



# Boletín Médico del Hospital Infantil de México

[www.elsevier.es/bmhim](http://www.elsevier.es/bmhim)



## ARTÍCULO DE REVISIÓN

# *Salmonella enterica*: un aliado en la terapia contra el cáncer



Hilda Chávez-Navarro, Daniel Dimitri Hernández-Cueto, Ariel Vilchis-Estrada,  
David César Bermúdez-Pulido, Gabriela Antonio-Andrés y Rosendo Luria-Pérez\*

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

Recibido el 15 de octubre de 2014; aceptado el 3 de febrero de 2015

### PALABRAS CLAVE

*Salmonella enterica*;  
Inmunoterapia;  
Cáncer

**Resumen** *Salmonella enterica* es una especie de bacterias anaeróbicas facultativas que han sido empleadas con gran éxito como vector bacteriano vivo atenuado con fines vacunales. Recientemente se ha documentado que *S. enterica* tiene propiedades importantes para ser considerada como agente terapéutico contra el cáncer. Estudios preclínicos y clínicos han demostrado que *S. enterica* coloniza tumores sólidos, semisólidos y metástasis, además de que contribuye a disminuir la resistencia a los tratamientos. En esta revisión se aborda la capacidad de *S. enterica* atenuada para eliminar células tumorales y su empleo como vector bacteriano vivo acarreador de moléculas heterólogas contra el cáncer.

© 2014 Hospital Infantil de México Federico Gómez. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### KEYWORDS

*Salmonella enterica*;  
Immunotherapy;  
Cancer

### *Salmonella enterica*: an ally in the therapy of cancer

**Abstract** *Salmonella enterica*, a species of facultative anaerobic bacteria, has demonstrated success as a live-attenuated bacterial vector for vaccination. *S. enterica* has also demonstrated promise as a therapeutic agent against cancer. Pre-clinical and clinical trials have shown that *S. enterica* is localized in both solid and semi-solid tumors as well as in metastatic tumors. Moreover, *S. enterica* reduces resistance to treatment with other agents. In this review we present the novel therapeutic anti-cancer approaches that use *S. enterica* both for its ability as a delivery system for heterologous moieties against cancer and for its direct anti-cancer properties.

© 2014 Hospital Infantil de México Federico Gómez. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: [rluria@himfg.edu.mx](mailto:rluria@himfg.edu.mx), [rluria77@gmail.com](mailto:rluria77@gmail.com) (R. Luria-Pérez).

## 1. Introducción

El cáncer constituye uno de los principales retos de salud pública en el mundo, y aunque se han realizado grandes progresos con los tratamientos, los problemas relacionados con la eliminación de metástasis, los efectos adversos y la resistencia a los tratamientos hacen necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas con mayor efectividad y selectividad por las células alteradas o el microambiente tumoral<sup>1-5</sup>. Una alternativa para la solución a estos problemas es el empleo de vectores bacterianos vivos atenuados como agentes antitumorales o acarreadores de moléculas con actividad antitumoral<sup>6-8</sup>.

### 1.1. Vectores bacterianos en la terapia antitumoral

La propuesta de emplear bacterias como agentes antitumorales fue documentada desde 1868 por W. Busch, al observar que el sarcoma de una paciente disminuyó al adquirir un proceso de erisipela<sup>9</sup>. Esta observación fue retomada 30 años después por William B. Coley<sup>10</sup> y Friedrich Fehleisen. Este último describió que el agente causante de la erisipela era el *Streptococcus pyogenes*<sup>9</sup>. Las observaciones de W. Coley sobre la recuperación de pacientes con cáncer después de una infección por erisipela lo llevaron a desarrollar una vacuna denominada toxina de Coley, compuesta por *Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens*, para tratar pacientes con sarcomas, carcinomas, linfomas, melanomas y mielomas<sup>9-11</sup>. Esta toxina perdió importancia debido a los avances de la radioterapia y la quimioterapia.

El principio antitumoral de las bacterias fue retomado en 1935 por Holmgren, quien reportó que la cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, el Bacillus Calmette-Guérin (BCG), tenía actividad antitumoral<sup>12</sup>. Esta actividad antitumoral podría explicar la observación de Rosenthal sobre la baja incidencia de leucemia en los neonatos inmunizados con BCG<sup>13</sup>. Estudios posteriores permitieron que, desde 1976, BCG sea aplicada vía intravesical como inmunoterapia para reducir la recurrencia y la progresión del carcinoma de vejiga de células transicionales superficiales<sup>5,13,14</sup>.

Recientemente se han propuesto tres grupos distintos de bacterias con actividad antitumoral como resultado de su habilidad de tolerar el oxígeno, el cual se encuentra en concentraciones muy bajas en el microambiente tumoral. En el grupo I se encuentran bacterias estrictamente anaeróbicas del género *Bifidobacterium* (que producen ácido láctico); en el grupo II se encuentran bacterias intracelulares de los géneros *Salmonella* y *Listeria* (que son anaeróbicas facultativas); por último, en el grupo III se encuentran bacterias estrictamente anaeróbicas del género *Clostridium* (formadoras de esporas).<sup>3</sup>

Dentro de estos grupos de bacterias, *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), que infecta al humano, y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), que infecta al ratón y al humano, han llamado la atención por la disponibilidad de cepas atenuadas con baja toxicidad<sup>15</sup> y por su alta especificidad por el tejido tumoral,<sup>16,17</sup> incluyendo las metástasis<sup>18</sup>.

## 2. *Salmonella enterica* y su selectividad por el microambiente tumoral

Actualmente, *S. enterica* es el vector bacteriano más utilizado como agente terapéutico en modelos preclínicos de cáncer. Sin embargo, los mecanismos que explican la selectividad de esta bacteria hacia los tejidos tumorales no son muy claros. Se ha descrito que el microambiente generado por la fisiopatología del tumor, caracterizado por hipoxia (a concentraciones de oxígeno  $\leq 10$  mmHg comparadas con el tejido normal de 50-60 mmHg)<sup>3</sup>, acidez (originada como consecuencia del ácido láctico, producto del metabolismo anaeróbico inducido por la disminución de oxígeno) y necrosis (resultado de la muerte de células tumorales por falta de nutrientes y crecimiento descontrolado), podrían contribuir a la proliferación bacteriana en el microambiente tumoral<sup>6</sup>.

Estudios *in vitro* realizados por Kasinskas y Forbes, donde se mimetizó el microambiente tumoral de células de carcinoma de colon y el gradiente de metabolitos en los tumores humanos, han demostrado que *S. 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<sup>19</sup>. De esta manera, el receptor de aspartato en *S. 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 *S. enterica* hacia la zona de necrosis tumoral<sup>20</sup>. En este proceso, la motilidad de la bacteria mediada por moléculas como CheA/CheY es indispensable para la distribución efectiva y para el reclutamiento de la bacteria en el tejido tumoral<sup>20-22</sup>. Sin embargo, estos hallazgos han sido confrontados recientemente con los estudios *in vivo* realizados por Crull y colaboradores en un modelo murino de carcinoma de colon. Estos demuestran que la invasión y la colonización del tumor por *S. Typhimurium* es independiente de las islas de patogenicidad tipo I y tipo II, e incluso independiente de la motilidad y de la respuesta quimiotáctica. Sus resultados también sugieren que la colonización y la actividad antitumoral se ven afectadas por la vía de administración, resultando la vía intravenosa y la vía intraperitoneal las más eficaces<sup>23</sup>. Este estudio también confirmó que las cepas de *S. Typhimurium* mutadas en las vías metabólicas de la síntesis de aminoácidos aromáticos disminuyeron ligeramente la colonización del tejido tumoral en comparación con las bacterias de la cepa silvestre<sup>21</sup>.

Se ha propuesto que, una vez que *S. enterica* llega al microambiente tumoral, los mecanismos que permiten su permanencia están asociados con la poca actividad de los macrófagos y neutrófilos<sup>24</sup> debido a la hipoxia dentro del tumor, a la supresión de la respuesta inmune mediada por la presencia de citocinas (como TGF- $\beta$ ) y al difícil acceso de los anticuerpos anti-*Salmonella* y de los factores de complemento por el crecimiento irregular de los vasos sanguíneos dentro del tumor<sup>25</sup>.

## 3. *Salmonella enterica* y su actividad intrínseca antitumoral

*S. enterica* es una bacteria anaeróbica facultativa que ha sido empleada con gran éxito como vector bacteriano vivo

**Tabla 1** *Salmonella enterica* y su actividad intrínseca antitumoral

Especie	Mutaciones	Malignidad tratada	Referencia
Typhimurium	<i>pur</i> ; <i>ilv</i> ; <i>arg</i> ; <i>ura</i> ; <i>aro</i>	Melanoma	17
Typhimurium	<i>aroA</i> ; <i>hisG46</i> ; <i>cheY</i> ; <i>fliGHI</i> ; <i>invG</i> ; <i>phoP</i> ; <i>sseD</i> ; <i>ssrB</i> ; <i>purA</i>	Cáncer de colon	23
Typhimurium	<i>aroA</i>	Plasmocitoma	34
Typhimurium	<i>purl</i> ; <i>msbB</i>	Melanoma	35
Typhimurium	<i>ppGpp</i>	Cáncer de colon	36
Typhimurium	<i>hisD2550</i> ; <i>rpoS</i> ; <i>aroA</i> ; <i>rfaH</i> ; <i>thyA</i>	Cáncer de próstata	37
Typhi	<i>guaBA</i>	Linfoma de células T	38
Typhimurium	<i>aroC</i>	Linfoma de células B	39
Typhimurium	<i>leu</i> ; <i>arg</i>	Cáncer de próstata	40, 41
		Cáncer de mama	42, 43
		Osteosarcoma y metástasis	44
		Cáncer pancreático	45, 72
		Glioma de espina dorsal	46

atenuado con fines vacunales en función de su afinidad por células presentadoras de antígenos<sup>8,26,27</sup>. Esta característica está asociada con los mecanismos de inducción o activación de la respuesta inmune innata<sup>28,29</sup> o específica<sup>30,31</sup>, que explican parte de la actividad inmunoterapéutica antitumoral que posee esta bacteria. La actividad intrínseca antitumoral de *S. enterica* se complementa con la competencia entre la célula tumoral y la bacteria por los nutrientes o por la liberación de componentes bacterianos antitumorales debido a la lisis de las bacterias adheridas a la célula tumoral<sup>15</sup>. Diversos estudios han documentado la actividad intrínseca antitumoral *per se* que *S. enterica* posee (Tabla 1).

Desde 1982, Kurashige y Mitsuhashi documentaron la inducción de la respuesta inmune con actividad antitumoral por el empleo de minicélulas (vesículas sin ADN genómico) obtenidas de *S. Typhimurium* en un modelo murino de sarcoma<sup>32</sup>, así como de linfoma de células T<sup>33</sup>. En estos modelos, las minicélulas restauraron la actividad de los macrófagos en el microambiente tumoral. Posteriormente, los estudios de Eisenstein y colaboradores, en 1995, empleando mutantes en vías metabólicas (mutantes en *aroA*) de *S. Typhimurium* SL3235 demostraron que estas cepas atenuadas fueron efectivas para inhibir el crecimiento y reducir el tamaño tumoral en un modelo murino de plasmocitoma<sup>34</sup>. La capacidad de las cepas atenuadas de *S. enterica* para colonizar y replicar dentro de los tumores fue demostrada por Pawelek y colaboradores desde 1997, empleando un modelo de melanoma murino. Los resultados mostraron una relación de colonización de 1,000:1 con respecto al tejido normal, y se confirmó su utilidad como acarreador de proteínas terapéuticas hacia las células tumorales *in vivo*<sup>17</sup>. Desde entonces han surgido diversos reportes demostrando que las cepas atenuadas de *S. enterica* tienen la capacidad de reducir el tamaño del tumor, de retrasar el desarrollo de metástasis y prolongar la supervivencia en diversos modelos murinos de cáncer, como en el caso de carcinoma de pulmón,<sup>35</sup> carcinoma de colon,<sup>23,36</sup> cáncer de próstata,<sup>37</sup>

linfoma metastásico de células T<sup>38</sup> y linfoma de células B,<sup>39</sup> entre otros.

Estos estudios han sido consistentes con las observaciones realizadas en modelos murinos de xenotrasplantes con líneas celulares humanas, entre ellas cáncer de mama y próstata,<sup>40-42</sup> donde se han empleado cepas atenuadas de *S. Typhimurium* que inducen menor toxicidad en el hospedero y que mantienen su actividad antitumoral. Ejemplo de ello son los trabajos descritos con las cepas auxotróficas A1 (deficientes 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 próstata humano<sup>40</sup> y sus metástasis<sup>41</sup>, así como cáncer de mama humano<sup>42</sup>. Los resultados en este último modelo demuestran que las cepas colonizan el tumor, y que aproximadamente el 40% de los animales tratados erradicaron completamente el tumor y permanecieron aparentemente sanos las veinte semanas que duró el experimento<sup>42</sup>. Estudios recientes demuestran que esta cepa A1-R inhibe la metástasis a hueso que induce el cáncer de mama<sup>43</sup>. Otros trabajos han documentado la actividad antitumoral y antimetastásica de *S. Typhimurium* A1-R en osteosarcoma,<sup>44</sup> cáncer pancreático<sup>45</sup> y en gliomas de la espina dorsal<sup>46</sup>.

Diversos esfuerzos se han realizado para obtener cepas atenuadas de *S. enterica* que reduzcan los efectos secundarios en el hospedero. Con esta finalidad fue desarrollada la cepa VNP20009 de *S. Typhimurium* con mutaciones en los genes *msbB* (que afectan la formación de lípido A, reduciendo la toxicidad asociada al lipopolisacárido) y *purl* (que la hace dependiente de una fuente externa de adenina). Esta cepa se ha empleado en estudios clínicos de fase I en 24 pacientes con melanoma metastásico y un paciente con carcinoma renal metastásico. Los pacientes que recibieron dosis intravenosas de  $3 \times 10^8$  UFC/m<sup>2</sup> de la cepa VNP20009 no presentaron reacciones adversas severas. Sin embargo, la colonización del tejido tumoral fue moderada y el efecto antitumoral no fue significativo<sup>47</sup>.

#### 4. *Salmonella enterica* como acarreador de moléculas heterólogas antitumorales

La modesta actividad antitumoral inducida por *S. enterica* en los estudios clínicos<sup>47</sup> pone de manifiesto la necesidad de mecanismos alternativos para potenciar y asegurar la reversión del tumor. Para el caso de tumores inmunogénicos, se han expresado en *S. enterica* antígenos asociados con tumores y antígenos específicos de tumores que se sobreexpresan en la célula tumoral, con la finalidad de inducir o potenciar la respuesta inmune específica en contra del tumor<sup>48-50</sup>. Para el caso de los tumores no inmunogénicos, se han expresado en *S. enterica* proteínas que activan moléculas citotóxicas<sup>51-53</sup> o inmunomoduladoras que potencian la respuesta inmune o que inducen a la célula tumoral a morir por apoptosis<sup>25,54-60</sup>. Esta estrategia también ha sido útil en los tumores inmunogénicos (Tabla 2).

#### 5. *Salmonella enterica* y antígenos asociados o específicos de tumores

La presencia y sobreexpresión de proteínas que promueven la transformación y la tumorigénesis en las células tumorales, actualmente clasificadas como "antígenos asociados a tumores" (TAA) o "antígenos específicos de tumores" (TSA)<sup>61</sup>, han dado pauta para el empleo de *S. enterica* como acarreador de estos antígenos con fines profilácticos y terapéuticos<sup>8</sup>.

Una vez que *S. enterica* ha llegado al microambiente tumoral, las células tumorales infectadas presentan antígenos de *Salmonella* y son eliminadas por células T específicas contra esta bacteria<sup>62</sup>. En este proceso, un evento importante es la presentación cruzada de los antígenos tumorales. Esta vía alterna de presentación de antígenos se ve favorecida por la sobreexpresión de proteínas como conexina 43, que induce la formación de uniones adherentes entre las células tumorales y las células dendríticas. Este evento permite a las células tumorales transferir péptidos preprocesados hacia la célula dendrítica para su adecuada presentación por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I<sup>63</sup> y la consecuente inducción de una respuesta de linfocitos T CD8+ antígeno-específicos. Una vez en el microambiente tumoral, *S. enterica* induce la expresión intratumoral de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), inhibe la expresión de arginasa-1, interleucina-4 (IL-4), factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), y reduce la capacidad supresora de las células mieloides intratumorales, aumentando la respuesta antitumoral del huésped<sup>29</sup>. Diversos reportes han documentado la importancia de las células NK (*natural killers*), neutrófilos,<sup>28</sup> macrófagos,<sup>29</sup> linfocitos T<sup>30</sup> y linfocitos B<sup>31</sup> en la actividad antitumoral.

Sin embargo, toda esta maquinaria inmunológica inducida por la presencia de *S. enterica* en el microambiente tumoral no fue suficiente para permitir la regresión del tumor en los estudios clínicos<sup>47</sup>. Una alternativa para potenciar la respuesta inmune antitumoral es la expresión o liberación de antígenos tumorales de la superficie de *S. enterica*, aprovechando su afinidad por células presentadoras de

antígenos<sup>8</sup>. Al respecto, se ha evaluado la liberación de TAA/TSA por *S. enterica* con fines vacunales utilizando los sistemas de secreción I y III. El sistema de secreción tipo I (SSTI) fue empleado por Fensterle y colaboradores para liberar el antígeno específico de próstata (PSA) a través del sistema de HlyA. Sus resultados mostraron que, en los ratones inmunizados con *S. Typhimurium* que expresaban el antígeno PSA, se activó una respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8+ que inhibió el desarrollo del tumor<sup>48</sup>. Otro de los antígenos que ha sido acoplado a este sistema es la proteína C-Raf, molécula que juega un papel central en la transducción de señales, y que al sobreexpresarse o mutarse induce carcinogénesis. La inmunización de un modelo murino de adenoma pulmonar con *S. Typhimurium* que sobreexpresa C-Raf indujo anticuerpos contra C-Raf, respuesta de células T, e inhibió el crecimiento tumoral<sup>64</sup>.

El sistema de secreción tipo III (SSTT) fue empleado por Panthel y colaboradores utilizando un modelo murino de fibrosarcoma que sobreexpresa el péptido 217-225 de la proteína p60 de *Listeria monocytogenes*, que simula un antígeno tumoral<sup>49</sup>. Los estudios *in vivo* demostraron que el 80% de los ratones inmunizados con *S. Typhimurium* que expresaron el antígeno p60 a través del SSTT fueron protegidos ante el reto de células tumorales de fibrosarcoma que expresaban el péptido p60<sub>217-225</sub>. En los ratones que resistieron el reto de fibrosarcoma se observó una respuesta de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno que inhibió el desarrollo del tumor<sup>49,65</sup>. El antígeno tumoral NY-ESO-1 (proteína de células germinales que se encuentra sobreexpresada en cáncer de pulmón, melanoma, esófago, ovario, vejiga y próstata) también ha sido liberado a través del SSTT en *S. enterica*. La administración oral de esta cepa atenuada que expresa 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+ antígeno-específicos<sup>50</sup>. Estudios realizados en un modelo murino de melanoma reportaron que la inmunización orogástrica con *S. Typhimurium* que trasloca el epítipo inmunogénico de la proteína del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial (VEGFR-2) murino a través del SSTT, indujo una respuesta de linfocitos T CD8+ antígeno-específicos y redujo las metástasis hasta en el 60%<sup>66</sup>. Recientemente se ha demostrado que la administración oral de *S. Typhimurium* que libera la fusión de la proteína E7 del virus de papiloma humano tipo 16 (HPV16) acoplado a la proteína SipB del SSTT de *S. enterica*, inhibió el crecimiento del tumor en el 45% y promovió la supervivencia hasta en el 70% en un modelo murino de cáncer cervical<sup>67</sup>.

*S. enterica* también ha sido empleada para acarrear plásmidos que contienen la secuencia de antígenos tumorales. Ejemplo de ello es el gen de L1HPV16 que codifica para la proteína de la cápside del HPV16, donde la inmunización de los ratones con *S. Typhimurium* que acarreoó este plásmido indujo la regresión del tumor y aumentó la supervivencia en un modelo murino de cáncer cervical<sup>68</sup>. Estudios similares fueron realizados con el gen que codifica para la proteína MTDH/AEG1-1, un oncogén asociado con angiogénesis que se encuentra sobreexpresado en el 40% de los pacientes con cáncer de mama. El transporte de este gen por *S. Typhimurium* indujo la regresión del tumor y aumentó la supervivencia en un modelo murino de cáncer de mama<sup>69</sup>.

**Tabla 2** *Salmonella entérica* como acarreador de moléculas heterólogas antitumorales

Especie	Mutación	Molécula heteróloga	Malignidad tratada	Referencia
<i>Antígenos asociados a tumores/antígenos específicos de tumores</i>				
Typhimurium	<i>aroA</i>	Antígeno PSA	Cáncer de próstata	48
	<i>aroA</i>	L1HPV16	Cáncer cervical	67
	<i>aroA, sptP</i>	Antígeno p60 <sub>217-225</sub>	Fibrosarcoma	49, 65
	<i>aroA,</i> <i>hisG46</i>	VEGFR-2	Melanoma	66
Typhimurium	<i>aroA,</i> <i>aroD</i>	C-Raf	Adenoma de pulmón	64
	<i>aroA, aroD</i>	SipB160-HPV16E7	Cáncer cervical	68
Typhimurium	<i>phoP, phoQ</i>	NY-ESO-1	Sarcoma	50
	<i>phoP</i>	L1HPV16	Cáncer cervical	68
Typhimurium	<i>dam, aroA</i>	MTDH/AEG-1	Cáncer de mama y metástasis	69
<i>Inmunomoduladores e inductores de apoptosis</i>				
Typhimurium	<i>purl, msbB</i>	CCL21	Carcinoma de colon y de mama	25
		LIGHT	Carcinoma de colon y de mama	54
		IL-18	Carcinoma de colon y de mama	55
		FasL	Carcinoma de colon y de mama	56
Typhimurium	<i>cya, crp, asd</i>	IL-2	Osteosarcoma y metástasis	57, 58
Typhimurium	<i>aroA,</i> <i>hisG46</i> <i>aroA, aroD</i>	IL-4	Melanoma	59
		IL-18	Melanoma	59
		TRAIL	Cáncer gástrico	60
		TNF $\alpha$	Melanoma	71
<i>Moléculas citotóxicas</i>				
Typhimurium	<i>purl, msbB</i>	sPNP	Melanoma	53
Typhimurium	<i>aroA,</i> <i>aroA, waaN, purl</i>	Timidina cinasa	Linfoma no Hodgkin	74
		Hly E	Carcinoma de mama	79
Typhimurium	<i>ppGpp</i>	Cly A	Carcinoma de colon	80
		Cly A, Rluc, Fluc	Carcinoma de colon	81
<i>Silenciamiento de genes (siRNAs)</i>				
Typhi	<i>aroA,</i> <i>hisG46</i>	<i>MDR1</i>	Carcinoma de células escamosas de la lengua	91
Typhimurium	<i>aroA</i>	<i>Bcl-2</i>	Melanoma	95
Typhimurium	<i>phoP, phoQ</i>	<i>STAT3</i>	Cáncer de próstata	92, 93
			Hepatocarcinoma	94
Typhimurium	<i>aroA,</i> <i>hisG46</i>	<i>CTNNB1</i>	Cáncer de colon	96
Typhi	<i>galE, rpoS, itvD</i>	Survivina	Cáncer laríngeo	97

AEG-1: astrocyte elevated gene-1; *Bcl-2*: B-cell lymphoma 2 gene; CCL21: chemokine (C-C motif) ligand 21; *CTNNB1*: catenin beta-1 gene; C-Raf1: serine-threonine kinases of the Raf family; Cly A: cytolysin A; FasL: Fas ligand; Fluc: firefly luciferase; Hly E: hemolysin E; IL-2: interleukin-2; IL-4: interleukin-4; IL-18: interleukin-4; LIGHT: a member of TNF cytokine family; L1HPV16: capsid protein L1HPV16; MTDH: Metadherin; *MDR1*: multidrug resistance protein 1 gene; NY-ESO-1: testis antigen; sPNP: *Salmonella* purine nucleoside phosphorylase; Rluc: Renilla luciferase; *STAT3*: signal transducer and activator of transcription 3 gene; HPV16E7: human papilloma virus protein E7; TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ ; VEGFR-2: vascular endothelial growth factor receptor-2.

Los resultados prometedores de la actividad profiláctica que induce la inmunización con *S. enterica* que transporta secuencias de antígenos asociados con tumores ha permitido escalar este sistema a estudios clínicos de fase I en pacientes con estadio IV de cáncer pancreático. En este estudio, que actualmente se encuentra en curso, se administrarán por vía

oral cuatro dosis de 10<sup>6</sup> UFC de *S. Typhi* Ty21a (cepa segura aprobada para su uso en humanos como vacuna contra la fiebre tifoidea) que acarrea un plásmido que contiene la secuencia VEGFR-2 humano, proteína que está sobreexpresada en el endotelio del microambiente tumoral. El objetivo de este estudio es inducir actividad antiangiogénica y



generar una respuesta de memoria contra las células endoteliales para eliminar la vascularización del tumor<sup>70</sup>.

## 6. *Salmonella enterica* y proteínas inmunomoduladoras e inductoras de apoptosis en cáncer

El éxito de *S. enterica* como acarreador de antígenos tumorales para la activación de linfocitos T CD4+ y CD8+ antitumorales se limita a aquellos tumores que expresan antígenos asociados o específicos del tumor<sup>16</sup>.

Para superar este problema, se ha utilizado a *S. enterica* como un vehículo para transportar moléculas que modulan la respuesta inmune en el huésped, facilitando el proceso de eliminación del tumor.

Loeffler y colaboradores expresaron diversas moléculas inmunomoduladoras, como la citocina LIGHT<sup>54</sup>, la interleucina IL-18<sup>55</sup>, la quimiocina CCL21<sup>25</sup>, en *S. Typhimurium*, y observaron la reversión del crecimiento de los tumores primarios y sus metástasis de pulmón en modelos murinos de carcinoma de mama y carcinoma de colon. En estos trabajos, las proteínas fueron acopladas a un péptido señal para garantizar la secreción de la molécula; una vez en el microambiente tumoral, indujeron la quimioatracción de células de la respuesta inmune, como células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, células NK y linfocitos. Sorenson y colaboradores describieron que una dosis oral de *S. Typhimurium* que expresa a la Interleucina-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<sup>57,58</sup>. Agorio y colaboradores demostraron que la dosis única de la cepa de *S. enterica* con un plásmido que codifica para IL-4 o IL-18 fue suficiente para retardar el crecimiento tumoral y prolongar la supervivencia de ratones con melanoma. En cualquiera de los casos, el efecto antitumoral estuvo acompañado con un aumento sistémico de interferón gamma (IFN- $\gamma$ )<sup>59</sup>.

Otros trabajos han explorado la inducción de apoptosis de la célula tumoral mediada por moléculas que se expresan y secretan de *S. enterica*. Tal es el caso del ligando de Fas<sup>56</sup> o del TNF- $\alpha$ <sup>71</sup> en modelos murinos de carcinoma de colon y melanoma, respectivamente. *S. enterica* también se ha empleado para transportar el gen que codifica el ligando de muerte TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), induciendo una regresión significativa del tumor en un modelo murino de cáncer gástrico<sup>60</sup>.

## 7. *Salmonella enterica* y moléculas citotóxicas antitumorales

Uno de los principales problemas en la terapia antitumoral es la resistencia que presentan las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos. *S. enterica* ofrece una alternativa viable para resolver este problema, según lo documentan los resultados de Hiroshima y colaboradores en un modelo murino de xenotransplante de cáncer pancreático humano resistente a la quimioterapia, donde la comparación de la actividad antitumoral de esta bacteria con agentes quimioterapéuticos demostró que la cepa atenuada de *S. Typhimurium* A1-R presentó mayor actividad antitumoral que los agentes quimioterapéuticos 5-fluorouracilo

(5-FU), cisplatino (CDDP) y gemcitabina (GEM). También se observó un efecto sinérgico antitumoral al combinar *S. enterica* con 5-FU, sugiriendo que el tratamiento con *S. enterica* induce quimiosensibilidad en las células resistentes a la quimioterapia<sup>72</sup>. Estos resultados son consistentes con los estudios realizados por Chang y colaboradores en modelos murinos de melanoma y cáncer de mama, en los que *S. enterica* sensibilizó la célula tumoral a la acción del agente quimioterapéutico CDDP, y se observó un efecto terapéutico aditivo para retardar el tumor y prolongar la supervivencia de los ratones con tumores. La quimiosensibilidad inducida por *S. enterica* fue asociada con la sobreexpresión de la proteína conexina 43, molécula que favorece las uniones adherentes entre las células tumorales permitiendo una mejor comunicación y una distribución homogénea del agente quimioterapéutico<sup>73</sup>.

No obstante que los resultados del efecto sinérgico mediado por la administración de *S. enterica* y el agente quimioterapéutico son alentadores, aún es necesaria la implementación de mejores estrategias que permitan la destrucción selectiva del tejido tumoral sin dañar los tejidos sanos. Una alternativa a esta disyuntiva es el uso de enzimas que, una vez localizadas en el microambiente tumoral, activan compuestos citotóxicos (pro-fármacos) que eliminan la célula tumoral<sup>52</sup>. Esta estrategia ha sido explorada empleando como acarreadores las cepas atenuadas de *S. enterica*. Se ha descrito que para su efectividad se requieren, al menos, dos etapas: la primera es la administración de la bacteria atenuada que acarreará a la enzima de interés al microambiente tumoral, y la segunda es la administración del compuesto citotóxico inactivo (pro-fármaco) el cual se activará estrictamente en el microambiente tumoral en presencia de la enzima<sup>52</sup>. Ejemplos de esta estrategia son los trabajos de Chen y colaboradores, donde la expresión del gen que codifica para la enzima fosforilasa del nucleósido de purina (sPNP) en *S. Typhimurium* cepa VNP20009 activó el compuesto no tóxico 6-metilpurina-2'-desoxirribósido (6MePdR) en un potente fármaco antitumoral, la 6-metilpurina (6MeP), retardando el crecimiento del tumor e incrementando la infiltración de linfocitos T CD8+ en un modelo murino de melanoma<sup>53</sup>. Massa y colaboradores documentaron la actividad antitumoral de *S. Typhimurium* SL3262, que expresa un anticuerpo de un solo dominio contra el antígeno CD20 y, al mismo tiempo, expresa la enzima timidina cinasa, activadora de fármacos como el ganciclovir. Esta bacteria recombinante aumentó la especificidad por el microambiente tumoral en un modelo xenográfico de linfoma no Hodgkin humano debido a la presencia del anticuerpo anti-CD20, e indujo una actividad antitumoral que aumentó la supervivencia en ratones deficientes de respuesta inmune específica<sup>74</sup>.

Con la finalidad de mejorar la actividad antitumoral mediada por *S. Typhimurium* VNP20009 en ensayos clínicos de fase I, Nemunaitis y colaboradores expresaron en esta cepa el gen de la enzima citosina desaminasa de *Escherichia coli*. Esta enzima se encarga de convertir a la 5-fluorocitosina en 5-fluorouracilo, un metabolito citotóxico que se emplea en los tratamientos de cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer de cabeza y cuello<sup>75</sup>. Con esta nueva cepa recombinante se realizó un ensayo clínico piloto que incluyó tres pacientes con cáncer refractario (uno con carcinoma de células escamosas de

cabeza y cuello y dos con adenocarcinoma de esófago). Los resultados demostraron que la cepa VNP20009 colonizó el tejido tumoral en dos de los pacientes; además, se observó la actividad de la enzima citosina desaminasa al medir la concentración del 5 fluorouracilo en el tejido tumoral<sup>75</sup>. Este trabajo confirma la capacidad de *S. enterica* de colonizar tejido tumoral en humanos y su utilidad como acarreador de moléculas que activan compuestos citotóxicos con actividad antitumoral.

La búsqueda de mejores alternativas terapéuticas antitumorales ha permitido la evaluación de una nueva generación de moléculas entre las que se encuentran proteínas bacterianas con actividad citotóxica. Ejemplo de ello son la toxina diftérica de *Corynebacterium diphtheria*, la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, la  $\alpha$ -hemolisina de *Staphylococcus aureus*, la parasporina-4 de *Bacillus thuringiensis*, la listeriolisina O de *Listeria monocytogenes*, la aerolisina de *Aeromonas hydrophila*, la citolisina A de *Escherichia coli*, entre otras<sup>76-78</sup>. El transporte selectivo de estas proteínas citotóxicas hacia la célula tumoral, sin que dañen a las células normales, se ha resuelto al acoplarlas con anticuerpos específicos contra antígenos tumorales generando los compuestos denominados "inmunotoxinas", o acoplándolos con alguna molécula que tenga un ligando sobreexpresado en la célula tumoral. Tal es el caso de ciertos factores de crecimiento o citocinas. A estas proteínas se le denomina "toxinas específicas"<sup>78</sup>. Sin embargo, el mayor reto es transportar estos compuestos a las zonas hipóxicas y con poca vascularidad en el tumor. Para superar este obstáculo, algunas proteínas citotóxicas han sido expresadas en cepas atenuadas de *S. enterica*, y de esta manera son transportadas al microambiente tumoral de manera efectiva y selectiva. Los trabajos de Ryan y colaboradores, empleando un modelo murino de cáncer de mama, demuestran que la administración intravenosa de una *S. Typhimurium* que expresa la hemolisina E (Hly E), proteína de *Escherichia coli* que forma poros en la membrana celular bajo un promotor que se induce en anaerobiosis, permitió la colonización del tumor, indujo necrosis y disminuyó la masa tumoral<sup>79</sup>.

Otra proteína de *Escherichia coli* que ha sido evaluada por su actividad antitumoral es la citolisina A (ClyA), que también forma poros en la membrana y que recientemente ha sido expresada en *S. Typhimurium* bajo un sistema inducible de tetraciclina para evitar el daño a las células normales. La administración de esta *Salmonella* recombinante como terapia antitumoral en un modelo murino de carcinoma de colon, permitió la regresión del tumor, disminuyó las metástasis a pulmón y promovió la sobrevivencia el ratón<sup>77,80,81</sup>. Los resultados alentadores en los modelos preclínicos empleando proteínas bacterianas citotóxicas expresadas en *S. enterica* constituyen una alternativa prometedora que debiera explorarse en detalle.

## 8. *Salmonella enterica* y el silenciamiento génico antitumoral

*S. enterica* tiene una gran capacidad de transportar y transferir DNA plasmídico al interior de células eucariotas<sup>82-84</sup>, induciendo actividad antitumoral en modelos murinos de melanoma, cáncer de vejiga y adenocarcinoma de pulmón<sup>85-88</sup>. Con base en estas observaciones, *S. enterica*

atenuada se ha convertido en el candidato ideal para transportar y liberar en el microambiente tumoral a los RNA pequeños de interferencia (siRNA) para el silenciamiento de genes implicados en cáncer<sup>89,90</sup>. Ejemplo de ello es el silenciamiento de proteínas implicadas en la resistencia a la quimioterapia, como gp-170 codificada por el gen *MDR* (*multidrug resistance*) realizado en un modelo murino de carcinoma de células escamosas de lengua<sup>91</sup>. También se ha silenciado la expresión del factor de transcripción STAT-3, una molécula asociada con la supervivencia de las células tumorales en modelos murinos de cáncer de próstata<sup>92,93</sup> y carcinoma hepatocelular<sup>94</sup>, y se ha documentado el silenciamiento génico de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, en un modelo murino de melanoma<sup>95</sup>. Los oncogenes, como el gen *CTNNB1* que codifica para  $\beta$ -catenina, también han sido silenciados en modelos murinos de cáncer de colon<sup>96</sup>. Estudios recientes en un modelo murino de cáncer laríngeo han descrito el silenciamiento del gen que codifica para survivina, una proteína implicada en la supresión de apoptosis<sup>97</sup>. En todos los casos descritos, la liberación de los siRNA mediada a través de *S. enterica* en los diferentes modelos murinos de cáncer indujo la regresión de los tumores.

## 9. Perspectivas

Ha pasado más de siglo y medio desde la primera vez que se describió la actividad antitumoral de las bacterias<sup>2</sup>, y aunque los avances en este campo han sido lentos uno de los logros más importantes a la fecha es el empleo de la cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, el BCG, como inmunoterapéutico eficaz para el carcinoma de vejiga de células transicionales superficiales en humanos<sup>13</sup>.

Los estudios descritos en esta revisión han demostrado el uso potencial de cepas atenuadas de *S. enterica* serovar Typhi y Typhimurium como una alternativa prometedora para resolver problemas inherentes a la terapia con agentes quimioterapéuticos, debido a que estos vectores vivos atenuados presentan una gran selectividad por el tejido tumoral y metástasis, y sensibilizan a las células tumorales a la quimioterapia<sup>6,8,98</sup>. Estas propiedades son potenciadas por la actividad citolítica que *S. enterica* tiene *per se*, por la capacidad de inducir respuesta innata y adaptativa en el microambiente tumoral y por la indiscutible habilidad de transportar moléculas heterólogas al microambiente tumoral, como antígenos asociados o específicos de tumores, moléculas inmunomoduladoras e inductoras de apoptosis, proteínas activadoras de moléculas citotóxicas y transporte de siRNA, que silencian genes implicados en la tumorigénesis y resistencia a la apoptosis<sup>8</sup> (Tabla 2).

No obstante que se han documentado ensayos clínicos de fase I empleando a *S. enterica* para eliminar tumores (Tabla 3), aún son necesarios mayores esfuerzos enfocados en lo siguiente:

- Desarrollar cepas atenuadas seguras. Es importante mencionar que los resultados de estudios clínicos fase I con *S. Typhimurium* cepa VNP20009 mostraron que la bacteria no indujo efectos adversos severos, y fue bien tolerada por los pacientes con melanoma metastásico, carcinoma renal metastásico, carcinoma de cabeza y cuello y adenocarcinoma de esófago<sup>47,75,99</sup>. A la fecha se encuentra en curso

**Tabla 3** Ensayos clínicos empleando a *Salmonella enterica* como agente antitumoral

Especie	Mutación	Molécula heteróloga	Malignidad tratada	Referencia
Typhimurium VNP20009	<i>purl, msbB</i>	Ninguna	Melanoma metastásico Carcinoma renal metastásico	47, 99 47
Typhimurium VNP20009 TAPET-CD	<i>purl, msbB</i>	Citosina desaminasa	Carcinoma de cabeza y cuello Adenocarcinoma de esófago	75 75
Typhi TY21a	<i>galE, rpoS, ilvD</i>	VEGFR-2	Cáncer pancreático	70

VEGFR-2: vascular endothelial growth factor receptor-2.

un ensayo clínico fase I con pacientes de cáncer pancreático empleando *S. Typhi* cepa Ty21a. Esta cepa es segura y está aprobada para su uso en humanos con fines vacunales<sup>70</sup>. Otras opciones que debieran evaluarse en la terapia antitumoral en fase clínica son las cepas de *S. Typhi* CVD908, CVD908-*htrA* y Ty800, las cuales también han demostrado ser seguras en ensayos clínicos con fines vacunales, incluso en niños<sup>27,100</sup>.

- Desarrollar mejores mecanismos de transporte de moléculas antitumorales al interior de la célula o al microambiente celular. Una estrategia interesante a evaluar es el empleo de los sistemas de secreción bacterianos, como el tipo V, o de autotransportadores, para liberar moléculas antitumorales acopladas a péptidos fusogénicos que desestabilizan membranas. Esta estrategia permitiría a la molécula antitumoral alcanzar su blanco dentro de la célula, independientemente de que *S. enterica* se encuentre dentro o fuera de la célula tumoral<sup>8,101</sup>.

- Mejorar la selectividad de la bacteria por la célula o el tejido tumoral. Una estrategia que se ha evaluado por el grupo de Massa y colaboradores es la expresión de un anticuerpo de un solo dominio contra el antígeno CD20 en la superficie de *S. Typhimurium* SL3262 para aumentar la especificidad de la bacteria por el microambiente tumoral en un modelo xenográfico de linfoma no Hodgkin<sup>74</sup>. Sin embargo, aún existen diversas alternativas que pueden ayudar a incrementar esta selectividad. Una propuesta interesante son las adhesinas sintéticas fusionadas a dominios variables de la cadena pesada de los anticuerpos comúnmente denominados como nanoanticuerpos, los cuales, al ser expresados en *Escherichia coli*, han demostrado ser eficientes para colonizar tumores que expresan algún antígeno reconocido por la adhesina sintética fusionada al nanoanticuerpo<sup>102</sup>.

- Establecer estudios clínicos donde se evalúe el uso potencial de *S. enterica* en combinación con agentes quimioterapéuticos<sup>52</sup>.

Finalmente, acorde con los estudios preclínicos y clínicos expuestos en esta revisión, las cepas atenuadas de *Salmonella enterica* pueden considerarse excelentes aliados en la lucha contra el cáncer.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

## Financiamiento

El presente trabajo recibió financiamiento de Fondos Federales HIM-2013-028(GAA) y HIM-2014-032(RLP). HCN, AVE y DCBP obtuvieron beca PROBEI.

## Referencias

- Sznol M, Lin SL, Bermudes D, Zheng LM, King I. Use of preferentially replicating bacteria for the treatment of cancer. *J Clin Invest*. 2000;105:1027–30.
- Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Bacteria as tumour-targeting vectors. *Lancet Oncol*. 2003;4:548–56.
- Wei MQ, Ellem KA, Dunn P, West MJ, Bai CX, Vogelstein B. Facultative or obligate anaerobic bacteria have the potential for multimodality therapy of solid tumours. *Eur J Cancer*. 2007;43:490–6.
- Patyar S, Joshi R, Prasad Byrav DS, Prakash A, Medhi B, Das BK. Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *J Biomed Sci*. 2010;17:21.
- Yu H. Bacteria-mediated disease therapy. *App Microbiol Biotechnol*. 2011;92:1107–13.
- Forbes NS. Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:785–94.
- Lee CH. Engineering bacteria toward tumor targeting for cancer treatment: current state and perspectives. *App Microbiol Biotechnol*. 2012;93:517–23.
- Hernández-Luna MA, Luria-Pérez R, Huerta-Yépez S. [Therapeutic intervention alternatives in cancer, using attenuated live bacterial vectors: *Salmonella enterica* as a carrier of heterologous molecules]. *Rev Inv Clin*. 2013;65:65–73.
- Mager DL. Bacteria and cancer: cause, coincidence or cure? A review. *J Transl Med*. 2006;4:14.
- Coley WB. Contribution to the knowledge of sarcoma. *Ann Surg*. 1891;14:199–220.
- Coley WB. The treatment of inoperable sarcoma by bacterial toxins (the mixed toxins of the *Streptococcus erysipelas* and the *Bacillus prodigiosus*). *Proc R Soc Med*. 1910;3 (Surg Sect):1–48.
- Mastrangelo G, Fadda E, Milan G. Cancer increased after a reduction of infections in the first half of this century in Italy: etiologic and preventive implications. *Eur J Epidemiol*. 1998;14:749–54.
- Lamm DL. *Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy of genitourinary cancer*. En: Orentas R, Hodge JW, Johnson BD, editores. *Cancer Vaccines and Tumor Immunity*. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons Inc; 2008. p. 29–42.



14. Luo Y, Knudson MJ. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin-induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells. *Clin Dev Immunol.* 2010;2010:357591.
15. Eisenstark A, Kazmierczak RA, Dino A, Khreis R, Newman D, Schatten H. Development of *Salmonella* strains as cancer therapy agents and testing in tumor cell lines. *Methods Mol Biol.* 2007;394:323–54.
16. Moreno M, Kramer MG, Yim L, Chabalgoity JA. *Salmonella* as live trojan horse for vaccine development and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2010;10:56–76.
17. Pawelek JM, Low KB, Bermudes D. Tumor-targeted *Salmonella* as a novel anticancer vector. *Cancer Res.* 1997;57:4537–44.
18. 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.
19. Kasinskas RW, Forbes NS. *Salmonella typhimurium* specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue in vitro. *Biotechnol Bioeng.* 2006;94:710–21.
20. Kasinskas RW, Forbes NS. *Salmonella typhimurium* lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis. *Cancer Res.* 2007;67:3201–9.
21. Stritzker J, Weibel S, Seubert C, Götz A, Tresch A, van Rooijen N, et al. Enterobacterial tumor colonization in mice depends on bacterial metabolism and macrophages but is independent of chemotaxis and motility. *Int J Med Microbiol.* 2010;300:449–56.
22. Toley BJ, Forbes NS. Motility is critical for effective distribution and accumulation of bacteria in tumor tissue. *Integr Biol (Camb).* 2012;4:165–76.
23. Crull K, Bumann D, Weiss S. Influence of infection route and virulence factors on colonization of solid tumors by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011;62:75–83.
24. Westphal K, Leschner S, Jablonska J, Loessner H, Weiss S. Containment of tumor-colonizing bacteria by host neutrophils. *Cancer Res.* 2008;68:2952–60.
25. Loeffler M, Le'Negrate G, Krajewska M, Reed JC. *Salmonella typhimurium* engineered to produce CCL21 inhibit tumor growth. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58:769–75.
26. Spreng S, Dietrich G, Weidinger G. Rational design of *Salmonella*-based vaccination strategies. *Methods.* 2006;38:133–43.
27. Zhang XL, Jeza VT, Pan Q. *Salmonella typhi*: from a human pathogen to a vaccine vector. *Cell Mol Immunol.* 2008;5:91–7.
28. Barak Y, Schreiber F, Thorne SH, Contag CH, deBeer D, Matin A. Role of nitric oxide in *Salmonella typhimurium*-mediated cancer cell killing. *BMC Cancer.* 2010;10:146.
29. Kaimala S, Mohamed YA, Nader N, Issac J, Elkord E, Chouaib S, et al. *Salmonella*-mediated tumor regression involves targeting of tumor myeloid suppressor cells causing a shift to M1-like phenotype and reduction in suppressive capacity. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63:587–99.
30. Lee CH, Hsieh JL, Wu CL, Hsu PY, Shiau AL. T cell augments the antitumor activity of tumor-targeting *Salmonella*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90:1381–8.
31. Lee CH, Hsieh JL, Wu CL, Hsu HC, Shiau AL. B cells are required for tumor-targeting *Salmonella* in host. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;92:1251–60.
32. Kurashige S, Mitsuhashi S. Enhancing effects of mini-cells prepared from *Salmonella typhimurium* on anti-tumor immunity in sarcoma 180-bearing mice. *Cancer Immunol Immunother.* 1982;14:1–3.
33. Kurashige S, Akuzawa Y, Mitsuhashi S. Synergistic anti-suppressor effect of mini cells prepared from *Salmonella typhimurium* and mitomycin C in EL 4-bearing mice. *Cancer Immunol Immunother.* 1985;19:127–9.
34. Eisenstein TK, Bushnell B, Meissler JJ Jr, Dalal N, Schafer R, Havas HF. Immunotherapy of a plasmacytoma with attenuated *Salmonella*. *Med Oncol.* 1995;12:103–8.
35. Chen G, Wei DP, Jia LJ, Tang B, Shu L, Zhang K, et al. Oral delivery of tumor-targeting *Salmonella* exhibits promising therapeutic efficacy and low toxicity. *Cancer Sci.* 2009;100:2437–43.
36. Yun M, Pan S, Jiang SN, Nguyen VH, Park SH, Jung CH, et al. Effect of *Salmonella* treatment on an implanted tumor (CT26) in a mouse model. *J Microbiol.* 2012;50:502–10.
37. Choe E, Kazmierczak RA, Eisenstark A. Phenotypic evolution of therapeutic *Salmonella enterica* serovar Typhimurium after invasion of TRAMP mouse prostate tumor. *mBio.* 2014;5, e01182-14. doi:10.1128/mBio.01182-14.
38. Vendrell A, Gravisaco MJ, Goin JC, Pasetti MF, Herschlik L, De Toro J, et al. Therapeutic effects of *Salmonella typhi* in a mouse model of T-cell lymphoma. *J Immunother.* 2013;36:171–80.
39. Grille S, Moreno M, Brugnini A, Lens D, Chabalgoity JA. A therapeutic vaccine using *Salmonella*-modified tumor cells combined with interleukin-2 induces enhanced antitumor immunity in B-cell lymphoma. *Leuk Res.* 2013;37:341–8.
40. Zhao M, Yang M, Li XM, Jiang P, Baranov E, Li S, et al. Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:755–60.
41. Zhao M, Geller J, Ma H, Yang M, Penman S, Hoffman RM. 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.
42. Zhao M, Yang M, Ma H, Li X, Tan X, Li S, et al. Targeted therapy with a *Salmonella typhimurium* leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice. *Cancer Res.* 2006;66:7647–52.
43. Miwa S, Yano S, Zhang Y, Matsumoto Y, Uehara F, Yamamoto M, et al. Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R prevents experimental human breast cancer bone metastasis in nude mice. *Oncotarget.* 2014;5:7119–25.
44. Hayashi K, Zhao M, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita 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.
45. Nagakura C, Hayashi K, Zhao M, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, et al. Efficacy of a genetically-modified *Salmonella typhimurium* in an orthotopic human pancreatic cancer in nude mice. *Anticancer Res.* 2009;29:1873–8.
46. Kimura H, Zhang L, Zhao M, Hayashi K, Tsuchiya H, Tomita K, et al. Targeted therapy of spinal cord glioma with a genetically modified *Salmonella typhimurium*. *Cell Prolif.* 2010;43:41–8.
47. Toso JF, Gill VJ, Hwu P, Marincola FM, Restifo NP, Schwartzentruber DJ, 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.
48. Fensterle J, Bergmann B, Yone CL, Hotz C, Meyer SR, Spreng S, et al. Cancer immunotherapy based on recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium aroA strains secreting prostate-specific antigen and cholera toxin subunit B. *Cancer Gene Ther.* 2008;15:85–93.
49. Panthel K, Meinel KM, Sevil Domènech VE, Geginat G, Linke-mann K, Busch DH, et al. Prophylactic anti-tumor immunity against a murine fibrosarcoma triggered by the *Salmonella* type III secretion system. *Microbes Infect.* 2006;8:2539–46.
50. Nishikawa H, Sato E, Briones G, Chen LM, Matsuo M, Nagata Y, 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.

51. Cheng CM, Lu YL, Chuang KH, Hung WC, Shiea J, Su YC, et al. Tumor-targeting prodrug-activating bacteria for cancer therapy. *Cancer Gene Ther.* 2008;15:393–401.
52. Lehouritis P, Springer C, Tangney M. Bacterial-directed enzyme prodrug therapy. *J Control Release.* 2013;170:120–31.
53. Chen G, Tang B, Yang BY, Chen JX, Zhou JH, Li JH, et al. Tumor-targeting *Salmonella typhimurium*, a natural tool for activation of prodrug 6MePdR and their combination therapy in murine melanoma model. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97:4393–401.
54. Loeffler M, Le'Negrata 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.
55. Loeffler M, Le'Negrata G, Krajewska M, Reed JC. IL-18-producing *Salmonella* inhibit tumor growth. *Cancer Gene Ther.* 2008;15:787–94.
56. Loeffler M, Le'Negrata G, Krajewska M, Reed JC. Inhibition of tumor growth using *Salmonella* expressing Fas ligand. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:1113–6.
57. Sorenson BS, Banton KL, Frykman NL, Leonard AS, Saltzman DA. Attenuated *Salmonella typhimurium* with IL-2 gene reduces pulmonary metastases in murine osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res.* 2008;466:1285–91.
58. 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.
59. Agorio C, Schreiber F, Sheppard M, Mastroeni P, Fernandez M, Martinez MA, et al. Live attenuated *Salmonella* as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma. *J Gene Med.* 2007;9:416–23.
60. Cao HD, Yang YX, Lü L, Liu SN, Wang PL, Tao XH, 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.
61. Linley AJ, Ahmad M, Rees RC. Tumour-associated antigens: considerations for their use in tumour immunotherapy. *Int J Hematol.* 2011;93:263–73.
62. Avogadri F, Martinoli C, Petrovska L, Chiodoni C, Transidico P, Bronte V, et al. Cancer immunotherapy based on killing of *Salmonella*-infected tumor cells. *Cancer Res.* 2005;65:3920–7.
63. Saccheri F, Pozzi C, Avogadri F, Barozzi S, Faretta M, Fusi P, et al. Bacteria-induced gap junctions in tumors favor antigen cross-presentation and antitumor immunity. *Sci Transl Med.* 2010;2, 44ra57.
64. Gentschev I, Fensterle J, Schmidt A, Potapenko T, Troppmaier J, Goebel W, et al. Use of a recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain expressing C-Raf for protection against C-Raf induced lung adenoma in mice. *BMC Cancer.* 2005;5:15.
65. Roider E, Jellbauer S, Köhn B, Berchtold C, Partilla M, Busch DH, et al. Invasion and destruction of a murine fibrosarcoma by *Salmonella*-induced effector CD8 T cells as a therapeutic intervention against cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60:371–80.
66. Jellbauer S, Panthel K, Hetrodt JH, Rüssmann H. CD8 T-cell induction against vascular endothelial growth factor receptor 2 by *Salmonella* for vaccination purposes against a murine melanoma. *PLoS One.* 2012;7, e34214.
67. Yoon W, Choi JH, Kim S, Park YK. Engineered *Salmonella typhimurium* expressing E7 fusion protein, derived from human papillomavirus, inhibits tumor growth in cervical tumor-bearing mice. *Biotechnol Lett.* 2014;36:349–56.
68. Echchannaoui H, Bianchi M, Baud D, Bobst M, Stehle JC, Nardelli-Haeftiger D. Intravaginal immunization of mice with recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing human papillomavirus type 16 antigens as a potential route of vaccination against cervical cancer. *Infect Immun.* 2008;76:1940–51.
69. Qian BJ, Yan F, Li N, Liu QL, Lin YH, Liu CM, et al. MTDH/AEG-1-based DNA vaccine suppresses lung metastasis and enhances chemosensitivity to doxorubicin in breast cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60:883–93.
70. Niethammer AG, Lubenau H, Mikus G, Knebel P, Hohmann N, Leowardi C, et al. 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.* 2012;12:361.
71. Yoon WS, Chae YS, Hong J, Park YK. Antitumor therapeutic effects of a genetically engineered *Salmonella typhimurium* harboring TNF- $\alpha$  in mice. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;89:1807–19.
72. Hiroshima Y, Zhao M, Zhang Y, Maawy A, Hassanein MK, Uehara F, et al. Comparison of efficacy of *Salmonella typhimurium* A1-R and chemotherapy on stem-like and non-stem human pancreatic cancer cells. *Cell Cycle.* 2013;12:2774–80.
73. Chang WW, Lai CH, Chen MC, Liu CF, Kuan YD, Lin ST, et al. *Salmonella* enhance chemosensitivity in tumor through connexin 43 upregulation. *Int J Cancer.* 2013;133:1926–35.
74. Massa PE, Paniccia A, Monegal A, de Marco A, Rescigno M. *Salmonella* engineered to express CD20-targeting antibodies and a drug-converting enzyme can eradicate human lymphomas. *Blood.* 2013;122:705–14.
75. Nemunaitis J, Cunningham C, Senzer N, Kuhn J, Cramm J, Litz C, et al. Pilot trial of genetically modified, attenuated *Salmonella* expressing the *E. coli* cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. *Cancer Gene Ther.* 2003;10:737–44.
76. Pirie CM, Liu DV, Wittrup KD. Targeted cytolysins synergistically potentiate cytoplasmic delivery of gelonin immunotoxin. *Mol Cancer Ther.* 2013;12:1774–82.
77. Jiang SN, Phan TX, Nam TK, Nguyen VH, Kim HS, Bom HS, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis by a combination of *Escherichia coli*-mediated cytolytic therapy and radiotherapy. *Mol Ther.* 2010;18:635–42.
78. Gurnev PA, Nestorovich EM. Channel-forming bacterial toxins in biosensing and macromolecule delivery. *Toxins (Basel).* 2014;6:2483–540.
79. Ryan RM, Green J, Williams PJ, Tazzyman S, Hunt S, Harmey JH, et al. Bacterial delivery of a novel cytolysin to hypoxic areas of solid tumors. *Gene Ther.* 2009;16:329–39.
80. Nguyen VH, Kim HS, Ha JM, Hong Y, Choy HE, Min JJ. Genetically engineered *Salmonella typhimurium* as an imageable therapeutic probe for cancer. *Cancer Res.* 2010;70:18–23.
81. Jiang SN, Park SH, Lee HJ, Zheng JH, Kim HS, Bom HS, et al. Engineering of bacteria for the visualization of targeted delivery of a cytolytic anticancer agent. *Mol Ther.* 2013;21:1985–95.
82. Bora RS, Gupta D, Mukkur TK, Saini KS. RNA interference therapeutics for cancer: challenges and opportunities (review). *Mol Med Rep.* 2012;6:9–15.
83. Darji A, Guzmán CA, Gerstel B, Wachholz P, Timmis KN, Wehland J, et al. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*. *Cell.* 1997;91:765–75.
84. Weiss S, Chakraborty T. Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian host cells by bacterial carriers. *Curr Opin Biotechnol.* 2001;12:467–72.
85. Yoon WS, Choi WC, Sin JI, Park YK. Antitumor therapeutic effects of *Salmonella typhimurium* containing Flt3 Ligand expression plasmids in melanoma-bearing mouse. *Biotechnol Lett.* 2007;29:511–6.

86. Lee CH, Wu CL, Shiau AL. Endostatin gene therapy delivered by *Salmonella choleraesuis* in murine tumor models. *J Gene Med.* 2004;6:1382–93.
87. 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 Ther.* 2005;12:175–84.
88. Shao C, Yang B, Zhao L, Wang S, Zhang J, Wang K. Tumor suppressor gene RBM5 delivered by attenuated *Salmonella* inhibits lung adenocarcinoma through diverse apoptotic signaling pathways. *World J Surg Oncol.* 2013;11:123.
89. Stevenson M. Therapeutic potential of RNA interference. *N Engl J Med.* 2004;351:1772–7.
90. Snead NM, Rossi JJ. RNA interference trigger variants: getting the most out of RNA for RNA interference-based therapeutics. *Nucleic Acid Ther.* 2012;22:139–46.
91. Jiang Z, Zhao P, Zhou Z, Liu J, Qin L, Wang H. Using attenuated *Salmonella typhi* as tumor targeting vector for MDR1 siRNA delivery. *Cancer Biol Ther.* 2007;6:555–60.
92. Zhang L, Gao L, Zhao L, Guo B, Ji K, Tian Y, et al. Intratumoral delivery and suppression of prostate tumor growth by attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium carrying plasmid-based small interfering RNAs. *Cancer Res.* 2007;67:5859–64.
93. Li X, Li Y, Wang B, Ji K, Liang Z, Guo B, et al. Delivery of the co-expression plasmid pEndo-Si-Stat3 by attenuated *Salmonella* serovar Typhimurium for prostate cancer treatment. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013;139:971–80.
94. Jia H, Li Y, Zhao T, Li X, Hu J, Yin D, et al. Antitumor effects of Stat3-siRNA and endostatin combined therapies, delivered by attenuated *Salmonella*, on orthotopically implanted hepatocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61:1977–87.
95. 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 Biol Ther.* 2008;7:145–51.
96. Guo H, Zhang J, Inal C, Nguyen T, Fruehauf JH, Keates AC, et al. Targeting tumor gene by shRNA-expressing *Salmonella*-mediated RNAi. *Gene Ther.* 2011;18:95–105.
97. Wen LJ, Gao LF, Jin CS, Zhang HJ, Ji K, Yang JP, et al. Small interfering RNA survivin and GRIM-19 co-expression *Salmonella* plasmid inhibited the growth of laryngeal cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Clin Exp Pathol.* 2013;6:2071–81.
98. Wall DM, Srikanth CV, McCormick BA. Targeting tumors with *Salmonella typhimurium*—potential for therapy. *Oncotarget.* 2010;1:721–8.
99. Heimann DM, Rosenberg SA. Continuous intravenous administration of live genetically modified *Salmonella typhimurium* in patients with metastatic melanoma. *J Immunother.* 2003;26:179–80.
100. Roland KL, Brenneman KE. Salmonella as a vaccine delivery vehicle. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12:1033–45.
101. Luria-Perez R, Cedillo-Barron L, Santos-Argumedo L, Ortiz-Navarrete VF, Ocaña-Mondragon A, Gonzalez-Bonilla CR. A fusogenic peptide expressed on the surface of *Salmonella enterica* elicits CTL responses to a dengue virus epitope. *Vaccine.* 2007;25:5071–85.
102. Piñero-Lambea C, Bodelón G, Fernández-Periáñez R, Cuesta AM, Álvarez-Vallina L, Fernández LA. Programming controlled adhesion of *E. coli* to target surfaces, cells, and tumors with synthetic adhesins. *ACS Synth Biol.* 2014, 10.1021/sb500252a.