

Alternativas de intervención terapéutica en cáncer usando vectores bacterianos vivos atenuados: *Salmonella enterica* como acarreador de moléculas heterólogas

Marco Antonio Hernández-Luna,* Rosendo Luria-Pérez,* Sara Huerta-Yépez*

* Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital Infantil de México Federico Gómez.

***Therapeutic intervention alternatives in cancer,
using attenuated live bacterial vectors: *Salmonella*
enterica as a carrier of heterologous molecules***

ABSTRACT

Salmonella enterica is a facultative anaerobic bacteria, whose ability to colonize antigen-presenting cells (APCs) such as dendritic cells and macrophages, has allowed its successful use as an alive, attenuated bacterial vector for vaccination. *Salmonella enterica* elicits efficient cellular, humoral and mucosal immune responses, against heterologous antigens including viruses, parasites, other bacterial species and tumor-associated antigens, since it is capable of delivering these antigens to cells of the immune system. The extracellular expression of heterologous antigens on the surface of *Salmonella enterica* via its type I, III and V secretion systems, and their delivery into infected cells is essential for its stimulation of immune responses against these antigens. Moreover, *Salmonella enterica* is a promising therapeutic agent against cancer, as demonstrated by reports of pre-clinical and clinical studies indicating that, after systemic administration, *Salmonella enterica* preferentially localizes in solid tumors and metastases as compared to normal tissues. In this review, we focus on novel prophylactic and therapeutic anti-cancer approaches using *Salmonella enterica* as a delivery system of heterologous molecules with the aim of inhibiting tumor growth.

Key words. *Salmonella enterica*. Vaccine. Cancer. Heterologous antigens. Prophylaxis.

RESUMEN

Salmonella enterica es una bacteria anaeróbica facultativa de residencia intracelular, cuyo tropismo por las células presentadoras de antígenos como células dendríticas y macrófagos, ha permitido su empleo exitoso como vector bacteriano vivo atenuado con fines vacunales. La capacidad de *Salmonella enterica* de sintetizar y de mostrar al sistema inmunológico antígenos heterólogos provenientes de virus, parásitos y otras especies bacterianas o antígenos asociados a tumores, ha mostrado inducir una respuesta inmunológica celular, humoral y de mucosas eficiente contra estas moléculas heterólogas. En este proceso, la expresión o la liberación de estos antígenos heterólogos de la superficie de *Salmonella enterica* a través de los sistemas de secreción tipo I, III y V representa un punto clave para la estimulación adecuada de la respuesta inmunológica. Trabajos recientes sugieren que *Salmonella enterica* tiene propiedades importantes para ser considerada como agente terapéutico contra el cáncer. Los estudios pre-clínicos y clínicos sobre los cuales se apoya esta premisa, demuestran que posterior a la administración sistémica de *Salmonella enterica* migra y coloniza en mayor proporción a tumores sólidos y metástasis en comparación al tejido normal. En esta revisión se enumeran diferentes estrategias para la estimulación de la respuesta inmunológica empleando a *Salmonella enterica* como un acarreador de moléculas heterólogas y hacemos un énfasis en su utilidad como acarreador de moléculas profilácticas y/o terapéuticas contra el cáncer.

Palabras clave. *Salmonella enterica*. Vacunas. Cáncer. Antígenos heterólogos. Profilaxis.

VECTORES BACTERIANOS COMO VEHÍCULOS DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HETERÓLOGAS

La creciente necesidad de vehículos especializados para la liberación de moléculas heterólogas en microambientes selectivos, ha permitido que los vectores bacterianos vivos sean considerados desde hace algunos años como alternativas para la liberación selectiva de moléculas con fines profilácticos o terapéuticos.

Bacterias como *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a, *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR y *Mycobacterium bovis* BCG se han aprobado como vacunas para su uso en humanos y actualmente son investigadas como potenciales acarreadores de moléculas heterólogas, entre los que figuran agentes citotóxicos, citocinas, anticuerpos y antígenos pertenecientes a otros microorganismos.¹

Dentro del vasto grupo de vectores bacterianos vivos, *Salmonella enterica* ha recibido una especial atención por su capacidad de acarrear moléculas heterólogas hacia las células presentadoras de antígenos (APC) y a la existencia de un modelo murino, en el cual *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella typhimurium*) simula el proceso de invasión e infección que *Salmonella enterica* serovar Typhi (*Salmonella typhi*) induce en humanos.²

Salmonella enterica como un vehículo de expresión

Salmonella enterica se ha empleado como acarreador de moléculas heterólogas con fines vacunales desde hace más de dos décadas. Uno de los primeros estudios realizados por Poirier, *et al.*, en 1988, demostró que los ratones inmunizados vía oral con la cepa recombinante de *Salmonella enterica*, mutada en la vía de los aminoácidos aromáticos, que expresaba la proteína antigénica M de *Streptococcus pyogenes* en el citoplasma, sobrevivieron al reto con la cepa silvestre de *Streptococcus pyogenes*.³ Estudios posteriores, empleando un modelo murino de listeriosis, revelaron que los antígenos secretados de la superficie de *Salmonella enterica* son mejores inductores de protección que los antígenos expresados en el citosol.⁴

Actualmente se ha confirmado que la localización del antígeno en el vector bacteriano juega un papel muy importante en la inducción de la respuesta inmunológica integral, de tal manera que la expresión de antígenos heterólogos en periplasma, en membrana externa o secretados de la superficie bacteriana, inducen una respuesta inmunológica humoral, celular y de mucosas más eficiente. En el cuadro 1 se resumen algunos trabajos en donde se ha empleado a *Salmonella enterica* como acarreador de moléculas heterólogas.³⁻¹⁶

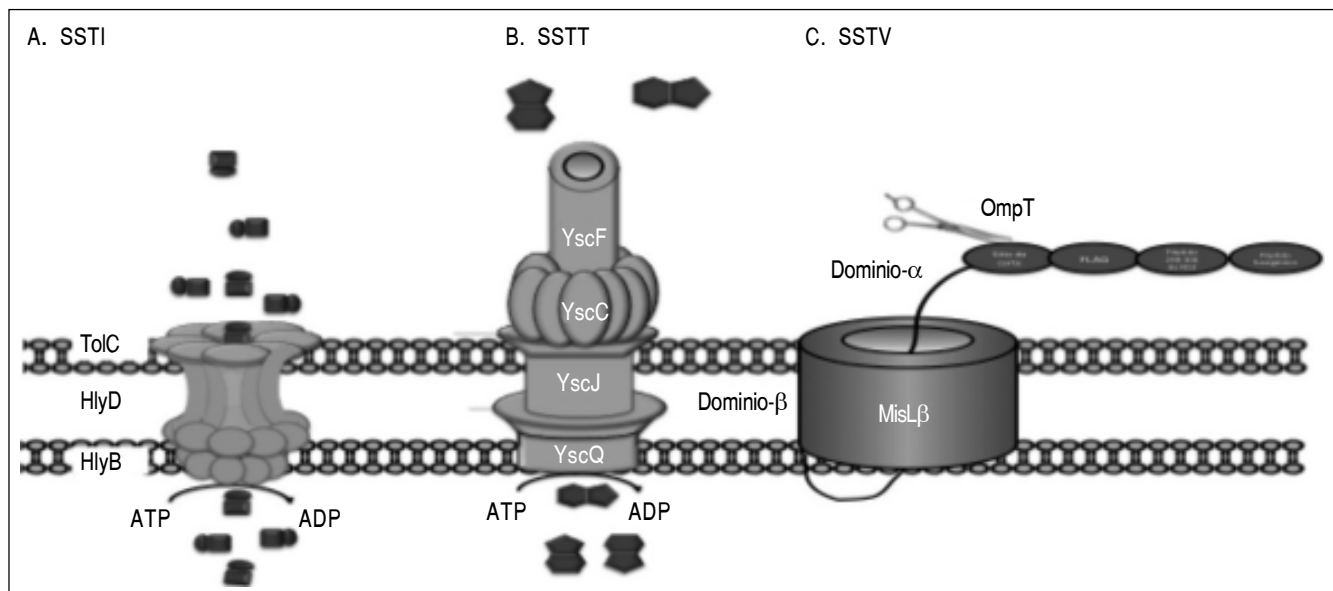


Figura 1. Sistemas de secreción empleados para liberar antígenos heterólogos a través de *Salmonella*. A. Sistema de secreción tipo I (SSTI). El antígeno específico de próstata ■ fusionado al péptido señal de liberación de la proteína HlyA ●, es liberado al medio y captado por las células presentadoras de antígeno. B. Sistema de secreción tipo III (SSTT) empleado para liberar distintos antígenos heterólogos al citosol de las células presentadoras de antígeno. En el esquema se ejemplifica la liberación del antígeno NY-ESO-1 ● fusionado a la proteína de secreción SopE ●. C. Sistema de secreción tipo V empleado para liberar el péptido 298-306 de la proteína NS3 del virus Dengue ● en la célula presentadora de antígeno, una vez que *Salmonella* ha invadido a la célula presentadora de antígeno.

Cuadro 1. *Salmonella enterica* como vehículo de expresión de antígenos heterólogos.

Especie	Mutación	Antígeno heterólogo	Expresión del vector bacteriano	Referencia
<i>Salmonella typhimurium</i> .	aroA.	Proteína M de <i>Streptococcus pyogenes</i> .	Citosol.	3
<i>Salmonella typhimurium</i> .	aroA.	Antígeno p60 de <i>Listeria monocytogenes</i> .	Citosol / Secretado.	4
<i>Salmonella typhimurium</i> .	aroA.	Subunidades de toxina pertussis.	Citosol.	5
<i>Salmonella typhimurium</i> .	aroA.	Proteína ureB de <i>Helicobacter pylori</i> e IL-2.	Vacuola de DNA /	6
		Traducción en célula eucariota.		
<i>Salmonella typhimurium</i> .	aroA.	Antígeno Ag85B y ESAT6 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Vacuola de DNA /	7
		Traducción en célula eucariota.		
<i>Salmonella typhimurium</i> .	aroA.	Subunidad B de la toxina Shiga-like I de <i>Escherichia coli</i> .	SSTI.	8
<i>Salmonella typhi</i> (Ty21a).	galE livD viaB. H2s.	Antígeno protector del Anthrax de <i>Bacillus anthracis</i> .	SSTI.	9
<i>Salmonella typhimurium</i> .	aroA.	Péptido IVNP ⁽³⁶⁶⁻³⁷⁵⁾ del virus de la influenza.	SSTT.	10
<i>Salmonella typhimurium</i> .	ΔphoP233.	Antígenos EAS240 y EAM250 de <i>Eimeria acervulina</i> .	SSTT.	11
	ΔsplP1033::xyl.			
	EΔasdA16.			
<i>Salmonella typhimurium</i> .	aroA.	Antígenos p60 y listerolisina O de <i>Listeria monocytogenes</i> .	SSTT.	12
<i>Salmonella typhimurium</i> .	ΔphoP, ΔphoQ.	Fragmentos de las proteínas Gag, Rev, Tat o NeF del virus de inmunodeficiencia humana.	SSTT.	13
<i>Salmonella typhimurium</i> .	aroA	Epítipo (NANP) ₄ de <i>Plasmodium falciparum</i>	SSTV.	14
<i>Salmonella typhi</i> .	aro C, aroD.			
<i>Salmonella typhimurium</i> .	aroA.	Péptido NS3 ⁽²⁹⁸⁻³⁰⁶⁾ del virus Dengue tipo 2.	SSTV.	15
<i>Salmonella typhimurium</i> .	aroA.	Péptido gp43 ⁽²¹⁰⁻³¹⁹⁾ de <i>Trichinella spiralis</i> .	SSTV.	16

SSTI: sistema de secreción tipo I. SSTT: sistema de secreción tipo III. SSTV: sistema de secreción tipo V.

Debido a que la compartimentalización del antígeno es clave para la inducción de una adecuada respuesta inmunológica, la mayoría de los antígenos heterólogos expresados en *Salmonella enterica* se han acoplado mediante ingeniería genética a proteínas de superficie, o bien, a algunos de los sistemas de secreción descritos para las bacterias Gram negativas.^{17,18} En *Salmonella enterica*, particularmente se han explorado los sistemas de secreción tipo I,^{8,9} el sistema tipo III¹⁰⁻¹³ y el sistema tipo V^{14-16,19} para expresar y liberar moléculas heterólogas. La figura 1 esquematiza los sistemas de secreción tipo I, III y V empleados para la liberación de moléculas heterólogas a través de *Salmonella enterica*.

Vectores bacterianos como agentes antitumorales

Desde que en 1891 William B. Coley reportó la curación de pacientes con sarcoma debido a infecciones severas de erisipela, producido por *Streptococcus pyogenes*,²⁰ se han realizado numerosas investigaciones que han permitido proponer a las bacterias como posibles alternativas terapéuticas en contra del cáncer.²¹ A la fecha se han empleado tres grupos distintos de bacterias como agentes anti-tumorales: en el grupo I se encuentran bacterias que producen ácido láctico del género *Bifidobacterium*; en el grupo II se encuentran bacterias intracelulares del género *Salmonella* y *Listeria* que son anaeróbicas facultativas; mientras que en el grupo III se encuentran bacterias estrictamente anaeróbicas del género *Clostridium*.²²

El género *Bifidobacterium* mostró tener una alta especificidad por el tejido tumoral; sin embargo, el efecto antitumoral en modelos murinos de cáncer de mama y fibrosarcoma no fue muy alentador.^{22,23} El género *Clostridium* ha dado buenos resultados en la reducción del tamaño tumoral; sin embargo, se ha observado que la administración de esporas de *Clostridium* en modelos murinos de cáncer produce una gran toxicidad.^{22,24} Por otra parte, el género *Salmonella* ha mostrado tener una alta especificidad por tejido tumoral,²⁵ incluyendo las metástasis.²⁶ La disponibilidad de una gran variedad de cepas atenuadas de *Salmonella enterica* la han hecho un vector atractivo para el tratamiento del cáncer.¹⁷

Salmonella enterica y su selectividad por tejido tumoral

Salmonella enterica es el vector bacteriano más utilizado como agente terapéutico en modelos murinos de

cáncer, y aunque los mecanismos que explican la selectividad de esta bacteria hacia los tejidos tumorales no son del todo claros, se ha descrito que el microambiente generado por la fisiopatología del tumor (caracterizado por hipoxia, acidez y necrosis) podría contribuir a la proliferación bacteriana en la zona del tumor.²⁷

Al respecto, Kasinskas, *et al.*, empleando un modelo *in vitro* de tumores cilíndricos hecho con células de carcinoma de colon, que mimetiza el microambiente tumoral, así como el gradiente de metabolitos en los tumores humanos,²⁸ reportaron que *Salmonella enterica* migra al tejido tumoral por la atracción de moléculas que estarían actuando como agentes quimiotácticos al unirse a sus respectivos receptores en la bacteria, favoreciendo la colonización del tumor, de tal manera que el receptor de aspartato de *Salmonella enterica* inicia la quimiotaxis de la bacteria hacia la zona tumoral, el receptor de serina inicia la penetración y el receptor de ribosa/galactosa dirige a *Salmonella enterica* hacia la zona de necrosis tumoral.²⁹ También, mostraron que la mutación de proteínas que participan en el proceso de motilidad de la bacteria, como el sistema de dos componentes CheA/CheY, lleva a un menor reclutamiento de la bacteria en tejido tumoral.²⁹ Sin embargo, estos datos son inconsistentes con los hallazgos que Stritzker, *et al.*, reportaron al emplear un modelo murino *in vivo* de cáncer de mama, en donde *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* colonizaron el tejido tumoral, aun cuando no expresaban la proteína CheY y las proteínas involucradas en la motilidad de la bacteria como fliA, fliC y flgE.³⁰ Además, observaron que las cepas de *Salmonella typhimurium* deficientes en las vías metabólicas de la síntesis de aminoácidos aromáticos, disminuían ligeramente la colonización del tejido tumoral en comparación con la bacteria silvestre.³⁰ En respuesta a estas observaciones, Toley, *et al.*, confirmaron recientemente que la motilidad de *Salmonella enterica* es indispensable para una distribución efectiva y acumulación de la bacteria en el tejido tumoral.³¹

***Salmonella enterica* en la terapia antitumoral**

Desde que en 1997 Pawelek, *et al.*, describieron por primera vez que *Salmonella enterica* coloniza y se replica dentro de los tumores implantados en ratones en una relación de 1000:1 con respecto al tejido normal,²⁵ diversos reportes han surgido demostrando que el empleo de cepas atenuadas de *Salmonella enterica* tienen la capacidad de disminuir

el tamaño del tumor en modelos murinos de xenotrasplantes utilizando diversas líneas celulares humanas, entre ellas cáncer de mama y próstata.³²⁻³⁴

Un número importante de estudios refuerzan el empleo de *Salmonella enterica* atenuada como terapia antitumoral; ejemplo de ello son los trabajos descritos con las cepas A1 (deficiente en la síntesis de leucina y arginina) y A1-R (deficiente en la síntesis de leucina y arginina, con mayor capacidad de eliminar células tumorales), que se han empleado en modelos murinos de xenotrasplantes de cáncer de próstata³² y sus metástasis,³³ así como cáncer de mama,³⁴ los resultados muestran que aproximadamente 40% de los animales tratados, erradicaron completamente el tumor y sobrevivieron a largo término. Otro estudio, empleando la cepa A1-R en un modelo murino ortotópico de osteosarcoma humano y sus metástasis a pulmón, mostró que el tratamiento bacteriano fue efectivo en ambos casos en la erradicación del tumor.³⁵

Salmonella enterica atenuada también se ha empleado en estudios clínicos de fase I, ejemplo de ello es la cepa VNP20009 de *Salmonella typhimurium* con mutaciones en los genes msbB (afectan la formación de lípido A, reduciendo la toxicidad asociada al lipopolisacárido) y purI (la hace dependiente de una fuente externa de adenina). Los pacientes con melanoma metastático y carcinoma renal metastático que recibieron dosis de la cepa VNP20009, no presentaron reacciones adversas severas y toleraron altas dosis de la bacteria; no obstante, se observó modesta colonización del tejido tumoral y el efecto antitumoral no fue significativo.³⁶

***Salmonella enterica* como vehículo acarreador de moléculas heterólogas en cáncer**

Los estudios descritos en los párrafos anteriores muestran que *Salmonella enterica* puede llevar a cabo *per se* la disminución de la masa tumoral en modelos murinos de cáncer; sin embargo, la pobre reversión tumoral observada en pacientes con melanoma metastático y carcinoma renal metastático,³⁶ pone de manifiesto la necesidad de mecanismos alternativos para potenciar y asegurar la reversión del tumor. En este contexto, se han reportado diversos trabajos empleando a *Salmonella enterica* como acarreador de moléculas heterólogas. En el caso de los tumores inmunogénicos, se han utilizado algunos antígenos que se sobre-expresan en la célula tumoral con la finalidad de inducir o potenciar la respuesta inmunológica específica en contra del tumor;³⁷⁻³⁹ en el caso de los tumores no inmunogénicos,

Cuadro 2. *Salmonella enterica* en el tratamiento profiláctico y/o terapéutico del cáncer.

Especie	Mutación	Molécula heteróloga	Malignidad tratada	Referencias
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>leu⁻, arg⁻</i>	Ninguna	Cáncer de próstata, cáncer de mama, osteosarcoma	32-35
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>pur^r, msbB⁻</i>	Ninguna	Melanoma	36
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>aroA</i>	Antígeno PSA/SSTI	Cáncer de próstata	37
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>aroA</i>	Antígeno p60 de <i>Listeria monocytogenes</i> / SSTT	Fibrosarcoma	38
<i>Salmonella typhimurium</i>	Δ <i>phoQ</i>	NY-ESO-1 / SSTT	Fibrosarcoma	39
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>pur^r, msbB⁻</i>	LIGHT, IL-18, CCL21, FasL	Cáncer de mama, cáncer de colon	40-43
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>cya⁻, op^r, asd⁻</i>	IL-2	Osteosarcoma	44-45
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>aroA</i>	IL-4, IL-18	Melanoma	46
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>pur^r, msbB⁻</i>	TRAIL	Cáncer gástrico	47
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>aroA</i>	siRNA vs. MDR	Carcinoma de células escamosas de lengua	57
<i>Salmonella typhimurium</i>	Δ <i>phoP</i> , Δ <i>phoQ</i>	siRNA vs. STAT3	Cáncer de próstata	58
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>aroA</i>	siRNA vs. Bcl-2	Melanoma	59
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>aroA</i>	siRNA vs. CTNNB1 (β -catenina)	Cáncer de colon	60

se han expresado moléculas inmunomoduladoras en *Salmonella enterica* que inducen a la célula tumoral a morir por apoptosis,⁴⁰⁻⁴⁷ esta estrategia también se ha aplicado en los tumores inmunogénicos. El cuadro 2 resume algunos de los trabajos en los cuales se ha empleado a *Salmonella enterica* para el tratamiento del cáncer.

***Salmonella enterica* y profilaxis en cáncer**

Diferentes grupos de investigación han evaluado la liberación de antígenos heterólogos por *Salmonella enterica*, utilizando los sistemas de secreción I y III para inducir una respuesta inmunológica en contra de algún antígeno asociado a tumores (TAA) o algún antígeno específico de tumores (TSA).

Por ejemplo, Fensterle, *et al.*, llevaron a cabo la liberación del antígeno específico de próstata (PSA) a través del sistema de HlyA (sistema de secreción tipo I) para inducir una respuesta inmunológica contra este antígeno. Sus resultados mostraron que en los ratones inmunizados con *Salmonella enterica* que expresaban el antígeno PSA, se indujo la activación de linfocitos T CD8+ y esta activación evitó el desarrollo del tumor.³⁷

De igual forma, el sistema de secreción tipo III (SSTT) se ha empleado para liberar antígenos que lleven a la inducción de una respuesta inmunológica protectora contra el desarrollo del tumor, como lo mostraron Panthel, *et al.*, empleando un modelo murino de fibrosarcoma, en el que las células tumorales fueron previamente transfectadas con un plásmido para expresar el péptido 217-225 de la proteína p60 de *Listeria monocytogenes*, simulando un antígeno tumoral.³⁸ Los estudios *in vivo* demostraron que 80% de los ratones inmunizados con *Salmonella typhimurium*, expresando el antígeno p60 a través del SSTT, fueron protegidos ante el reto de células tumorales de fibrosarcoma que expresaban el péptido p60₂₁₇₋₂₂₅. En los ratones que resistieron el reto de fibrosarcoma, se observó una respuesta de linfocitos T CD8+ que evitó el desarrollo del tumor en comparación con aquellos ratones que no fueron inmunizados, demostrando así que el efecto antitumoral fue antígeno-específico.³⁸ En el mismo contexto, Nishikawa, *et al.*, construyeron una cepa de *Salmonella enterica* que liberaba el antígeno tumoral NY-ESO-1 (proteína de células germinales que se encuentra sobre-expresada en cáncer de pulmón, melanoma, esófago, ovario, vejiga y próstata) a través del SSTT. La administración oral de *Salmonella enterica*, expresando la proteína NY-ESO-1, indujo

la regresión del tumor en un modelo murino de fibrosarcoma previamente establecido, y la regresión tumoral fue mediada por linfocitos CD8+ contra el antígeno NY-ESO-1.³⁹

***Salmonella enterica* y terapia inmunomoduladora en cáncer**

Aunque el empleo de *Salmonella enterica* como acarreador de antígenos tumorales para la inducción de una respuesta inmunológica específica contra estos antígenos ha dado buenos resultados, logrando la activación de linfocitos T CD4+ y CD8+ en modelos murinos, esta estrategia podría ser poco eficaz en aquellos tumores que carecen o que han perdido la expresión de los TAA/TSA, además, la efectividad del tratamiento estaría limitado a tumores que sobre-expresen el mismo TAA/TSA.¹⁷

Tratar de solucionar la limitación de la inducción de la respuesta inmunológica para aquellas neoplasias en donde las células tumorales no expresan TAA/TSA, ha sido la premisa de diversos grupos de trabajo que han ideado estrategias de eliminación del tumor mediante el uso de moléculas con actividades citotóxicas más generales, como es el caso de la expresión de moléculas que modulan la respuesta inmunológica en el huésped a través de su expresión en *Salmonella enterica* y que coadyuvan en el proceso de eliminación del tumor.

Loeffler, *et al.*, utilizando a *Salmonella enterica* para expresar moléculas inmunomoduladoras como la citocina LIGHT,⁴⁰ la interleucina-18 (IL-18),⁴¹ la quimiocina CCL21,⁴² y el ligando de muerte FasL,⁴³ han revertido el crecimiento de los tumores primarios y sus metástasis a pulmón en modelos murinos de carcinoma de mama y colon. En estos trabajos, las proteínas fueron acopladas a un péptido señal para garantizar su secreción de la superficie de *Salmonella enterica*; una vez en el microambiente tumoral, estas moléculas sirvieron como quimioatrayentes de células de la respuesta inmunológica como células dendríticas, macrófagos, linfocitos, células NKs (asesinas naturales) y neutrófilos.

Sorenson, *et al.*, describieron que una sola dosis oral de *Salmonella typhimurium* que expresa a la interleucina-2 (IL-2) humana, evitó la formación de metástasis pulmonares en un modelo murino de osteosarcoma; en este proceso las células NK fueron las probables responsables de la regresión tumoral.^{44,45} En este mismo contexto los trabajos de Agorio, *et al.*, demostraron que una sola dosis de la cepa de *Salmonella enterica* que lleva un plásmido que codifica para interleucina-4 (IL-4) o IL-18, retardó el

crecimiento tumoral y prolongó la sobrevivencia de ratones con melanoma. En cualquiera de los casos, el efecto anti-tumoral estuvo acompañado con un aumento sistémico de interferón gamma (IFN γ).⁴⁶ Otro trabajo reciente, en donde se empleó a *Salmonella enterica* como acarreador de un plásmido que codifica para el ligando de muerte TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) indujo una significativa regresión del tumor en un modelo murino de cáncer gástrico.⁴⁷

Considerando que los estudios de pacientes con cáncer, en donde se empleó por primera vez a *Salmonella enterica* atenuada para inducir la regresión tumoral, no tuvo efecto estadísticamente significativo,³⁶ resulta alentador que la expresión de antígenos tumorales o moléculas tumorocidas a través de este vector bacteriano vivo atenuado contribuya a la eliminación del tumor en ensayos clínicos.

En un intento por mejorar el efecto terapéutico de *Salmonella typhimurium* cepa VNP20009, Nemunaitis, *et al.*, insertaron en esta cepa el gen de la enzima citosina deaminasa de *Escherichia coli*; esta enzima se encarga de convertir a la 5-fluorocitosina en 5-fluorouracilo, un antimetabolito citotóxico empleado en los tratamientos de cáncer gástrico, mama, próstata, cáncer de cabeza y cuello.⁴⁸ Con esta nueva cepa recombinante se realizó un ensayo clínico piloto que incluyó tres pacientes con cáncer refractario (uno con cáncer de cabeza y cuello y dos con cáncer de esófago), los resultados mostraron que la cepa VNP20009 colonizó el tejido tumoral en dos de los pacientes, y además se observó la actividad de la enzima citosina deaminasa, al medir la concentración del 5 fluorouracilo en el tejido tumoral.⁴⁸ Este trabajo confirma la capacidad de *Salmonella enterica* de colonizar tejido tumoral en humanos y su utilidad como acarreador de moléculas heterólogas con actividad antitumoral.

Cabe mencionar que en la India, cepas de *Salmonella typhi* y *Salmonella typhimurium*, que expresan proteínas del core del virus de papiloma humano VPH-16, están en proceso de ser patentadas y de iniciar ensayos de fase clínica para el tratamiento de cáncer de cérvix,⁴⁹ lo que reforzará el número de estudios clínicos en humanos en donde se emplea a *Salmonella enterica* como agente profiláctico o terapéutico contra el cáncer.

***Salmonella enterica* y silenciamiento génico (siRNA) en cáncer**

Los RNAs pequeños de interferencia (siRNA) se han convertido en una herramienta novedosa para

el silenciamiento de genes a nivel postranscripcional,^{50,51} y se han empleado exitosamente para el silenciamiento de distintos genes implicados en cáncer. Sin embargo, la necesidad de un vector para acarrear y liberar las moléculas de siRNA en el microambiente tumoral es aún motivo de estudio.⁵² En este contexto, *Salmonella enterica* ha demostrado ser un vector eficiente para transferir DNA plasmídico al interior de células eucariotas,^{53,54} induciendo efecto antitumoral en modelos murinos de melanoma, hepatoma y cáncer de vejiga.^{55,56}

Trabajos recientes han documentado que *Salmonella enterica* es capaz de infectar distintas líneas celulares de cáncer como próstata, melanoma y colon, entre otros, y una vez que se encuentra en el interior de la célula tumoral, *Salmonella enterica* puede llevar a cabo la liberación de plásmidos que codifican para siRNAs. De esta forma se ha logrado el silenciamiento de proteínas como: gp-170 codificada por el gen MDR (Multi-drug resistance), cuya expresión está asociada a quimiorresistencia, estos ensayos fueron realizados con una línea celular de carcinoma de células escamosas de lengua;⁵⁷ el silenciamiento del factor transcripcional STAT-3, molécula asociada a la supervivencia de las células tumorales, en una línea celular de cáncer de próstata;⁵⁸ el silenciamiento de la proteína anti-apoptóticas Bcl-2, en una línea celular de melanoma⁵⁹ y el silenciamiento del oncogen CTNNB1 que codifica para β catenina en una línea celular de cáncer de colon.⁶⁰ En todos los casos, la liberación de los siRNAs mediada a través de *Salmonella enterica* en los diferentes modelos murinos de cáncer, indujo la regresión del tumor.

Aunque las evidencias son claras sobre la utilidad de emplear a *Salmonella enterica* como un acarreador de siRNAs, aún existen varias incógnitas que requieren mayor estudio; tal es el caso del esclarecimiento del método de liberación de estos plásmidos. Algunos reportes sugieren que la liberación de estos plásmidos puede ser más eficiente si son acoplados al sistema de secreción tipo I;^{60,61} sin embargo, a la fecha no existe ningún reporte que demuestre la liberación natural de material genético mediada por *Salmonella enterica*.

CONCLUSIONES

Como se describió en esta revisión, diversos trabajos avalan la utilidad de *Salmonella enterica* serovar *Typhi* o *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* como vectores bacterianos vivos versátiles, para acarrear moléculas heterólogas capaces de inducir una respuesta profiláctica o terapéutica en

distintos modelos murinos de cáncer. El tropismo de *Salmonella enterica* por las APCs, por el microambiente del tejido tumoral y por las metástasis permiten inducir y mantener la regresión tumoral, ya sea por el reclutamiento de células de la respuesta inmunológica, o bien, por la expresión de moléculas antigénicas o inmunomoduladoras capaces de condicionar a la célula tumoral a morir por apoptosis.

Sin embargo, aún existen algunos desafíos que deben considerarse durante el empleo de *Salmonella enterica* como el vector bacteriano de excelencia para el tratamiento del cáncer. Algunos de estos desafíos contemplan:

- Aumentar la capacidad de *Salmonella enterica* para infectar a la célula tumoral. Si bien es cierto que se ha demostrado que *Salmonella enterica* se encuentra en mayor proporción en tejido tumoral y que coloniza las metástasis de manera selectiva, pocos estudios han hecho referencia a que esta bacteria se encuentre en el interior de las células tumorales. Datos indirectos sugieren que esto puede estar ocurriendo al liberar los plásmidos que codifican para siRNAs, a través de *Salmonella enterica*, en el cual es necesario que los siRNAs sean liberados en el interior de la célula tumoral para ejercer su actividad. En este contexto, una estrategia interesante a evaluar es la liberación de moléculas heterólogas acopladas a péptidos fusogénicos que desestabilizan membranas, a través de los sistemas de secreción bacterianos, lo que le permitiría a la molécula heteróloga alcanzar su blanco dentro de la célula tumoral, independientemente de que *Salmonella enterica* se encuentre dentro o fuera de la célula tumoral.
- Desarrollo de cepas seguras de *Salmonella enterica* para el empleo en humanos y principalmente en pacientes con cáncer, los cuales están inmunosuprimidos. Se ha demostrado que el empleo de las diversas cepas atenuadas de *Salmonella enterica* en modelos murinos de xenotransplantes no sólo han inducido la regresión del tumor, sino que además su uso no causa gran toxicidad ni la muerte en los modelos de ratones desnudos (inmunodeficientes). Sin embargo, sólo la cepa VNP20009 de *Salmonella enterica* ha sido probada en estudios clínicos de fase I, y mostró ser segura y bien tolerada por los pacientes con melanoma y carcinoma renal. Es deseable desarrollar mejores cepas atenuadas para que sean aprobadas para su uso en humanos. Una alternativa a corto plazo a este problema podría ser el empleo

de las cepas atenuadas que ya han sido aprobadas para su uso seguro en humanos, como la cepa vacunal Ty21a de *Salmonella typhi*, que próximamente será evaluada en ensayos de fase clínica I por un grupo de la India que ha propuesto emplear esta cepa para expresar antígenos del HPV con fines vacunales para el combate de cáncer de cérvix.

Finalmente, considerando que el cáncer es un problema de salud pública, que requiere de acciones inmediatas que repercutan en el desarrollo de nuevas y mejores alternativas terapéuticas para su tratamiento, y con base en los trabajos descritos en los párrafos anteriores, nos permitimos concluir que *Salmonella enterica* es un acarreador versátil de moléculas heterólogas con un gran potencial para ser utilizado en el tratamiento del cáncer.

REFERENCIAS

- Kotton CN, Hohmann EL. Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery. *Infection and immunity* 2004; 72: 5535-47.
- Mittrucker HW, Kaufmann SH. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 457-63.
- Poirier TP, Kehoe MA, Beachey EH. Protective immunity evoked by oral administration of attenuated aroA *Salmonella typhimurium* expressing cloned streptococcal M protein. *J Exp Med* 1988; 168: 25-32.
- Hess J, et al. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93: 1458-63.
- Dalla Pozza T, Yan H, Meek D, Guzman CA, Walker MJ. Construction and characterisation of *Salmonella typhimurium* aroA simultaneously expressing the five pertussis toxin subunits. *Vaccine* 1998; 16: 522-9.
- Xu C, et al. Construction of recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* DNA vaccine expressing *H pylori* ureB and IL-2. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 939-44.
- Wang QL, et al. An attenuated *Salmonella*-vectored vaccine elicits protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 2009; 27: 6712-22.
- Tzschaschel BD, Guzman CA, Timmis KN, De Lorenzo V. An *Escherichia coli* hemolysin transport system-based vector for the export of polypeptides: export of Shiga-like toxin IIeB subunit by *Salmonella typhimurium* aroA. *Nature biotechnology* 1996; 14: 765-9.
- Osorio M, et al. Anthrax protective antigen delivered by *Salmonella enterica* serovar Typhi Ty21a protects mice from a lethal anthrax spore challenge. *Infection and immunity* 2009; 77: 1475-82.
- Russmann H, et al. Delivery of epitopes by the *Salmonella* type III secretion system for vaccine development. *Science* 1998; 281: 565-8.
- Konjufca V, Wanda SY, Jenkins MC, Curtiss R 3rd. A recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine encoding *Eimeria acervulina* antigen offers protection against *E. acervulina* challenge. *Infection and immunity* 2006; 74: 6785-96.
- Russmann H, et al. Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant *Salmonella* expressing hybrid *Yersinia* type III proteins. *J Immunol* 2001; 167: 357-65.
- Chen LM, Briones G, Donis RO, Galan JE. Optimization of the delivery of heterologous proteins by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III secretion system for vaccine development. *Infection and immunity* 2006; 74: 5826-33.
- Ruiz-Perez F, et al. Expression of the *Plasmodium falciparum* Immunodominant Epitope (NANP)4 on the Surface of *Salmonella enterica* Using the Autotransporter MisL. *Infection and immunity* 2002; 70: 3611-20.
- Luria-Perez R, et al. A fusogenic peptide expressed on the surface of *Salmonella enterica* elicits CTL responses to a dengue virus epitope. *Vaccine* 2007; 25: 5071-85.
- Pompa-Mera EN, et al. *Trichinella spiralis*: intranasal immunization with attenuated *Salmonella enterica* carrying a gp43 antigen-derived 30mer epitope elicits protection in BALB/c mice. *Experimental parasitology* 2011; 129: 393-401.
- Moreno M, Kramer MG, Yim L, Chabalgoity JA. *Salmonella* as live trojan horse for vaccine development and cancer gene therapy. *Current Gene Therapy* 2010; 10: 56-76.
- Holland IB. The extraordinary diversity of bacterial protein secretion mechanisms. *Methods Mol Biol* 2010; 619: 1-20.
- Ruiz-Olvera P, et al. Display and release of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein using the autotransporter MisL of *Salmonella enterica*. *Plasmid* 2003; 50: 12-27.
- Coley WB II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Annals of Surgery* 1891; 14: 199-220.
- Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Bacteria as tumour-targeting vectors. *The Lancet Oncology* 2003; 4: 548-56.
- Wei MQ, et al. Facultative or obligate anaerobic bacteria have the potential for multimodality therapy of solid tumours. *Eur J Cancer* 2007; 43: 490-6.
- Kimura NT, Taniguchi S, Aoki K, Baba T. Selective localization and growth of *Bifidobacterium bifidum* in mouse tumors following intravenous administration. *Cancer research* 1980; 40: 2061-8.
- Dang LH, Bettgowda C, Huso DL, Kinzler KW, Vogelstein B. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 15155-60.
- Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. *Cancer research* 1997; 57: 4537-44.
- Ganai S, Arenas RB, Sauer JP, Bentley B, Forbes NS. In tumors *Salmonella* migrate away from vasculature toward the transition zone and induce apoptosis. *Cancer Gene Ther* 2011; 18: 457-66.
- Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* 2010; 10: 785-94.
- Kasinskas RW, Forbes NS. *Salmonella typhimurium* specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue in vitro. *Biotechnol Bioeng* 2006; 94: 710-21.
- Kasinskas RW, Forbes NS. *Salmonella typhimurium* lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis. *Cancer research* 2007; 67: 3201-09.
- Stritzker J, et al. Enterobacterial tumor colonization in mice depends on bacterial metabolism and macrophages but is independent of chemotaxis and motility. *International journal of medical microbiology: IJMM* 2010; 300: 449-56.
- Toley BJ, Forbes NS. Motility is critical for effective distribution and accumulation of bacteria in tumor tissue. *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro* 2012; 4: 165-76.
- Zhao M, et al. Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 755-60.
- Zhao M, et al. Monotherapy with a tumor-targeting mutant of *Salmonella typhimurium* cures orthotopic metastatic mouse

- models of human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 10170-4.
34. Zhao M. et al. Targeted therapy with a Salmonella typhimurium leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice. *Cancer Research* 2006; 66: 7647-52.
 35. Hayashi K, et al. Systemic targeting of primary bone tumor and lung metastasis of high-grade osteosarcoma in nude mice with a tumor-selective strain of Salmonella typhimurium. *Cell Cycle* 2009; 8, 870-5.
 36. Toso JF, et al. Phase I study of the intravenous administration of attenuated Salmonella typhimurium to patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 142-52.
 37. Fensterle J, et al. Cancer immunotherapy based on recombinant Salmonella enterica serovar Typhimurium aroA strains secreting prostate-specific antigen and cholera toxin subunit B. *Cancer gene therapy* 2008; 15: 85-93.
 38. Panthel K, et al. Prophylactic anti-tumor immunity against a murine fibrosarcoma triggered by the Salmonella type III secretion system. *Microbes and infection/Institut Pasteur* 2006; 8: 2539-46.
 39. Nishikawa H. et al. In vivo antigen delivery by a Salmonella typhimurium type III secretion system for therapeutic cancer vaccines. *J Clin Invest* 2006; 116: 1946-54.
 40. Loeffler M, Le'Negrate G, Krajewska M, Reed JC. Attenuated Salmonella engineered to produce human cytokine LIGHT inhibit tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 12879-83.
 41. Loeffler M, Le'Negrate G, Krajewska M, Reed JC. IL-18-producing Salmonella inhibit tumor growth. *Cancer gene therapy* 2008; 15: 787-94.
 42. Loeffler M, Le'Negrate G, Krajewska M, Reed JC. Salmonella typhimurium engineered to produce CCL21 inhibit tumor growth. *Cancer immunology, immunotherapy: CII* 2009; 58: 769-75.
 43. Loeffler M, Le'Negrate G, Krajewska M, Reed JC. Inhibition of tumor growth using salmonella expressing Fas ligand. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 1113-6.
 44. Sorenson BS, Banton KL, Frykman NL, Leonard AS, Saltzman DA. Attenuated Salmonella typhimurium with IL-2 gene reduces pulmonary metastases in murine osteosarcoma. *Clinical orthopaedics and related research* 2008; 466: 1285-91.
 45. Sorenson BS, Banton KL, Frykman NL, Leonard AS, Saltzman DA. Attenuated Salmonella typhimurium with interleukin 2 gene prevents the establishment of pulmonary metastases in a model of osteosarcoma. *J Pediatr Surg* 2008; 43: 1153-8.
 46. Agorio C, et al. Live attenuated Salmonella as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma. *J Gene Med* 2007; 9: 416-23.
 47. Cao HD, et al. Attenuated Salmonella typhimurium carrying TRAIL and VP3 genes inhibits the growth of gastric cancer cells in vitro and in vivo. *Tumori* 2010; 96: 296-303.
 48. Nemunaitis J, et al. Pilot trial of genetically modified, attenuated Salmonella expressing the E. coli cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. *Cancer gene therapy* 2003; 10: 737-44.
 49. Padmanabhan S, Amin T, Sampat B, Cook-Deegan R, Chandrasekharan S. Intellectual property, technology transfer and manufacture of low-cost HPV vaccines in India. *Nature biotechnology* 2010; 28: 671-8.
 50. Stevenson M. Therapeutic potential of RNA interference. *N Engl J Med* 2004; 351: 1772-7.
 51. Snead NM, Rossi JJ. RNA interference trigger variants: getting the most out of RNA for RNA interference-based therapeutics. *Nucleic acid therapeutics* 2012; 22: 139-46.
 52. Bora RS, Gupta D, Mukkur TK, Saini KS. RNA interference therapeutics for cancer: Challenges and opportunities (Review). *Molecular medicine reports* 2012; 6: 9-15.
 53. Darji A, et al. Oral somatic transgene vaccination using attenuated S. typhimurium. *Cell* 1997; 91, 765-75.
 54. Weiss S, Chakraborty T. Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian host cells by bacterial carriers. *Current opinion in biotechnology* 2001; 12: 467-72.
 55. Lee CH, Wu CL, Shiau AL. Endostatin gene therapy delivered by Salmonella choleraesuis in murine tumor models. *J Gene Med* 2004; 6: 1382-93.
 56. Lee CH, Wu CL, Shiau AL. Systemic administration of attenuated Salmonella choleraesuis carrying thrombospondin-1 gene leads to tumor-specific transgene expression, delayed tumor growth and prolonged survival in the murine melanoma model. *Cancer gene therapy* 2005; 12: 175-84.
 57. Jiang Z, et al. Using attenuated Salmonella typhi as tumor targeting vector for MDR1 siRNA delivery. *Cancer biology & therapy* 2007; 6: 555-60.
 58. Zhang L, et al. Intratumoral delivery and suppression of prostate tumor growth by attenuated Salmonella enterica serovar typhimurium carrying plasmid-based small interfering RNAs. *Cancer research* 2007; 67: 5859-64.
 59. Yang N, Zhu X, Chen L, Li S, Ren D. Oral administration of attenuated S. typhimurium carrying shRNA-expressing vectors as a cancer therapeutic. *Cancer biology & therapy* 2008; 7: 145-51.
 60. Guo H, et al. Targeting tumor gene by shRNA-expressing Salmonella-mediated RNAi. *Gene therapy* 2011; 18: 95-105.
 61. Xiang S, Fruehauf J, Li CJ. Short hairpin RNA-expressing bacteria elicit RNA interference in mammals. *Nature biotechnology* 2006; 24: 697-702.

Reimpresos:

Dr. Rosendo Luria-Pérez

Unidad de Investigación en
Enfermedades Oncológicas
Hospital Infantil de México Federico Gómez
Dr. Márquez, Núm. 162
Col. Doctores
06720, México, D.F.
Tel.: 5220-9917, Ext. 2129
Correo electrónico: rluria77@gmail.com

Recibido el 18 de agosto 2011.
Aceptado el 24 de octubre 2012.