a esto, en nuestra experiencia derivatizando el aptámero, el rendimiento fue muy bajo, lo que resulta en una severa limitante para obtener cantidad suficiente de aptámero pegilado para llevar a cabo un ensayo *in vivo*. Una perspectiva que se desprende de esta observación es optimizar la reacción de derivatización para mejorar el rendimiento, ya sea modificando las relaciones molares, condiciones o tiempos de la reacción.

La terapia combinada demostró mayor potencial terapéutico en el modelo de cáncer de colon que en melanoma (Figuras 3.9-12). El efecto observado podría explicarse porque la molécula blanco tiene una mayor expresión en los órganos de interés en el modelo de CT26 (Figura 3.20), por tanto el aptámero tiene una mayor captación y retención en los órganos blanco (Figura 3.17).

Aún así, sólo un subgrupo de los ratones tratados con la terapia combinada es capaz de desarrollar una respuesta inmune que permite controlar el desarrollo del tumor. En el resto de los animales tratados no se observa un efecto y el crecimiento tumoral evoluciona rápidamente. La respuesta segmentada ya ha sido reportada por otros grupos que trabajan con anticuerpos anti-PD1, quienes en algunos casos discriminando a los animales entre respondedores y no respondedores a la terapia (Wang et al., 2016). Wang y colaboradores estudiaron las características que tenían los tumores de aquellos ratones que respondieron a la terapia en comparación con los no respondedores. Observaron que la densidad del infiltrado leucocitario, principalmente células B y T, era mayor en el grupo respondedor, también vieron una mayor expresión de IFNs del tipo I y II. Al utilizar un anticuerpo que bloquea el receptor de IFN del tipo I observaron que se perdía el efecto en el grupo respondedor, resaltando la importancia de estas citoquinas en la respuesta antitumoral (Wang et al., 2016). Con estos antecedentes lo siguiente que exploró el grupo de investigación de Wang fue la administración de la terapia anti-PD1 en conjunto con un agonista TLR9, y observaron que en el efecto antitumoral fue superior y el número de animales respondedores mayor en respuesta a la terapia combinada. Se pueden apreciar ciertas similitudes entre los resultados obtenidos en nuestro trabajo y los mencionados anteriormente: sólo un subgrupo de ratones respondieron a la terapia y el número de animales respondedores se

incrementó con la terapia combinada. Además, la estrategia terapéutica utilizando *Salmonella* LVR01 busca generar un microambiente tumoral proinflamatorio que promueva el infiltrado de leucocitos y que su activación en este contexto estimule una respuesta efectora antitumoral. *Salmonella* estimula la producción de IFN $\gamma$ , el rol de esta citoquina será evaluado por nuestro grupo utilizando ratones KO para IFN $\gamma$ . A pesar de observar un incremento en la cantidad de animales respondedores, éste no fue tan significativo como esperábamos y creemos que en parte puede explicarse porque uno de los mecanismos por el cual *Salmonella* ejerce su efecto antitumoral es mediante la disminución de la expresión de PD-L1 (Chen et al., 2020) y de PD1 (Figura 3.4), actuando ambas terapias sobre el eje PD1/PD-L1.

Independientemente de la molécula utilizada, el bloqueo de PD1 *per se* no tuvo efecto terapéutico en el modelo B16F1. En el modelo CT26 se observó un efecto modesto al utilizar el anticuerpo anti-PD1. A tiempos tempranos (día 14 p.i.t.) los ratones portadores de tumores CT26 que recibieron el tratamiento con anticuerpos anti-PD1, ya sea como monoterapia o en la terapia combinada, presentaron un aumento en la población de linfocitos B a nivel de TDLN con respecto al grupo control (Figura 3.23). Por tanto, el anticuerpo anti-PD1 demostró ser un mejor modulador de la respuesta inmune en comparación con el aptámero anti-PD1. Por otro lado, a tiempos tardíos (día 27 p.i.t.) se encontró un aumento de las poblaciones de LTC en TDLN de los ratones tratados con LVR01 y Apt-anti-PD1+LVR01 con respecto al grupo control (Figura 3.24). Estos análisis no discriminan en subgrupos, respondedores o no respondedores, enmascarando los resultados de aquellos ratones que son capaces de generar una respuesta inmune efectiva contra el tumor. Considerando los tiempos en los que se realizaron los ensayos, a tiempos tempranos no podemos dividirlos en subgrupos porque el tumor recién comienza a ser palpable, y desconocemos cómo progresarán. Por el contrario, al día 27 p.i.t. sí podemos inferir cuáles animales se encuentran controlando el desarrollo tumoral y cuáles no. Al tratarse de animales aún en tratamiento, se deberán establecer criterios muy precisos que permitan predecir la continuidad del crecimiento tumoral, para realizar la segregación grupal. En los únicos casos que podemos afirmar que los animales fueron capaces de controlar el crecimiento del tumor son en aquellos sobre los cuales se realizó un seguimiento del tamaño tumoral y sobrevida, y no presentaron un crecimiento tumoral pasados los 40 días p.i.t.. Consideramos importante realizar nuevos ensayos y obtener evidencia más robusta sobre la cinética de la respuesta inmune en este modelo por diversos motivos: por un lado, para caracterizar mejor el modelo recientemente puesto a punto en nuestro laboratorio; y, por otro lado, para profundizar en los mecanismos que subyacen el potencial terapéutico de *Salmonella*, y de la terapia combinada, en este modelo en particular.

Si pensamos en el rol fisiológico de CTLA4 y PD1, se sabe que ambos participan en la regulación de la respuesta T, pero que actúan en tiempos y sitios diferentes. CTLA4 es un regulador temprano de la respuesta inmune y su acción la realiza principalmente en los ganglios linfáticos, mientras que PD1 regula la respuesta inmune en tiempos más tardíos y en su acción la realiza en los tejidos periféricos (Waldman et al., 2020). En un estudio en que se realizó una clasificación sistemática de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) en muestras de melanoma provenientes de ratón y humano, se observó que el tratamiento con inhibidores de puntos de control induce la expansión de poblaciones específicas dentro de los TILs. El tratamiento con anti-PD1 induce principalmente la expansión de linfocitos T CD8<sup>+</sup> con un fenotipo exhausto, mientras que el tratamiento con anti-CTLA4 induce la expansión de linfocitos T CD4<sup>+</sup> tipo Th1 y

linfocitos T CD8<sup>+</sup> exhaustos. Al tener mecanismos de acción celulares diferentes, es lógico pensar que la combinación de ambas terapias podrían aumentar su eficacia y, de hecho, este aumento se observó en estudios preclínicos y clínicos (Wei et al., 2017). A pesar de ello, en el contexto de este trabajo no se evaluó la combinación triple de terapias: *Salmonella*, anti-PD1 y anti-CTLA4.

La combinación de terapias está sustentada por la necesidad de evadir mecanismos de resistencia al tratamiento. Se han estudiado múltiples combinaciones, desde diferentes moduladores de la respuesta inmune hasta quimioterapias, radioterapias o vacunas combinadas con inhibidores de puntos de control del sistema inmune. Debido a la heterogeneidad de los procesos tumorales y de la respuesta a los tratamientos, se obtienen mejores resultados utilizando terapias combinadas. Cuanto más se estudian las diferentes aproximaciones terapéuticas, mayor información se genera que permite el diseño racional de tratamientos más efectivos y precisos para cada paciente en particular (Galon and Bruni, 2019; Sharma and Allison, 2015). En este trabajo, la ausencia o modesta presencia de efecto tumoral de una de nuestras ramas de tratamiento no permitió ahondar en este sentido.

No obstante, nuestro trabajo generó información relevante acerca de la respuesta inmune inducida por la terapia combinada exitosa: (1) promovió una respuesta anti-tumoral de memoria efectiva frente a posteriores desafíos tumorales (Figura 3.29); (2) la transferencia de los componentes celulares de dicha respuesta confirmó protección a ratones naïve frente al desarrollo de tumor (ensayo de Winn modificado, Figura 3.31); (3) la respuesta humoral permitió discriminar entre respondedores y no respondedores a la terapia combinada, dejando en evidencia la importancia de los anticuerpos tumor-específicos en el control tumoral (Figura 3.28).

Los ratones tratados con el anticuerpo anti-PD1, ya sea como monoterapia o en la terapia combinada, generan rápidamente niveles más elevados de IgG totales anti-CT26; mientras que en los ratones tratados con aptámero anti-PD1 ese aumento se da pero en tiempos más tardíos, donde los niveles de anticuerpos se asemejan en todos los grupos que recibieron tratamiento (Figura 3.27). El hecho de que la respuesta humoral se detecte tempranamente en los animales que recibieron anticuerpo anti-PD1 se vincula con la mejor respuesta que tuvieron los animales *in vivo* con este tratamiento. La generación de una respuesta inmune específica frente al tumor en tiempos tempranos, cuando la carga tumoral aún es baja, permite un mejor control del tumor como se discutirá más adelante. Sería relevante evaluar la respuesta inmune humoral a otros tiempos para enriquecer la cinética establecida y tener una visión más completa de los acontecimientos. Además, a pesar de que los resultados obtenidos al día 40 p.i.t. resultan interesantes, se debe considerar el sesgo debido al análisis único de los ratones que lograron sobrevivir hasta este día.

Una interrogante que se desprende de este trabajo, y de otros trabajos anteriores, es ¿por qué la terapia no siempre es capaz de controlar el crecimiento tumoral? Esta interrogante se puede abordar desde múltiples perspectivas. Desde la mirada del sistema inmune y el microambiente tumoral, punto discutido extensamente en esta tesis, existe una relación entre la inmunogenicidad de los tumores y las respuestas a las inmunoterapias (Galon and Bruni, 2019). Desde la perspectiva de la carga tumoral, a alta carga tumoral, el sistema inmune no tiene la capacidad de controlar y encontrar la fase de equilibrio por más de que se lo potencie (Mittal et al., 2014). En este trabajo observamos que cuando se administran cargas tumorales bajas, la capacidad de

controlar el desarrollo tumoral aumenta en los animales que reciben la terapia combinada. También observamos que cuando se administran bajas cargas en conjunto con células inmunes provenientes de animales que ya habían recibido tratamiento (ensayo de Winn modificado), la capacidad de controlar el desarrollo del tumor aumenta significativamente. Aquí, además de la baja carga tumoral, debemos tener en cuenta que al administrar las células tumorales y las células inmunes en suspensión en conjunto, las células tumorales no se encuentran formando estructuras complejas, por lo que se convierten en un blanco más accesible y vulnerable de ser eliminadas.

Se han descrito otras aproximaciones terapéuticas que han tenido éxito en la clínica, como el uso de anticuerpos anti-PD1 en neoadyuvancia previo a remover quirúrgicamente tumores en cáncer de pulmón. En ese estudio observaron que aquellos pacientes que recibieron el tratamiento con anti-PD1 tenían una mejor respuesta al tratamiento y una mejor capacidad de controlar micrometástasis (Forde et al., 2018). En este caso el bloqueo de PD1 genera una expansión de las poblaciones de linfocitos T, tanto en tumor como a nivel de sangre periférica. No se espera que esta inmunoterapia reduzca el tamaño tumoral, sino que haya poblaciones tumor-específicas circulando que se encarguen de controlar las recidivas y los procesos metastásicos, una vez removido el tumor primario. Esta estrategia terapéutica fue probada a nivel preclínico, donde animales portadores de melanoma B16F1 tratados con *Salmonella* LVR01 en combinación con imiquimod en neoadyuvancia presentaron menor número de metástasis y de menor tamaño que el grupo control, luego de la exéresis quirúrgica del tumor primario (Vola et al., 2018). Teniendo presente estas evidencias, otra aproximación que se podría evaluar en un futuro es el uso de *Salmonella* en combinación con anti-PD1 como terapia adyuvante pre-cirugía.

A lo largo del trabajo hemos reflexionado sobre el modelo terapéutico que planteamos y pensado posibles estrategias terapéuticas donde se pueda potenciar el efecto antitumoral utilizando anti-PD1 en combinación con *Salmonella*. Resulta evidente la necesidad de generar una respuesta inmune específica frente al tumor, de modo de contar con una población de linfocitos T antígenos específicos y luego poder expandir esta población con un fenotipo efector con la administración de moléculas inhibitorias de puntos de control del sistema inmune. *Salmonella* genera muerte celular inmunogénica en las células tumorales (Mónaco, 2021), de este modo se puede generar una respuesta inmune específica contra el tumor tempranamente. Hipotéticamente, si luego se administra anti-PD1, se podría potenciar el efecto. Sin embargo, nunca se ensayó ninguna aproximación donde la administración de *Salmonella* anteviniese el tratamiento con bloqueadores de punto de control, por la dificultad implícita del tratamiento intratumoral con *Salmonella* a tiempos tempranos (sin tumor palpable). Para sortear esta limitante se podría administrar *Salmonella* por otras vías como parenteral o subcutánea, ya que ésta tiene tropismo por los tumores, brindándonos la posibilidad de comenzar tempranamente el tratamiento.

En suma, el trabajo realizado en el contexto de esta tesis de Maestría, aporta conocimientos básicos que sirven de insumo para el diseño racional de estrategias terapéuticas que combinen este tipo de inmunoterapias. En líneas generales, la terapia combinada es capaz de generar una respuesta inmune específica frente al tumor, que se traduce en un moderado efecto terapéutico a nivel grupal, destacando una pequeña proporción de individuos que responden completamente. Estos animales que controlaron el desarrollo del tumor primario, también son capaces también de controlar el establecimiento y desarrollo de un segundo tumor implantado en un ensayo

de desafío. Sumado a esta evidencia, los esplenocitos de ratones que respondieron a la terapia confiere protección e impide el desarrollo de un nuevo tumor cuando se administran en conjunto con las células tumorales, y brinda protección frente a subsecuentes desafíos, evidenciando la generación de una respuesta inmune memoria por la terapia combinada. A futuro deberán explorarse escenarios acordes a este tipo de terapias: bajas cargas tumorales, ventanas de tiempo amplias para generar respuesta, donde aprovechar el potencial terapéutico de esta terapia combinada.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S., 2015. *Inmunología Celular y Molecular*, 8th ed.
- Abdolvahab, M.H., Darvishi, B., Zarei, M., Majidzadeh-A, K., Farahmand, L., 2020. Interferons: Role in cancer therapy. *Immunotherapy* 12, 833-855. <https://doi.org/10.2217/imt-2019-0217>
- Agorio, C., Schreiber, F., Sheppard, M., Mastroeni, P., Fernandez, M., Martinez, M.A., Chabalgoity, J.A., 2007. Live attenuated Salmonella as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma. *J. Gene Med.* 9, 416-423. <https://doi.org/10.1002/jgm.1023>
- Al-Hilu, S.A., Al-Shujairi, W.H., 2020. Dual Role of Bacteria in Carcinoma: Stimulation and Inhibition. *Int. J. Microbiol.* 2020, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2020/4639761>
- Alduaij, W., Illidge, T.M., 2011. The future of anti-CD20 monoclonal antibodies: Are we making progress? *Blood* 117, 2993-3001. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-298356>
- American Cancer Society, 2021. *Cancer Facts & Figures 2021* [WWW Document]. URL <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2021.html>
- American Cancer Society, 2020. *Treating Bladder Cancer* [WWW Document]. URL <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/treating.html>
- Barbas, A.S., Mi, J., Clary, B.M., White, R.R., 2010. Aptamer applications for targeted cancer therapy. *Futur. Oncol.* 6, 1117-1126. <https://doi.org/10.2217/fon.10.67>
- Barutello, G., Rolih, V., Arigoni, M., Tarone, L., Conti, L., Quaglino, E., Buracco, P., Cavallo, F., Riccardo, F., 2018. Strengths and weaknesses of pre-clinical models for human melanoma treatment: Dawn of dogs' revolution for immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19030799>
- Bascuas, T., Moreno, M., Grille, S., Chabalgoity, J.A., 2018. Salmonella immunotherapy improves the outcome of CHOP chemotherapy in non-Hodgkin lymphoma-bearing mice. *Front. Immunol.* 9, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00007>
- Bergman, P.J., 2019. Cancer Immunotherapies. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 49, 881-902. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2019.04.010>
- Bertolotto, C., 2013. Melanoma: From Melanocyte to Genetic Alterations and Clinical Options. *Scientifica (Cairo)*. 2013, 1-22. <https://doi.org/10.1155/2013/635203>
- Boasberg, P.D., Hoon, D.S.B., Piro, L.D., Martin, M.A., Fujimoto, A., Kristedja, T.S., Bhachu, S., Ye, X., Deck, R.R., O'Day, S.J., 2006. Enhanced survival associated with vitiligo expression during maintenance biotherapy for metastatic melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 126, 2658-2663. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700545>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality*

- worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bucktrout, S.L., Bluestone, J.A., Ramsdell, F., 2018. Recent advances in immunotherapies: From infection and autoimmunity, to cancer, and back again. *Genome Med.* 10, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0588-4>
- Bule, P., Aguiar, S.I., Aires-Da-silva, F., Dias, J.N.R., 2021. Chemokine-directed tumor microenvironment modulation in cancer immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22189804>
- Calzada, V., 2020. Aptamers in diagnostic and molecular imaging applications. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 174, 141-160. [https://doi.org/10.1007/10\\_2019\\_115](https://doi.org/10.1007/10_2019_115)
- Calzada, V., 2015. Nuevas Estrategias de Imagenología Molecular en Cáncer. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, Universidad de la República.
- Calzada, V., Moreno, M., Newton, J., González, J., Fernández, M., Gambini, J.P., Ibarra, M., Chabalgoity, A., Deutscher, S., Quinn, T., Cabral, P., Cerecetto, H., 2017. Development of new PTK7-targeting aptamer-fluorescent and -radiolabelled probes for evaluation as molecular imaging agents: Lymphoma and melanoma in vivo proof of concept. *Bioorg. Med. Chem.* 25, 1163-1171. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.12.026>
- Chabalgoity, J.A., Baz, A., Rial, A., Grille, S., 2007. The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18, 195-207. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.01.016>
- Chabalgoity, J.A., Moreno, M., Carol, H., Dougan, G., Hormaeche, C.E., 2000. Salmonella typhimurium as a basis for a live oral Echinococcus granulosus vaccine. *Vaccine* 19, 460-469. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00197-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00197-3)
- Chamie, K., Lee, J.H., Amy, R., Rhode, P.R., Patrick, S.-S., 2019. Preliminary phase 2 clinical results of IL-15R $\alpha$ Fc superagonist N-803 with BCG in BCG-unresponsive non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) patients. *J. Clin. Oncol.* 37:15\_suppl, 4561-4561. [https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15\\_suppl.4561](https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.4561)
- Chang, W.W., Lee, C.H., 2014. Salmonella as an innovative therapeutic antitumor agent. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 14546-14554. <https://doi.org/10.3390/ijms150814546>
- Chen, C., Zhou, S., Cai, Y., Tang, F., 2017. Nucleic acid aptamer application in diagnosis and therapy of colorectal cancer based on cell-SELEX technology. *npj Precis. Oncol.* 1, 1-7. <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0041-y>
- Chen, D.S., Mellman, I., 2013. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* 39, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
- Chen, M.C., Pangilinan, C.R., Lee, C.H., 2020. Salmonella breaks tumor immune tolerance by downregulating tumor programmed death-ligand 1 expression. *Cancers (Basel).* 12, 1-14. <https://doi.org/10.3390/cancers12010057>
- Cheson, B.D., Leonard, J.P., 2008. Monoclonal Antibody Therapy for B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 359, 613-626. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0708875>
- Chilibroste, S., 2018. Dacarbazina combinada con Salmonella para el tratamiento de melanoma. Informe final de Pasantía - LBH. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Chilibroste, S., Mónaco, A., Plata, M.C., Vola, M., Agorio, C.I., Chabalgoity, J.A.,

- Moreno, M., 2021. Preclinical Evaluation of LVR01 Attenuated Salmonella as Neoadjuvant Intralesional Therapy in Combination with Chemotherapy for Melanoma Treatment. *J. Invest. Dermatol.* <https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.08.442>
- Cipponi, A., Wieers, G., Van Baren, N., Coulie, P.G., 2011. Tumor-infiltrating lymphocytes: Apparently good for melanoma patients. but why? *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 1153-1160. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1026-2>
- Cunha, D., Pacheco, F.A., Cardoso, J., 2009. Vitiligo: a good prognostic factor in melanoma? *Dermatol. Online J.* 15, 15.
- Cunningham, C., Nemunaitis, J., 2001. A phase I trial of genetically modified Salmonella typhimurium expressing cytosine deaminase (TAPET-CD, VNP20029) administered by intratumoral injection in combination with 5-fluorocytosine for patients with advanced or metastatic cancer. Protocol no: CL-. *Hum. Gene Ther.* 12, 1594-6.
- Dekker, E., Tanis, P.J., Vleugels, J.L.A., Kasi, P.M., Wallace, M.B., 2019. Colorectal cancer. *Lancet* 394, 1467-1480. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0)
- Delgado, L., Basso, J., Quian, J., Rosa, R., Ruocco, H., Brescia, A., Echevarría, J., 2018. Guía de práctica clínica de tamizaje del cáncer colo-rectal.
- Duarte, D., n.d. Generación de anticuerpos monodominio contra blancos de la inmunidad para la preparación de anticuerpos biespecíficos. Maestría en Química. Facultad de Química, Universidad de la República.
- Dunn, G.P., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., 2006. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 836-848. <https://doi.org/10.1038/nri1961>
- Duong, M.T.-Q., Qin, Y., You, S.-H., Min, J.-J., 2019. Bacteria-cancer interactions: bacteria-based cancer therapy. *Exp. Mol. Med.* 51, 1-15. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0297-0>
- Ellington, A.D., Szostak, J.W., 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818-822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>
- Enamorado, M., Iborra, S., Priego, E., Cueto, F.J., Quintana, J.A., Martínez-Cano, S., Mejías-Perez, E., Esteban, M., Melero, I., Hidalgo, A., Sancho, D., 2017. Enhanced anti-tumour immunity requires the interplay between resident and circulating memory CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat. Commun.* 8, 1-11. <https://doi.org/10.1038/ncomms16073>
- ESMO, 2020. IMMUNOSCORE CLASSIFICATION SIGNIFICANTLY ASSOCIATES WITH TIME TO RECURRENCE IN ASIAN PATIENTS WITH EARLY STAGE COLON CANCER [WWW Document]. URL <https://www.esmo.org/oncology-news/immunoscore-classification-significantly-associates-with-time-to-recurrence-in-asian-patients-with-early-stage-colon-cancer>
- Fainboim, L., Geffner, J., 2011. Introducción a la Inmunología Humana, 6th ed.
- Famulok, M., Mayer, G., 1999. Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 243, 123-136. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-60142-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-60142-2_7)
- Farkona, S., Diamandis, E.P., Blasutig, I.M., 2016. Cancer immunotherapy: The beginning of the end of cancer? *BMC Med.* 14, 1-18.

<https://doi.org/10.1186/s12916-016-0623-5>

FDA, 2017. FDA approves CAR-T cell therapy to treat adults with certain types of large B-cell lymphoma. [WWW Document]. URL <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-car-t-cell-therapy-treat-adults-certain-types-large-b-cell-lymphoma>

Floros, T., Tarhini, A.A., 2015. Anticancer Cytokines: Biology and Clinical Effects of Interferon- $\alpha$ 2, Interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12. *Semin. Oncol.* 42, 539-548. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.05.015>

Fondo Nacional de Recursos, 2020a. TRATAMIENTO SISTÉMICO DEL MELANOMA CUTANEO CON VEMURAFENIB Y COBIMETINIB, Y CON PEMBROLIZUMAB [WWW Document]. URL [http://www.fnr.gub.uy/sites/default/files/normativas/medicamentos/n\\_trat\\_melanoma\\_cutaneo.pdf](http://www.fnr.gub.uy/sites/default/files/normativas/medicamentos/n_trat_melanoma_cutaneo.pdf)

Fondo Nacional de Recursos, 2020b. Tratamiento sistémico del cáncer de pulmón metastásico [WWW Document]. URL [http://www.fnr.gub.uy/sites/default/files/normativas/medicamentos/n\\_trat\\_c\\_anpulmon.pdf](http://www.fnr.gub.uy/sites/default/files/normativas/medicamentos/n_trat_c_anpulmon.pdf)

Fondo Nacional de Recursos, 2019. TRATAMIENTO DE LINFOMAS NO HODGKIN CON RITUXIMAB , BENDAMUSTINA e IBRUTINIB [WWW Document]. URL [http://www.fnr.gub.uy/sites/default/files/normativas/medicamentos/n\\_trat\\_linfomas.pdf](http://www.fnr.gub.uy/sites/default/files/normativas/medicamentos/n_trat_linfomas.pdf)

Forbes, N.S., Coffin, R.S., Deng, L., Evgin, L., Fiering, S., Giacalone, M., Gravekamp, C., Gulley, J.L., Gunn, H., Hoffman, R.M., Kaur, B., Liu, K., Lyerly, H.K., Marciscano, A.E., Moradian, E., Ruppel, S., Saltzman, D.A., Tattersall, P.J., Thorne, S., Vile, R.G., Zhang, H.H., Zhou, S., McFadden, G., 2018. White paper on microbial anti-cancer therapy and prevention. *J. Immunother. Cancer* 6, 1-24. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0381-3>

Forde, P.M., Chaft, J.E., Smith, K.N., Anagnostou, V., Cottrell, T.R., Hellmann, M.D., Zahurak, M., Yang, S.C., Jones, D.R., Broderick, S., Battafarano, R.J., Velez, M.J., Rekhman, N., Olah, Z., Naidoo, J., Marrone, K.A., Verde, F., Guo, H., Zhang, J., Caushi, J.X., Chan, H.Y., Sidhom, J.-W., Scharpf, R.B., White, J., Gabrielson, E., Wang, H., Rosner, G.L., Rusch, V., Wolchok, J.D., Merghoub, T., Taube, J.M., Velculescu, V.E., Topalian, S.L., Brahmer, J.R., Pardoll, D.M., 2018. Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 378, 1976-1986. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1716078>

Fu, Z., Xiang, J., 2020. Aptamers, the Nucleic Acid Antibodies, in Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2793. <https://doi.org/10.3390/ijms21082793>

Galon, J., Bruni, D., 2019. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 197-218. <https://doi.org/10.1038/s41573-018-0007-y>

Garbe, C., Eigentler, T.K., Keilholz, U., Hauschild, A., Kirkwood, J.M., 2011. Systematic Review of Medical Treatment in Melanoma: Current Status and Future Prospects. *Oncologist* 16, 5-24. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0190>

Gefen, T., Castro, I., Muharemagic, D., Puplampu-Dove, Y., Patel, S., Gilboa, E., 2017. A TIM-3 Oligonucleotide Aptamer Enhances T Cell Functions and Potentiates Tumor Immunity in Mice. *Mol. Ther.* 25, 2280-2288.

<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.06.023>

- Genovesi, E. V., Pettey, C.L., Collins, J.J., 1984. Use of adoptive transfer and Winn assay procedures in the further analysis of antiviral acquired immunity in mice protected against Friend leukemia virus-induced disease by passive serum therapy. *Cancer Res.* 44, 1489-98.
- Geyer, M.B., Brentjens, R.J., 2017. Review: Current clinical applications of chimeric antigen receptor (CAR) modified T cells. *Cytotherapy* 176, 1393-1409. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.07.003>.
- Giraldo, N.A., Becht, E., Vano, Y., Sautès-Fridman, C., Fridman, W.H., 2015. The immune response in cancer: from immunology to pathology to immunotherapy. *Virchows Arch.* 467, 127-135. <https://doi.org/10.1007/s00428-015-1787-7>
- Gogas, H., Polyzos, A., Kirkwood, J., 2013. Immunotherapy for advanced melanoma: Fulfilling the promise. *Cancer Treat. Rev.* 39, 879-885. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2013.04.006>
- Gorabi, A.M., Hajighasemi, S., Sathyapalan, T., Sahebkar, A., 2020. Cell transfer-based immunotherapies in cancer: A review. *IUBMB Life* 72, 790-800. <https://doi.org/10.1002/iub.2180>
- Goubran, H.A., Kotb, R.R., Stakiw, J., Emara, M.E., Burnouf, T., 2014. Regulation of Tumor Growth and Metastasis: The Role of Tumor Microenvironment. *Cancer Growth Metastasis* 7, CGM.S11285. <https://doi.org/10.4137/CGM.S11285>
- Grille, S., Moreno, M., Bascuas, T., Marqués, J.M., Muñoz, N., Lens, D., Chabalgoity, J.A., 2014. Salmonella enterica serovar Typhimurium immunotherapy for B-cell lymphoma induces broad anti-tumour immunity with therapeutic effect. *Immunology* 143, 428-437. <https://doi.org/10.1111/imm.12320>
- Grille, S., Moreno, M., Brugnini, A., Lens, D., Chabalgoity, J.A., 2013. A therapeutic vaccine using Salmonella-modified tumor cells combined with interleukin-2 induces enhanced antitumor immunity in B-cell lymphoma. *Leuk. Res.* 37, 341-348. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2012.10.003>
- Grosso, J.F., Jure-Kunkel, M.N., 2013. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. *Cancer Immun.* 13, 5.
- Halama, N., Zoernig, I., Jaeger, D., 2010. Advanced Malignant Melanoma: Immunologic and Multimodal Therapeutic Strategies. *J. Oncol.* 2010, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2010/689893>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hembruff, S.L., Cheng, N., 2009. Chemokine signaling in cancer: Implications on the tumor microenvironment and therapeutic targeting. *Cancer Ther.* 7, 254-267.
- Herndon, T.M., Demko, S.G., Jiang, X., He, K., Gootenberg, J.E., Cohen, M.H., Keegan, P., Pazdur, R., 2012. U.S. Food and Drug Administration Approval: Peginterferon-alfa-2b for the Adjuvant Treatment of Patients with Melanoma. *Oncologist* 17, 1323-1328. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0123>
- Hervas-Stubbs, S., Soldevilla, M.M., Villanueva, H., Mancheño, U., Bendandi, M., Pastor, F., 2016. Identification of TIM3 2'-fluoro oligonucleotide aptamer by HT-SELEX for cancer immunotherapy. *Oncotarget* 7, 4522-4530. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6608>

- Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., Akerley, W., van den Eertwegh, A.J.M., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J.M., Linette, G.P., Hogg, D., Ottensmeier, C.H., Lebbé, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J.I., Wolchok, J.D., Weber, J.S., Tian, J., Yellin, M.J., Nichol, G.M., Hoos, A., Urba, W.J., 2010. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 711-723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>
- Janning, M., Loges, S., 2018. Anti-Angiogenics: Their Value in Lung Cancer Therapy. *Oncol. Res. Treat.* 41, 172-180. <https://doi.org/10.1159/000488119>
- Jiang, T., Zhou, C., Ren, S., 2016. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 5, 1-10. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1163462>
- Kirkpatrick, B.D., McKenzie, R., O'Neill, J.P., Larsson, C.J., Bourgeois, A.L., Shimko, J., Bentley, M., Makin, J., Chatfield, S., Hindle, Z., Fidler, C., Robinson, B.E., Ventrone, C.H., Bansal, N., Carpenter, C.M., Kutzko, D., Hamlet, S., Lapointe, C., Taylor, D.N., 2006. Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhi (Ty2 aroC-ssaV-) M01ZH09, with a defined mutation in the *Salmonella* pathogenicity island 2, as a live, oral typhoid vaccine in human volunteers. *Vaccine* 24, 116-123. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.08.008>
- Koi, M., Carethers, J.M., 2017. The colorectal cancer immune microenvironment and approach to immunotherapies. *Futur. Oncol.* 13, 1633-1647. <https://doi.org/10.2217/fon-2017-0145>
- Kopecko, D.J., Sieber, H., Ures, J.A., Fürer, A., Schlup, J., Knof, U., Collioud, A., Xu, D.Q., Colburn, K., Dietrich, G., 2009. Genetic stability of vaccine strain *Salmonella* Typhi Ty21a over 25 years. *Int. J. Med. Microbiol.* 299, 233-246. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.09.003>
- Kovacevic, K.D., Gilbert, J.C., Jilma, B., 2018. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of aptamers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 134, 36-50. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.10.008>
- Kramer, M.G., Masner, M., Casales, E., Moreno, M., Smerdou, C., Chabalgoity, J.A., 2015. Neoadjuvant administration of Semliki Forest virus expressing interleukin-12 combined with attenuated *Salmonella* eradicates breast cancer metastasis and achieves long-term survival in immunocompetent mice. *BMC Cancer* 15, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1618-x>
- Kuan, Y.D., Lee, C.H., 2016. *Salmonella* overcomes tumor immune tolerance by inhibition of tumor indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 expression. *Oncotarget* 7, 374-385. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.6258>
- Lai, W.Y., Huang, B.T., Wang, J.W., Lin, P.Y., Yang, P.C., 2016. A Novel PD-L1-targeting Antagonistic DNA Aptamer With Antitumor Effects. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 5, e397. <https://doi.org/10.1038/mtna.2016.102>
- Lakhin, A. V., Tarantul, V.Z., Gening, L. V., 2013. Aptamers: problems, solutions and prospects. *Acta Naturae* 5, 34-43.
- Lanzi, A., Pagès, F., Lagorce-Pagès, C., Galon, J., 2020. The consensus immunoscore: toward a new classification of colorectal cancer. *Oncoimmunology* 9, 1-3. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1789032>
- Leach, D.R., Krummel, M.F., Allison, J.P., 1996. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* (80-. ). 271, 1734-1736. <https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1734>

- Lee, C.H., Hsieh, J.L., Wu, C.L., Hsu, P.Y., Shiau, A.L., 2011. T cell augments the antitumor activity of tumor-targeting Salmonella. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1381-1388. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3180-z>
- Lee, C.H., Wu, C.L., Shiau, A.L., 2008. Toll-like receptor 4 mediates an antitumor host response induced by Salmonella choleraesuis. *Clin. Cancer Res.* 14, 1905-1912. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2050>
- Lichtenstern, C.R., Ngu, R.K., Shalpour, S., Karin, M., 2020. Immunotherapy, Inflammation and Colorectal Cancer. *Cells* 9, 1-18. <https://doi.org/10.3390/cells9030618>
- Liu, J., Guo, B., 2020. RNA-based therapeutics for colorectal cancer: Updates and future directions. *Pharmacol. Res.* 152, 104550. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104550>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Low, K.B., Ittensohn, M., Luo, X., Zheng, L.-M., King, I., Pawelek, J.M., Bermudes, D., 2004. Construction of VNP20009: a novel, genetically stable antibiotic-sensitive strain of tumor-targeting Salmonella for parenteral administration in humans. *Methods Mol. Med.* 90, 47-60.
- Luo, X., Li, Z., Lin, S., Le, T., Ittensohn, M., Bermudes, D., Runyab, J.D., Shen, S.Y., Chen, J., King, I.C., Zheng, L.M., 2000. Antitumor effect of VNP20009, an attenuated Salmonella, in murine tumor models. *Oncol. Res.* 12, 501-508. <https://doi.org/10.3727/096504001108747512>
- Ma, H., Liu, J., Ali, M.M., Mahmood, M.A.I., Labanieh, L., Lu, M., Iqbal, S.M., Zhang, Q., Zhao, W., Wan, Y., 2015. Nucleic acid aptamers in cancer research, diagnosis and therapy. *Chem. Soc. Rev.* 44, 1240-1256. <https://doi.org/10.1039/c4cs00357h>
- Maher, J., 2014. Clinical Immunotherapy of B-Cell Malignancy Using CD19-Targeted CAR T-Cells. *Curr. Gene Ther.* 14, 35-43. <https://doi.org/10.2174/1566523213666131223130554>
- Martin, F., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., 2012. Controversies on the role of Th17 in cancer: A TGF- $\beta$ -dependent immunosuppressive activity? *Trends Mol. Med.* 18, 742-749. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.09.007>
- Matsuki, E., Younes, A., 2016. Checkpoint Inhibitors and Other Immune Therapies for Hodgkin and Non-Hodgkin Lymphoma. *Curr. Treat. Options Oncol.* 17, 31. <https://doi.org/10.1007/s11864-016-0401-9>
- Mellman, I., Coukos, G., Dranoff, G., 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480, 480-489. <https://doi.org/10.1038/nature10673>
- Mi, Z., Feng, Z.C., Li, C., Yang, X., Ma, M.T., Rong, P.F., 2019. Salmonella-mediated cancer therapy: An innovative therapeutic strategy. *J. Cancer* 10, 4765-4776. <https://doi.org/10.7150/jca.32650>
- Mishra, H., Mishra, P.K., Ekielski, A., Jaggi, M., Iqbal, Z., Talegaonkar, S., 2018. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 144, 2283-2302. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2726-1>
- Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and

- escape. *Current opinion in immunology*. 2014 Apr 1;27:16-25. *Curr Opin Immunol* 27, 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>.New
- Mónaco, A., 2021. Estudio de los mecanismos celulares y moleculares anti-melanoma inducidos por Salmonella. Tesis Doctorado PEDECIBA. Universidad de la República.
- Mónaco, A., Canales-Huerta, N., Jara-Wilde, J., Härtel, S., Chabalgoity, J.A., Moreno, M., Scavone, P., 2021a. Salmonella Typhimurium Triggers Extracellular Traps Release in Murine Macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.639768>
- Mónaco, A., Chilibroste, S., Yim, L., Chabalgoity, J.A., Moreno, M., 2021b. Inflammasome activation, NLRP3 engagement and macrophage recruitment to tumor microenvironment are all required for Salmonella antitumor effect., *Cancer Immunology, Immunotherapy*.
- Moreira, A., Heinzerling, L., Bhardwaj, N., Friedlander, P., 2021. Current melanoma treatments: Where do we stand? *Cancers (Basel)*. 13, 1-12. <https://doi.org/10.3390/cancers13020221>
- Moreno, M., Kramer, M., Yim, L., Chabalgoity, J., 2010. Salmonella as Live Trojan Horse for Vaccine Development and Cancer Gene Therapy. *Curr. Gene Ther.* 10, 56-76. <https://doi.org/10.2174/156652310790945566>
- Morton, D.L., Malmgren, R.A., Holmes, E.C., Ketcham, A.S., 1968. Demonstration of antibodies against human malignant melanoma by immunofluorescence. *Surgery* 64, 233-40.
- Morton, D.L., Wanek, L., Nizze, J.A., Elashoff, R.M., Wong, J.H., 1991. Improved long-term survival after lymphadenectomy of melanoma metastatic to regional nodes: Analysis of prognostic factors in 1134 patients from the John Wayne Cancer Clinic. *Ann. Surg.* 214, 491-501. <https://doi.org/10.1097/00000658-199110000-00013>
- Morvan, M.G., Lanier, L.L., 2016. NK cells and cancer: You can teach innate cells new tricks. *Nat. Rev. Cancer* 16, 7-19. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.5>
- Murphy, K., Casey, W., 2017. Janeway's Immunobiology, 9th ed.
- Najem, A., Krayem, M., Perdrix, A., Kerger, J., Awada, A., Journe, F., Ghanem, G., 2017. New Drug Combination Strategies in Melanoma: Current Status and Future Directions. *Anticancer Res.* 37. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12041>
- National Cancer Institute, 2019. Cancer Stat Facts: Melanoma of the Skin. [WWW Document]. URL <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>
- Németh, I., Boda, D., 2001. Xanthine oxidase activity and blood glutathione redox ratio in infants and children with septic shock syndrome. *Intensive Care Med.* 27, 216-221. <https://doi.org/10.1007/s001340000791>
- Nestle, F., Kerl, H., 2004. Melanoma, in: *Dermatología*. Elsevier, Madrid, España, pp. 1789-1815.
- Niethammer, A.G., Lubenau, H., Mikus, G., Knebel, P., Hohmann, N., Leowardi, C., Beckhove, P., Akhisaroglu, M., Ge, Y., Springer, M., Grenacher, L., Buchler, M.W., Koch, M., Weitz, J., Haefeli, W.E., Schmitz-Winnenthal, F.H., 2012. Double-blind, placebo-controlled first in human study to investigate an oral

- vaccine aimed to elicit an immune reaction against the VEGF-Receptor 2 in patients with stage IV and locally advanced pancreatic cancer. *BMC Cancer* 12, 361. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-361>
- Ning, Y., Hu, J., Lu, F., 2020. Aptamers used for biosensors and targeted therapy. *Biomed. Pharmacother.* 132, 110902. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110902>
- Olszanski, A.J., 2014. Current and Future Roles of Targeted Therapy and Immunotherapy in Advanced Melanoma. *J. Manag. Care Pharm.* 20, 346-356. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2014.20.4.346>
- Owen, J.A., Punt, J., Stranford, S.A., 2014. *Kuby Inmunología*, 7th ed. McGraw-Hill.
- Pangilinan, C.R., Lee, C.-H., 2019. Salmonella-Based Targeted Cancer Therapy: Updates on A Promising and Innovative Tumor Immunotherapeutic Strategy. *Biomedicines* 7, 36. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7020036>
- Papaioannou, N.E., Beniata, O. V., Vitsos, P., Tsitsilonis, O., Samara, P., 2016. Harnessing the immune system to improve cancer therapy. *Ann. Transl. Med.* 4, 261-261. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.04.01>
- Passarelli, A., Mannavola, F., Stucci, L.S., Tucci, M., Silvestris, F., 2017. Immune system and melanoma biology: A balance between immunosurveillance and immune escape. *Oncotarget* 8, 106132-106142. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22190>
- Pawelek, J.M., Low, K.B., Bermudes, D., 2003. Bacteria as tumour-targeting vectors. *Lancet Oncol.* 4, 548-556. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(03\)01194-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(03)01194-X)
- Pawelek, J.M., Low, K.B., Bermudes, D., 1997. Tumor-targeted salmonella as a novel anti-melanoma vector. *Melanoma Res.* 7, S141. <https://doi.org/10.1097/00008390-199706001-00491>
- Pegram, M.D., Konecny, G., Slamon, D.J., 2000. The Molecular and Cellular Biology of HER2/neu Gene Amplification/Overexpression and the Clinical Development of Herceptin (Trastuzumab) Therapy for Breast Cancer, in: *Advances in Breast Cancer Management*. pp. 57-75. [https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3147-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3147-7_4)
- Plata, M.C., 2021. Puesta a punto de sistemas de depleción celular para su evaluación en el desarrollo de inmunoterapias contra cáncer basadas en Salmonella. Tesina de grado - Licenciatura en Bioquímica. Universidad de la República.
- Prodeus, A., Abdul-Wahid, A., Fischer, N.W., Huang, E.H.B., Cydzik, M., Gariépy, J., 2015. Targeting the PD-1/PD-L1 Immune Evasion Axis With DNA Aptamers as a Novel Therapeutic Strategy for the Treatment of Disseminated Cancers. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 4, e237. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.11>
- Pulendran, B., Dillon, S., Joseph, C., Curiel, T., Banchereau, J., Mohamadzadeh, M., 2004. Dendritic cells generated in the presence of GM-CSF plus IL-15 prime potent CD8+ Tc1 responses in vivo. *Eur. J. Immunol.* 34, 66-73. <https://doi.org/10.1002/eji.200324567>
- Pulliam, S.R., Uzhachenko, R. V, Adunyah, S.E., Shanker, A., 2017. Common Gamma Chain Cytokines in Combinatorial Immune Strategies against Cancer. *Physiol. Behav.* 176, 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Rautela, J., Huntington, N.D., 2017. IL-15 signaling in NK cell cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 44, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.10.004>

- Registro Nacional de Cáncer, Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer, 2021. MELANOMA EN URUGUAY [WWW Document]. URL <https://www.comisioncancer.org.uy/Ocultas/RESUMENES-ESTADISTICOS-Periodo-2012-2016-uc264>
- Riedmann, E.M., 2012. Two years of Provenge. *Hum. Vaccin. Immunother.* 8, 505-505. <https://doi.org/10.4161/hv.20489>
- Robert, C., Schachter, J., Long, G. V., Arance, A., Grob, J.J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C., Lotem, M., Larkin, J., Lorigan, P., Neyns, B., Blank, C.U., Hamid, O., Mateus, C., Shapira-Frommer, R., Kosh, M., Zhou, H., Ibrahim, N., Ebbinghaus, S., Ribas, A., 2015. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 372, 2521-2532. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1503093>
- Ross, J.S., Fletcher, J.A., 1999. The HER-2/neu oncogene: Prognostic factor, predictive factor and target for therapy. *Semin. Cancer Biol.* 9, 125-138. <https://doi.org/10.1006/scbi.1998.0083>
- Ruckman, J., Green, L.S., Beeson, J., Waugh, S., Gillette, W.L., Henninger, D.D., Claesson-Welsh, L., Janjić, N., 1998. 2'-fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165): Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.* 273, 20556-20567. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20556>
- Ruella, M., Kalos, M., 2014. Adoptive immunotherapy for cancer. *Immunol. Rev.* 257, 14-38. <https://doi.org/10.1111/imr.12136>
- Saccheri, F., Pozzi, C., Avogadri, F., Barozzi, S., Faretta, M., Fusi, P., Rescigno, M., 2010. Bacteria-Induced Gap Junctions in Tumors Favor Antigen Cross-Presentation and Antitumor Immunity. *Sci. Transl. Med.* 2. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000739>
- Salles, G., Barrett, M., Foà, R., Maurer, J., O'Brien, S., Valente, N., Wenger, M., Maloney, D.G., 2017. Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Adv. Ther.* 34, 2232-2273. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0612-x>
- Santulli-Marotto, S., Nair, S.K., Rusconi, C., Sullenger, B., Gilboa, E., 2003. Multivalent RNA aptamers that inhibit CTLA-4 and enhance tumor immunity. *Cancer Res.* 63, 7483-9.
- Schreiber, R.D., Old, L.J., Smyth, M.J., 2011. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science (80-. ).* 331, 1565-1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>
- Shah, D.J., Dronca, R.S., 2014. Latest Advances in Chemotherapeutic, Targeted, and Immune Approaches in the Treatment of Metastatic Melanoma. *Mayo Clin. Proc.* 89, 504-519. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2014.02.002>
- Shahabi, V., Maciag, P.C., Rivera, S., Wallecha, A., 2010. Live, attenuated strains of *Listeria* and *Salmonella* as vaccine vectors in cancer treatment. *Bioeng. Bugs* 1, 237-245. <https://doi.org/10.4161/bbug.1.4.11243>
- Sharma, P., Allison, J.P., 2015. Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy: Toward Combination Strategies with Curative Potential. *Cell* 161, 205-214. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.030>

- Sicco, E., Baez, J., Ibarra, M., Fernández, M., Cabral, P., Moreno, M., Cerecetto, H., Calzada, V., 2020. Sgc8-c Aptamer as a Potential Theranostic Agent for Hemato-Oncological Malignancies. *Cancer Biother. Radiopharm.* 35, 262-270. <https://doi.org/10.1089/cbr.2019.3402>
- Sicco, E., Mónaco, A., Fernandez, M., Moreno, M., Calzada, V., Cerecetto, H., 2021. Metastatic and non-metastatic melanoma imaging using Sgc8-c aptamer PTK7-recognizer. *Sci. Rep.* 11, 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98828-6>
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Fedewa, S.A., Ahnen, D.J., Meester, R.G.S., Barzi, A., Jemal, A., 2017. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA. Cancer J. Clin.* 67, 177-193. <https://doi.org/10.3322/caac.21395>
- Soldevilla, M.M., Villanueva, H., Pastor, F., 2016. Aptamers: A Feasible Technology in Cancer Immunotherapy. *J. Immunol. Res.* 2016, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2016/1083738>
- Srivastava, M.K., Zhu, L., Harris-White, M., Kar, U., Huang, M., Johnson, M.F., Lee, J.M., Elashoff, D., Strieter, R., Dubinett, S., Sharma, S., 2012. Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040677>
- Tacket, C.O., Sztein, M.B., Wasserman, S.S., Losonsky, G., Kotloff, K.L., Wyant, T.L., Nataro, J.P., Edelman, R., Perry, J., Bedford, P., Brown, D., Chatfield, S., Dougan, G., Levine, M.M., 2000. Phase 2 clinical trial of attenuated *Salmonella enterica* serovar typhi oral live vector vaccine CVD 908-htrA in U.S. volunteers. *Infect. Immun.* 68, 1196-1201. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1196-1201.2000>
- Tang, H., Qiao, J., Fu, Y.-X., 2016. Immunotherapy and tumor microenvironment. *Cancer Lett.* 370, 85-90. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.009>
- The National Comprehensive Cancer Network, 2020. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology, Colon Cancer. [WWW Document]. [https://doi.org/https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/colopdf.2020](https://doi.org/https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colopdf.2020)
- Thermo-Fisher, n.d. Alexa Fluor™ 647 NHS Ester (Succinimidyl Ester) [WWW Document]. URL <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A20006#/A20006>
- Toyoshima, Y., Kitamura, H., Xiang, H., Ohno, Y., Homma, S., Kawamura, H., Takahashi, N., Kamiyama, T., Tanino, M., Taketomi, A., 2019. IL6 modulates the immune status of the tumor microenvironment to facilitate metastatic colonization of colorectal cancer cells. *Cancer Immunol. Res.* 7, 1944-1957. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0766>
- Tsai, H.F., Hsu, P.N., 2017. Cancer immunotherapy by targeting immune checkpoints: Mechanism of T cell dysfunction in cancer immunity and new therapeutic targets John T Kung. *J. Biomed. Sci.* 24, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0341-0>
- Tuerk, C., Gold, L., 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* (80-. ). 249, 505-510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>
- Van Leeuwen, M.T., Webster, A.C., McCredie, M.R.E., Stewart, J.H., McDonald, S.P., Amin, J., Kaldor, J.M., Chapman, J.R., Vajdic, C., Grulich, A.E., 2010. Effect of reduced immunosuppression after kidney transplant failure on risk of cancer: Population based retrospective cohort study. *BMJ* 340, 463.

<https://doi.org/10.1136/bmj.c570>

- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., Smyth, M.J., 2011. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 235-271.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101324>
- Vola, M., Mónaco, A., Bascuas, T., Rimsky, G., Agorio, C.I., Chabalgoity, J.A., Moreno, M., 2018. TLR7 agonist in combination with Salmonella as an effective antimelanoma immunotherapy. *Immunotherapy* 10, 665-679.  
<https://doi.org/10.2217/imt-2017-0188>
- Waldman, A.D., Fritz, J.M., Lenardo, M.J., 2020. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 651-668.  
<https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>
- Waldmann, T.A., 2006. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: Implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 595-601.  
<https://doi.org/10.1038/nri1901>
- Wang, S., Campos, J., Gallotta, M., Gong, M., Crain, C., Naik, E., Coffman, R.L., Guiducci, C., 2016. Intratumoral injection of a CpG oligonucleotide reverts resistance to PD-1 blockade by expanding multifunctional CD8<sup>+</sup> T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E7240-E7249. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608555113>
- Wei, S.C., Levine, J.H., Cogdill, A.P., Zhao, Y., Anang, N.-A.A.S., Andrews, M.C., Sharma, P., Wang, J., Wargo, J.A., Pe'er, D., Allison, J.P., 2017. Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell* 170, 1120-1133.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.024>
- World Health Organization, 2017. Skin cancers. [WWW Document]. URL [https://www.who.int/news-room/q-a-detail/radiation-ultraviolet-\(uv\)-radiation-and-skin-cancer](https://www.who.int/news-room/q-a-detail/radiation-ultraviolet-(uv)-radiation-and-skin-cancer)
- Wu, J., 2013. IL-15 Agonists: The Cancer Cure Cytokine. *J. Mol. Genet. Med.* 07, 1-6.  
<https://doi.org/10.4172/1747-0862.1000085>
- Zak, K.M., Grudnik, P., Magiera, K., Dömling, A., Dubin, G., Holak, T.A., 2017. Structural Biology of the Immune Checkpoint Receptor PD-1 and Its Ligands PD-L1/PD-L2. *Structure* 25, 1163-1174. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.06.011>
- Zheng, J.H., Min, J.-J., 2016. Targeted Cancer Therapy Using Engineered Salmonella typhimurium. *Chonnam Med. J.* 52, 173.  
<https://doi.org/10.4068/cmj.2016.52.3.173>