

Informe final publicable de proyecto

Mecanismos moleculares involucrados en la efectividad antitumoral de Salmonella: estudios del rol de la inmunidad entrenada y autofagia

Código de proyecto ANII: FCE_1_2021_1_167248

Fecha de cierre de proyecto: 01/10/2024

CHABALGOITY RODRIGUEZ, José Alejandro (Responsable Técnico - Científico)

CHILIBROSTE VERA, Sofía (Investigador)

GRILLE MONTAUBAN, Sofía (Investigador)

MÓNACO PATIÑO, Amy Elizabeth (Investigador)

MORENO JAUGE, María (Investigador)

PLATA PAULET, María Clara (Investigador)

VOLA RAVINA, María Magdalena (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \ \ INSTITUTO DE HIGIENE

Resumen del proyecto

Existe un renovado interés en el uso de bacterias modificadas para el desarrollo de nuevas inmunoterapias contra el cáncer, y en particular *Salmonella* ha demostrado un enorme potencial. Nuestro grupo trabaja desde hace mas de una década en el área y hemos demostrado en distintos modelos preclínicos de cáncer que la administración de *Salmonella* viva atenuada enlentece el crecimiento tumoral y extiende la sobrevida. Sin embargo, los efectos inducidos son siempre transitorios y salvo excepciones, no se obtiene remisión completa. Una comprensión mayor de los efectores moleculares y celulares involucrados tanto en la efectividad terapéutica de *Salmonella* como en la regulación negativa de dichos efectos, nos permitiría avanzar en el desarrollo de cepas mas efectivas con capacidad de generar efectos mas potentes y duraderos.

Estudios recientes de nuestro grupo demostraron que la efectividad terapéutica de *Salmonella* depende de macrófagos y células NK que son fuertemente reclutados hacia el tumor inmediatamente después de la administración intratumoral de la bacteria. En el presente proyecto investigaremos si *Salmonella* induce inmunidad entrenada en dichas poblaciones celulares lo que daría fundamento mecanístico a su relevancia en la terapia. La administración intratumoral de *Salmonella* induce además una rápida polarización en macrófagos infiltrantes de tumor hacia un fenotipo M1 con actividad tumoral, pero luego de varios días esa polarización se pierde coincidiendo con la pérdida de actividad antitumoral. Investigaremos si la autofagia que *Salmonella* induce en macrófagos, explica esa pérdida de polarización M1. Evaluaremos además si una mutante de *Salmonella* que no induce autofagia mejora la efectividad terapéutica.

En su conjunto entendemos que los resultados de este proyecto aportarán a la comprensión mecanística de la actividad de las inmunoterapias basadas en *Salmonella* y permitirán el desarrollo de cepas con mayor efectividad para el tratamiento del cáncer acercando estas inmunoterapias a su aplicación clínica.

Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Inmunología / Inmunoterapias

Palabras clave: Inmunoterapia del cancer / *Salmonella* / Inmunidad entrenada / Autofagia /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Las inmunoterapias para el tratamiento del cáncer han progresado sustantivamente en los últimos años, con la incorporación de nuevas herramientas como los inhibidores de puntos de control o la terapia CAR-T. Sin embargo, y pese a todos estos avances, un porcentaje importante de los pacientes no responden adecuadamente o desarrollan resistencia a algunas de estas terapias, sumado a que son procedimientos con costos extremadamente altos, complejos de implementar y con efectos secundarios muy severos en el caso de las CAR-T [revisado en Robert, 2020; Larson & Maus, 2021]. El uso de bacterias para el tratamiento del cáncer tiene una larga historia. Las descripciones de pacientes con cáncer que entraban en remisión luego de una infección con *Streptococcus pyogenes* se remontan a fines del siglo XIX. Esta estrategia fue adoptada y promovida por William B. Coley, un médico del New York Cancer Hospital, quien durante varios años trató pacientes con cáncer, primero infectándolos con *S. pyogenes* y luego administrando el conjunto de ésta y otra bacteria muerta, en lo que se dio en llamar la toxina de Coley. Si bien esos trabajos fueron luego interrumpidos por sus efectos tóxicos y el surgimiento de radioterapia y quimioterapia, igualmente se considera a Coley el padre de la inmunoterapia del cáncer. En tiempos mas cercanos, el uso de la BCG (*Mycobacterium bovis*) en concentraciones muy superiores a las usadas para vacunar contra tuberculosis se convirtió en la primera inmunoterapia moderna para el tratamiento de cáncer de vejiga [revisado en Alexandroff, 1999] y lleva ya mas de 40 años ininterrumpidos de uso en la clínica. En las dos últimas décadas

ha surgido un renovado interés en el uso de agentes microbianos (bacterias y virus) para el desarrollo de nuevas inmunoterapias en cáncer, con algunos hitos especiales como fue la aprobación de la primer terapéutica viral para el tratamiento local de lesiones irresecables en pacientes con melanoma [Amgen press release, 2015], y numerosos ensayos clínicos en curso con candidatos bacterianos y virales. Recientemente, se reevaluaron los antecedentes y posibilidades futuras del uso de terapias microbianas para el tratamiento del cáncer generándose un reporte de expertos (White paper) [Forbes, 2018] y en 2019 se abrió un nuevo programa del NIH con llamados específicos a proyectos sobre “Microbial-based Cancer Therapy -Bugs as Drugs”, demostrando el interés que suscitan estos desarrollos. En ese contexto, hace ya más de dos décadas se ha ido generando un cúmulo importante de trabajos reportando el uso de *Salmonella* para terapias del cáncer, usándola tanto como vector para moléculas relevantes (citoquinas, antígenos específicos del cáncer, enzimas convertidoras de prodrogas, RNAi para interferir con puntos de control inmunológicos, etc.), así también como agente oncolítico [revisado en Moreno, 2010; Hernández-Luna, 2018; Pangilinan, 2019] que ameritaron incluso el desarrollo de ensayos clínicos en varios tipos de cáncer. Nuestro grupo ha venido trabajando intensamente en el área por varios años con aproximaciones diversas. Utilizando una cepa atenuada de *Salmonella* Typhimurium (LVR01) construida especialmente en nuestros laboratorios, hemos demostrado que una inmunoterapia oral con *Salmonella* portando genes de citoquinas es efectiva para la terapia de melanoma [Agorio, 2007], así como que la administración intratumoral de *Salmonella* en terapia neoadyuvante combinada con un vector de Semliki Forest virus expresando IL-12 es capaz de eliminar las metástasis en cáncer de mama [Kramer, 2015], o que la administración intratumoral de *Salmonella* mejora la efectividad de agonistas de TLR de uso clínico en melanoma [Vola, 2018]. Igualmente demostramos fuerte actividad antitumoral de la administración intratumoral de *Salmonella* LVR01 en animales con linfoma No-Hodgkin (NHL) [Grille, 2013; Grille, 2014]. Más recientemente demostramos su eficacia como terapia neoadyuvante en animales con NHL y melanoma bajo tratamientos quimioterapéuticos [Bascuas, 2018; Chilibraste, en revisión]. Sin embargo, más allá de lo promisorio de los resultados obtenidos por nosotros y otros varios grupos en el mundo, es claro que los efectos inducidos por *Salmonella* en modelos experimentales en general son transitorios y salvo excepciones, no se obtiene remisión completa, y todavía no han sido transferidos a la clínica. Una comprensión mayor de los efectores moleculares y celulares involucrados tanto en la efectividad terapéutica de *Salmonella*, como en la regulación negativa de dichos efectos que determina lo parcial de la misma, nos permitiría avanzar en el desarrollo de cepas más efectivas con capacidad de generar efectos más potentes y duraderos que puedan avanzar hacia su aplicación clínica. En ese sentido, en estudios recientes de nuestro grupo hemos demostrado que la efectividad terapéutica de la administración intratumoral de LVR01 es dependiente de macrófagos y células NK que son fuertemente reclutados hacia el tumor inmediatamente después de la administración de la bacteria [Mónaco, enviado a revisión], resultados que sientan la base para las hipótesis de investigación planteadas en el presente proyecto.

En los últimos años se ha evidenciado que vacunas basadas en bacterias y/o virus atenuados pueden inducir efectos no específicos de protección contra otras patologías infecciosas y no-infecciosas. En particular, estudios epidemiológicos iniciales con la vacuna BCG contra la tuberculosis demostraban que la misma inducía protección no específica contra patógenos no relacionados [Ponnighaus, 1992; Garly, 2003; Stensballe, 2005; Aaby, 2011]. Mecánicamente, sucedía que monocitos de pacientes vacunados con BCG respondían más potentemente frente a un estímulo no-relacionado (*Candida albicans*) [Wout, 1992]. Estudios posteriores de los Dres. Netea y Joosten de la Radboud Universiteit (Nijmegen, Países Bajos), demostraron que estos efectos son el resultado de modificaciones funcionales inducidas por organismos atenuados o algunos de sus componentes, vía reprogramación metabólica y epigenética en células de la inmunidad innata tanto de la línea mieloide (monocito, macrófagos, células dendríticas) como linfoide (células NK, células linfoides innatas), que les permiten responder más eficientemente a desafíos no relacionados, un proceso que se denominó inmunidad entrenada [Saeed, 2014; Netea, 2015; Netea, 2016]. Postularon entonces

que la estimulación de la inmunidad entrenada era una alternativa con gran potencial para el desarrollo de terapias adyuvantes en cáncer [Netea, 2017], y demostraron que es un mecanismo crucial detrás de la efectividad terapéutica de la administración vesical de BCG en cáncer de vejiga [van Puffelen, 2020]. Desde hace 2 años hemos iniciado una sólida colaboración con dichos autores para evaluar el rol de la inmunidad entrenada en el desarrollo de nuevas inmunoterapias, demostrando que la administración de un preparado de *Leishmania braziliensis* induce inmunidad entrenada y tiene alta efectividad terapéutica en el modelo experimental de NHL [Manuscrito en preparación]. En base a todos estos antecedentes, en el presente proyecto pretendemos investigar si *Salmonella* induce inmunidad entrenada en células NK y macrófagos reclutados al tumor y esenciales para la actividad terapéutica. Dichos estudios contarán con la colaboración de los Dres. Joosten y Netea para análisis de la inmunidad entrenada potencialmente inducida por *Salmonella* en los modelos de melanoma y NHL (ver carta de colaboración).

De igual manera, en sustento a las hipótesis planteadas en el presente proyecto, nuestros estudios recientes también demostraron que la administración intratumoral de *Salmonella* induce una rápida polarización en macrófagos infiltrantes de tumor hacia un fenotipo M1 con actividad tumoral, pero que luego de varios días esa polarización se pierde coincidiendo con la pérdida de la actividad antitumoral [Mónaco, enviado a revisión]. *Salmonella* induce autofagia células tumorales [Lee, 2014; Liu, 2016] y en macrófagos [Hernández, 2003; Birmingham, 2005] y en otros estudios recientes se ha demostrado que la inhibición farmacológica de la autofagia induce un cambio en macrófagos asociados a tumor de un fenotipo M2 pro-tumoral a uno M1 anti-tumoral [Chen, 2018]. En función de todos estos antecedentes, planteamos evaluar si la autofagia inducida por *Salmonella* está involucrada en la pérdida de polarización a fenotipo M1 en macrófagos infiltrantes de tumor y por ende relacionado con lo transitorio del efecto antitumoral observado. Se ha demostrado que la inducción de autofagia en macrófagos por *Salmonella* es dependiente de SipB, una proteína que la bacteria inyecta en las células del hospedador vía el sistema de secreción tipo III de la isla de patogenicidad 1 [Hernández, 2003]. Hemos construido un mutante de LVR01 SipB- y pretendemos evaluar la influencia de esta cepa en el fenotipo de los macrófagos infiltrantes de tumor y su actividad antitumoral. Por otro lado, es sabido que el rol de la autofagia en cáncer es dual [Towers, 2020], y contrariamente a lo anterior, se ha demostrado que la autofagia contribuye a la inmunidad entrenada inducida por BCG y a la efectividad de la terapia en cáncer de vejiga, ya que la inhibición farmacológica de la autofagia bloquea la reprogramación epigenética inducida por BCG, inhibiendo su actividad antitumoral [Buffen, 2014]. Con esos dos antecedentes opuestos, investigaremos el rol de la autofagia en las inmunoterapias basadas en *Salmonella*, evaluando la efectividad de la terapia en presencia de inhibidores o promotores de la autofagia en dos modelos diferentes de cáncer.

En su conjunto entendemos que los resultados de este proyecto aportarán a la comprensión mecanística de la efectividad de las inmunoterapias basadas en *Salmonella* y permitirán el desarrollo de cepas con mayor efectividad para el tratamiento del cáncer acercando esta aproximación a su aplicación clínica.

Metodología/Diseño del estudio

La metodología utilizada involucró el uso de modelos experimentales de cáncer (ratones con tumor implantado), y el análisis exhaustivo de la respuesta inmune innata sistémica. Se analizaron muestras de sangre, medula ósea y tumores, utilizando ensayos in vivo (muestras tomadas del animal y analizadas directamente), ensayos ex vivo (muestras tomadas del animal y externamente sometidas a diversas condiciones experimentales antes de ser analizadas) e in vitro (células derivadas de muestras animales adaptadas a crecimiento in vitro, analizadas luego de ser sometidas a diversas condiciones experimentales). Igualmente se realizó evaluación de la efectividad antitumoral en las diversas condiciones estudiadas (inducción de inmunidad entrenada in vivo a corto y largo plazo, inhibición de la autofagia, entre otras), evaluando el crecimiento tumoral (medido día de por medio con calibres especiales) y la sobrevida

global de los animales con tumor. Al respecto de esto último es importante aclarar que la medida de sobrevida es tomada por muerte directa del animal, o por eutanasia de los mismos cuando el tumor alcanzaba los tamaños máximos permitidos según las regulaciones de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal, adonde todos los protocolos de experimentación deben ser enviados para su aprobación previo al comienzo de los experimentos.

Resultados, análisis y discusión

Los resultados principales obtenidos durante el proyecto son:

- Salmonella incrementa la producción de citoquinas proinflamatorias en células de médula ósea. Durante dichos estudios se logró identificar a las células de linaje mieloide como las responsables de producir TNF α .
- La administración de Salmonella induce cambios en células de la inmunidad innata que resultan en actividad antitumoral cuando los tumores son implantados a posteriori. Esta actividad se demostró en modelos preclínicos tanto de melanoma como de linfoma no-Hodgkin implantados 7 y hasta 30 días posteriores a la terapia con Salmonella.
- Salmonella induce tolerancia en monocitos periféricos humanos analizados in vitro. Este mismo efecto de tolerancia lo observamos también usando Salmonella inactivada por calor en ratones.
- Un resultado no esperado y sorprendente fue que la inhibición de la autofagia in vivo en modelos preclínicos de melanoma no afecta el efecto antitumoral de Salmonella. Este resultado nos llevó a definir nuevas estrategias de análisis que ya estamos comenzando a realizar por fuera de los alcances del presente proyecto.

Un resultado adicional fue que el proyecto nos permitió dar solidez a la colaboración con investigadores de Radboud Universiteit (Nijmegen, Países Bajos), colaboración que continúa con posterioridad al presente proyecto.

Conclusiones y recomendaciones

El proyecto permitió avanzar en el conocimiento de las bases celulares y moleculares del efecto antitumoral de la inmunoterapia con Salmonella, y en base a ellos delinear hipótesis más claras de por qué dicho efecto es potente pero transitorio. Las principales conclusiones basadas en los resultados obtenidos son:

- 1) Salmonella modula la respuesta inmune innata generando un precondicionamiento de la misma que le permite inducir una respuesta inmune antitumoral en desafíos posteriores. Esto es un efecto que tiene similitudes con el fenómeno de inmunidad entrenada planteado en la hipótesis de partida del proyecto.
- 2) Sin embargo al mismo tiempo, la administración de Salmonella genera una modulación en monocitos con características clara de parálisis inmune. Este resultado es antagónico del anterior, y podría servir para explicar el efecto transitorio de la inmunoterapia con Salmonella, fenómeno que ha sido observado tanto por nosotros como por otros equipos de investigación en esta área.
- 3) La autofagia inducida por Salmonella no parece tener un rol en la actividad antitumoral de la misma.

Como recomendación principal se entiende que es necesario seguir estudiando estos fenómenos. Para ello ya nos encontramos diseñando un estudio para evaluar las modificaciones epigenéticas inducidas por *Salmonella* en el microambiente tumoral. Además, nos encontramos diseñando una cepa mutante de *Salmonella* que no exprese LPS en su superficie, para evaluar su efectividad como inmunoterapia, ya que está descrito que el LPS es el principal responsable de generar la parálisis inmune en las células de la inmunidad innata.

Referencias bibliográficas

- Aaby et al., 2011. Randomized trial of BCG vaccination at birth to low-birth-weight children: beneficial nonspecific effects in the neonatal period? *J Infect Dis* 204:245–52.
- Agorio et al., 2007. Live attenuated *Salmonella* as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma. *J Gene Med* 9 (5):416–423.
- Alexandroff et al., 1999. BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet* 353(9165):1689–1694.
- Amgen press release, 2015. <https://www.amgen.com/media/news-releases/2015/10/fda-approves-imlygic-talimogene-laherparepvec-as-first-oncolytic-viral-therapy-in-the-us/>
- Bascuas et al., 2016. A novel non-Hodgkin lymphoma murine model closer to the standard clinical scenario. *J Transl Med* 14(1):323.
- Bascuas et al, 2018. *Salmonella* immunotherapy improves the outcome of CHOP chemotherapy in Non-Hodgkin Lymphoma-bearing mice. *Front Immunol* 9(7).
- Birmingham et al., 2005. Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the *Salmonella*-containing vacuole. *J Biol Chem* 281(16):11374–83.
- Boutajangout et al., 2009. Diminished amyloid-beta burden in Tg2576 mice following a prophylactic oral immunization with a *Salmonella*-based amyloid-beta derivative vaccine. *J Alzheimers Dis* 18(4):961–972.
- Brugnini, 2007. Estudios de la intervención del sistema inmune en la leucemia aguda mieloblástica. Facultad de Ciencias, PEDECIBA Biología - Tesis de Maestría.
- Buffen et al, 2014. Autophagy controls BCG-induced trained immunity and the response to intravesical BCG therapy for bladder cancer. *PLoS Pathog* 10:e1004485.
- Casassa et al., 2019. Autophagy plays a protective role against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Virulence* 10(1):151–165.
- Chabalgoity et al., 1997. Expression and immunogenicity of an *Echinococcus granulosus* fatty acid-binding protein in live attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Infect Immun* 65(6):2402– 2412.
- Chabalgoity et al., 2000. *Salmonella typhimurium* as a basis for a live oral *Echinococcus granulosus* vaccine. *Vaccine* 19(4-5):460–469.
- Chabalgoity et al., 2002. Live bacteria as the basis for immunotherapies against cancer. *Expert Rev Vaccines* 1(4):495–505.
- Chen et al., 2018. Chloroquine modulates antitumor immune response by resetting tumor-associated macrophages toward M1 phenotype. *Nat Comm* 9:873.

Chicote et al., 2020. Cell Death Triggered by the Autophagy Inhibitory Drug 3-Methyladenine in Growing Conditions Proceeds With DNA Damage. doi: 10.3389/fphar.2020.580343

Chilibroste et al. Preclinical evaluation of LVR01 attenuated Salmonella as neoadjuvant intralesional therapy in combination with chemotherapy for melanoma treatment. *J Invest Dermatol (R&R)*.

Coley, 1891. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Ann Surg* 14(3):199-220.

Dai et al., 2016. Systemic application of 3-methyladenine markedly inhibited atherosclerotic lesion in ApoE^{-/-} mice by modulating autophagy, foam cell formation and immune-negative molecules. *Cell Death & Disease* 7:e2498.

Fobes et al., 2018 White paper on microbial anti-cancer therapy and prevention. *J Immunother Cancer* 6(1):78.

Garly et al, 2003. BCG scar and positive tuberculin reaction associated with reduced child mortality in West Africa. A non-specific beneficial effect of BCG? *Vaccine* 21:2782–2790.

Goñi et al., 2005. Mucosal vaccination delays or prevents prion infection via an oral route. *Neuroscience* 133(2):413-421.

Goñi et al., 2008. High titers of mucosal and systemic anti-PrP antibodies abrogate oral prion infection in mucosal-vaccinated mice. *Neuroscience* 153(3):679-86.

Grille et al., 2010. A B-cell lymphoma vaccine using a depot formulation of interleukin-2 induces potent antitumor immunity despite increased numbers of intratumoral regulatory T cells. *Cancer Immunol Immunother* 59(4):519-527.

Grille et al., 2013. A therapeutic vaccine using Salmonella-modified tumor cells combined with interleukin-2 induces enhanced antitumor immunity in B-cell lymphoma. *Leuk Res* 37(3):341-348.

Grille et al., 2014. Salmonella Enterica serovar Typhimurium immunotherapy for B-Cell Lymphoma induces broad antitumor immunity with therapeutic effect. *Immunology* 143(3):428- 437.

Hernández et al., 2003. A Salmonella protein causes macrophage cell death by inducing autophagy. *J Cell Biol* 163(5):1123-31.

Hernández-Luna & Luria-Pérez, 2018. Cancer Immunotherapy: Priming the Host Immune Response with Live Attenuated Salmonella enterica. *J Immunol Res* 2018:2984247.

Kramer et al., 2015. Neoadjuvant administration of Semliki Forest virus expressing interleukin-12 combined with attenuated Salmonella eradicates breast cancer metastasis and achieves long-term survival in immunocompetent mice. *BMC Cancer* 15:620.

Larson, Maus, 2021. Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells. *Nat Rev Cancer* 21:145–161.

Lee et al., 2014. Salmonella induce autophagy in melanoma by the downregulation of AKT/mTOR pathway. *Gene Therapy* 21:309–316.

Lérias et al., 2020. Trained Immunity for Personalized Cancer Immunotherapy: Current Knowledge and Future Opportunities. *Front Microbiol* 10:2924.

Liu et al., 2016. Blockage of autophagy pathway enhances Salmonella tumor-targeting. *Oncotarget* 7(16):22873–22882.

Mitroulis et al., 2018. Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. *Cell* 172(1-2):147-161.

Mónaco et al., 2021. Salmonella Typhimurium Triggers Extracellular Traps Release in Murine Macrophages. *Front Cell Infect Microbiol* 11:639768.

Mónaco et al. Salmonella antitumor effect requires inflammasome activation and macrophage recruitment to tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* (submitted).

Moreno et al., 2010. Salmonella as live trojan horse for vaccine development and cancer gene therapy. *Curr Gene Ther* 10(1):56-76.

Netea et al., 2015. Innate immune memory: a paradigm shift in understanding host defense. *Nat Immunol* 16:675–679.

Netea et al, 2016. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science* 352:aaf1098.

Netea et al., 2017. Hypothesis: Stimulation of Trained Immunity as Adjunctive Immunotherapy in Cancer. *J Leukoc Biol* 102(6):1323-1332.

NIH grants: <https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PAR-19-194.html>, <https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/par-19-193.html>

Pangilinan, Lee, 2019. Salmonella-Based Targeted Cancer Therapy: Updates on A Promising and Innovative Tumor Immunotherapeutic Strategy. *Biomedicine* 7(2):36.

Ponnighaus et al., 1992. Efficacy of BCG vaccine against leprosy and tuberculosis in northern Malawi. *Lancet* 339:636–639.

Robert, 2020. A decade of immune-checkpoint inhibitors in cancer therapy. *Nat Comm* 11:3801. Rosenkranz et al., 2003. Towards new immunotherapies: targeting recombinant cytokines to the immune system using live attenuated Salmonella. *Vaccine* 21(7-8):798-801.

Saeed et al., 2014. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science* 345:1251086.

Stensballe et al., 2005. Acute lower respiratory tract infections and respiratory syncytial virus in infants in Guinea-Bissau: a beneficial effect of BCG vaccination for girls. *Vaccine* 23:1251–1257.

Towers et al., 2020. Autophagy and cancer: Modulation of cell death pathways and cancer cell adaptations. *J Cell Biol* 219(1): e201909033.

van Puffelen et al. 2020. Trained immunity as a molecular mechanism for BCG immunotherapy in bladder cancer. *Nat Rev Urol* 17:513–525.

Vola et al., 2018. TLR7 agonist in combination with Salmonella as an effective anti-melanoma immunotherapy. *Immunotherapy* 10(8):665–679.

Wout et al., 1992. The Role of BCG/PPD-activated macrophages in resistance against systemic candidiasis in mice. *Scand J Immunol* 36:713–7.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)