



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“La expresión de un minianticuerpo anti-TfR1 en la superficie de
Enterobacterias mejora su adhesión a células tumorales humanas
de linfoma no Hodgkin”**

T E S I S

Que presenta

KEVIN JORGE MAGAÑO BOCANEGRA

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

BIOMEDICINA MOLECULAR

Directores de la tesis:

DRA. LETICIA CEDILLO BARRÓN

DR. ROSENDO LURIA PÉREZ

COMITÉ TUTORAL

Directores de tesis:

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Rosendo Luria Pérez

Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, HIMFG

Asesores:

Dr. Leopoldo Santos Argumedo

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Vianney Ortiz Navarrete

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

SOPORTE ACADÉMICO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Leticia Cedillo Barrón del departamento de Biomedicina Molecular perteneciente al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), y en la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas (UIEO) del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) a cargo del Dr. Rosendo Luria Pérez.

Este trabajo recibió financiamiento de Fondos Federales del HIMFG, de los proyectos con registro: HIM/2021/056 SSA 1756 y HIM/2022/061 SSA 1826. Además, durante su realización se contó con la beca número 828951 otorgada por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCYT).

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnologías (CONAHCYT), por haberme otorgado la beca número 828951 durante el periodo 2022-2024 para la realización de este postgrado.

Al Dr. Rosendo Luria Pérez por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación en la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas y por su gran apoyo en mi formación académica y durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Leticia Cedillo por sus enriquecedoras recomendaciones, por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación y por su gran apoyo desde que llegué a México.

Al Dr. Leopoldo Santos y al Dr. Vianney Ortiz por sus valiosas recomendaciones para mi tesis, su orientación ha sido fundamental para mejorar mi trabajo.

A mis compañeros del laboratorio, por haberme apoyado y guiado en la realización de algunos de los experimentos del presente trabajo, así como por hacer del laboratorio un lugar muy agradable.

A mi familia por su apoyo incondicional, sobre todo en los momentos más difíciles. En especial a mis padres, por inculcarme desde temprana edad la importancia del conocimiento y la perseverancia. Sin ustedes este logro no habría sido posible.

ÍNDICE GENERAL

COMITÉ TUTORAL	I
SOPORTE ACADÉMICO	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE GENERAL	IV
LISTA DE FIGURAS	VII
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. LINFOMAS	3
1.2. LINFOMA NO HODGKIN (LNH)	3
1.2.1. CLASIFICACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA	4
1.2.2. PATOFISIOLOGÍA Y GENÉTICA	7
1.2.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICO	8
1.2.4. TRATAMIENTO CONVENCIONAL	9
1.2.5. RECAÍDA, RESISTENCIA Y ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS	10
1.3. TERAPIA BACTERIANA CONTRA EL CÁNCER	12
1.3.1. SALMONELLA ENTERICA EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER	14
1.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA TERAPIA BACTERIANA BASADA EN SALMONELLA	20
1.3.3. COMBINACIÓN DE SALMONELLA CON TRATAMIENTOS ESTÁNDAR	21
1.3.4. ENSAYOS CLÍNICOS EMPLEANDO SALMONELLA ENTERICA	22
1.4. AUTOTRANSPORTADORES BACTERIANOS	23
1.4.1. APLICACIONES DE LOS AUTOTRANSPORTADORES	24
1.4.2. EL PAPEL DE LOS AUTOTRANSPORTADORES EN LA TERAPIA BACTERIANA CONTRA EL CÁNCER	25
1.5. RECEPTOR DE TRANSFERRINA 1 (TfR1 o CD71)	26
1.5.1. EL PAPEL DEL TfR1 EN EL CÁNCER	27
1.5.2. EL TfR1: UN BLANCO TERAPÉUTICO IDEAL EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER	28
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	33
4.1. HIPÓTESIS	33

4.2. OBJETIVO GENERAL	33
4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
<u>5. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	<u>34</u>
5.1. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS	34
5.1.1. <i>MODELAJE MOLECULAR</i>	34
5.1.2. <i>OPTIMIZACIÓN GEOMÉTRICA Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESTEREOQUÍMICA</i>	34
5.1.3. <i>ACOPLAMIENTO MOLECULAR</i>	35
5.2. CONSTRUCCIÓN DE LAS BACTERIAS RECOMBINANTES	35
5.2.1. <i>CEPAS BACTERIANAS Y OLIGONUCLEÓTIDOS</i>	35
5.2.2. <i>CARACTERÍSTICAS DE LOS PLÁSMIDOS EMPLEADOS</i>	36
5.2.3. <i>PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL AUTOTRANSPORTADOR SHDA100 Y DEL scFv ANTI-TFR1 CON SITIOS DE CORTE FLANQUEANTES</i>	38
5.2.4. <i>ESTRATEGIA GENERAL PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS</i>	39
5.2.5. <i>TRANSFORMACIÓN DE ESCHERICHIA COLI</i>	40
5.2.6. <i>SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS</i>	42
5.2.7. <i>CONDICIONES DE CULTIVO E INDUCCIÓN</i>	42
5.2.8. <i>CINÉTICA DE CRECIMIENTO</i>	42
5.3. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN Y TRANSLOCACIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES A LA SUPERFICIE BACTERIANA	43
5.3.1. <i>EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES</i>	43
5.3.2. <i>ENSAYO DE DOT BLOT</i>	43
5.3.3. <i>CITOMETRÍA DE FLUJO E INMUNOFUORESCENCIA</i>	43
5.3.4. <i>CINÉTICA DE EXPRESIÓN</i>	44
5.4. EVALUACIÓN DE LA ADHESIÓN EN CÉLULAS HUMANAS DE LNH	44
5.4.1. <i>EVALUACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE TFR1 EN LA LÍNEA CELULAR RAMOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO</i>	44
5.4.2. <i>EVALUACIÓN DE LA UNIÓN DEL scFv ANTI-TFR1 A LA LÍNEA CELULAR RAMOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO</i>	44
5.4.3. <i>ENSAYOS DE ADHESIÓN BACTERIANA A PROTEÍNAS INMOVILIZADAS DE CÉLULAS RAMOS 45</i>	
<u>6. RESULTADOS</u>	<u>47</u>
6.1. LA SIMULACIÓN DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR ENTRE EL scFv ANTI-TFR1 Y EL TFR1 PREDICE UNA ADECUADA INTERACCIÓN	47
6.2. EL MODELO TRIDIMENSIONAL DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE scFv/FLAG/SHDA100 PREDICE UNA CONFORMACIÓN ADECUADA Y LA TRANSLOCACIÓN DEL scFv-TFR1 A LA SUPERFICIE BACTERIANA A TRAVÉS DEL AUTOTRANSPORTADOR SHDA	49
6.3. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO PNIRBSHDA100	51

6.4. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO <i>PNIRBscFv</i>	54
6.5. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO <i>PNIRBscFvSHDA30</i>	56
6.6. CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO <i>PNIRBscFvSHDA100</i>	58
6.7. LOS PLÁSMIDOS EMPLEADOS NO AFECTAN EL CRECIMIENTO DE <i>E. COLI</i> BL21-DE3 60	
6.8. <i>E. COLI</i> BL21-DE3 RECOMBINANTE EXPRESA Y TRANSLOCA EL scFv-TfR1 EN SU SUPERFICIE	62
6.9. EL scFv ANTI-TfR1 RECONOCE A LA PROTEÍNA TfR1 EN LA LÍNEA CELULAR DE LNH HUMANO RAMOS	66
6.10. <i>E. COLI</i> BL21-DE3 QUE EXPRESA Y TRANSLOCA UN scFv ANTI-TfR1 EN SU SUPERFICIE PRESENTA UNA MAYOR ADHESIÓN A PROTEÍNAS INMOVILIZADAS DE LNH HUMANO (RAMOS)	67
<u>7. DISCUSIÓN</u>	<u>69</u>
<u>8. CONCLUSIÓN</u>	<u>75</u>
<u>9. PERSPECTIVAS</u>	<u>75</u>
<u>10. BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>76</u>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de los linfomas no Hodgkin	4
Figura 2. Frecuencia relativa de los subtipos más comunes de LNH por la edad del diagnóstico	6
Figura 3. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentes en la población mexicana menor de 14 años.....	7
Figura 4. Alternativas terapéuticas en los casos de recaída de LNH	11
Figura 5. Mecanismos biológicos bacterianos intrínsecos y modificaciones genéticas que favorecen la terapia bacteriana contra el cáncer.....	14
Figura 6. <i>Salmonella enterica</i> atenuada presenta selectividad tumoral y actividad antitumoral intrínseca	16
Figura 7. <i>Salmonella enterica</i> atenuada promueve la muerte de las células tumorales.....	17
Figura 8. <i>Salmonella enterica</i> atenuada estimula la inmunidad antitumoral innata y adaptativa en el microambiente tumoral.....	19
Figura 9. Principales dominios estructurales que conforman a los autotransportadores	24
Figura 10. Estrategia para la expresión de proteínas heterólogas en la superficie bacteriana utilizando autotransportadores	25
Figura 11. Estructura del receptor de TfR1 humano y su unión a la holotransferrina	27
Figura 12. Estrategias empleadas para focalizar fármacos a células tumorales empleando anticuerpos y scFv anti-TfR1	29
Figura 13. Proteínas recombinantes expresadas por los plásmidos propuestos..	36
Figura 14. Estructura del plásmido <i>pnirBShdA30</i>	38
Figura 15. Estrategia general de construcción de los plásmidos.....	41
Figura 16. Ensayo de adhesión bacteriana a proteínas inmovilizadas de células Ramos.....	46
Figura 17. Modelaje y análisis de la estructura tridimensional del scFv anti-TfR1	47
Figura 18. Simulación de acoplamiento molecular entre la estructura del TfR1 humano y el scFv anti-TfR1.....	48

Figura 19. Modelaje, análisis y simulación de la inserción a la membrana externa de <i>E. coli</i> de la proteína scFv/FLAG/ShdA100	50
Figura 20. Caracterización del plásmido <i>pnirBShdA30</i>	51
Figura 21. Obtención del fragmento que codifica al autotransportador ShdA100 flanqueado por los sitios de restricción NheI y BamHI	52
Figura 22. Construcción y caracterización del plásmido <i>pnirBShdA100</i>	53
Figura 23. Obtención del fragmento que codifica al scFv anti-TfR1 flanqueado por los sitios de restricción XbaI y BamHI	54
Figura 24. Construcción y caracterización del plásmido <i>pnirBscFv</i>	55
Figura 25. Obtención del fragmento que codifica al scFv anti-TfR1 flanqueado por los sitios de restricción HindIII y XhoI.....	56
Figura 26. Construcción y caracterización del plásmido <i>pnirBscFvShdA30</i>	57
Figura 27. Construcción y caracterización del plásmido <i>pnirBscFvShdA100</i>	59
Figura 28. Cinética de crecimiento bacteriano en medio BHI y en medio de tioglicolato	61
Figura 29. Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes FLAG/scFv, FLAG/ShdA30, scFv/FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100 y scFv/FLAG/ShdA100 por dot blot	62
Figura 30. Evaluación de la expresión y translocación a la superficie bacteriana de las proteínas recombinantes FLAG/scFv, FLAG/ShdA30, scFv/FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100 y scFv/FLAG/ShdA100 por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo	64
Figura 31. Cinética de expresión y translocación de las proteínas recombinantes FLAG/scFv, FLAG/ShdA30, scFv/FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100 y scFv/FLAG/ShdA100 a 6, 8, 10 y 12 horas, evaluada por citometría de flujo	65
Figura 32. Evaluación del reconocimiento del TfR1 en células Ramos por el scFv anti-TfR1 empleando citometría de flujo.....	66
Figura 33. Evaluación de la adhesión de <i>E. coli</i> BL21-DE3 recombinante que expresa las proteínas recombinantes FLAG/scFv, FLAG/ShdA30, scFv/FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100 y scFv/FLAG/ShdA100 a proteínas inmovilizadas de células Ramos	68
Figura 34. La expresión y translocación de un scFv anti-TfR1 en la superficie bacteriana mejora la adhesión de <i>Escherichia coli</i> a células de LNH humano (Ramos).....	70

RESUMEN

En las últimas décadas la optimización del tratamiento del linfoma no Hodgkin (LNH) ha elevado la tasa de supervivencia. Sin embargo, en un 30% de los pacientes los tratamientos fallan, por lo que es evidente la necesidad de tratamientos más efectivos. En este contexto, la terapia bacteriana contra el cáncer empleando vectores bacterianos atenuados representa una estrategia terapéutica novedosa y prometedora para el tratamiento del LNH. Sin embargo, se ha observado inconsistencia en la colonización tumoral en ensayos clínicos, lo cual ha tenido repercusiones en su uso en pacientes. En este trabajo se presenta el diseño, construcción y evaluación de un sistema que mejora la adhesión bacteriana hacia células de LNH humanas, que sobreexpresan el receptor de transferrina 1 (TfR1), mediante la expresión y translocación de un minianticuerpo anti-TfR1 (scFv anti-TfR1) en la superficie bacteriana por medio del autotransportador ShdA. Esta novedosa estrategia permitirá mejorar el establecimiento bacteriano en tumores favoreciendo su actividad anti-tumoral. Mediante análisis bioinformático estructural se observó una adecuada unión entre el scFv anti-TfR1 y el TfR1, así como el correcto plegamiento de las proteínas recombinantes que permite la translocación del scFv anti-TfR1 en la superficie bacteriana. Mediante tecnología del ADN recombinante se construyeron los plásmidos que codifican para las proteínas scFv/FLAG/ShdA30 y scFv/FLAG/ShdA100 que permiten la expresión del scFv-TfR1 en la superficie bacteriana. La expresión y translocación de las proteínas recombinantes en la superficie bacteriana fue demostrada por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Finalmente, se evaluó la adhesión de las bacterias recombinantes a proteínas inmovilizadas obtenidas de células Ramos (LNH) que sobreexpresan TfR1, observándose una mayor adhesión en las bacterias que expresan el scFv anti-TfR1 en su superficie (scFv/FLAG/ShdA30 y scFv/FLAG/ShdA100). En conclusión, la expresión de un scFv-TfR1 en la superficie bacteriana favorece su adhesión a la línea celular Ramos de LNH humano.

ABSTRACT

Optimization of non-Hodgkin lymphoma (NHL) treatment has significantly increased survival rates in recent decades. However, treatments fail in approximately 30% of patients, underscoring the need for more effective therapies. In this context, bacterial cancer therapy using attenuated bacterial vectors represents a novel and promising strategy for NHL treatment. Nevertheless, inconsistencies in tumor colonization observed in clinical trials have hindered its application in patients. This study presents the design, construction, and evaluation of a system that enhances bacterial adhesion to human NHL cells, which overexpress the transferrin receptor 1 (TfR1), by expressing and translocating an anti-TfR1 mini-antibody (scFv anti-TfR1) on the bacterial surface via the ShdA autotransporter. This novel strategy aims to improve bacterial establishment in tumors, thereby enhancing their anti-tumor activity. Structural bioinformatics analysis indicated adequate binding between the scFv anti-TfR1 and TfR1, as well as proper folding of the recombinant proteins, facilitating the translocation of scFv anti-TfR1 on the bacterial surface. Using recombinant DNA technology, plasmids encoding the scFv/FLAG/ShdA30 and scFv/FLAG/ShdA100 proteins were constructed, allowing the expression of scFv-TfR1 on the bacterial surface. The expression and translocation of the recombinant proteins on the bacterial surface were demonstrated by flow cytometry and fluorescence microscopy. Finally, the adhesion of recombinant bacteria to immobilized proteins from Ramos cells (NHL) overexpressing TfR1 was evaluated, showing greater adhesion in bacteria expressing scFv anti-TfR1 on their surface (scFv/FLAG/ShdA30 y scFv/FLAG/ShdA100). In conclusion, the expression of scFv-TfR1 on the bacterial surface enhances its adhesion to the human NHL Ramos cell line.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Linfomas

Los linfomas son un grupo heterogéneo de neoplasias linfoides con cerca de 100 variantes que se originan a partir de la proliferación clonal de linfocitos inmaduros o maduros (B, T o NK arrestados en diferentes etapas de diferenciación) produciendo tumores en ganglios linfáticos, órganos linfoides, tejido linfoide extraganglionar y médula ósea (Swerdlow et al., 2016). Estos representan aproximadamente el 5% de las neoplasias malignas y se estima que presentan una sobrevida global del 72% a los 5 años (Mugnaini & Ghosh, 2016).

Los linfomas se clasifican en linfomas de Hodgkin (LH, 10%) y linfomas no Hodgkin (LNH, 90%). Los LH se originan a partir de linfocitos B y se caracterizan por la presencia de células de Reed-Sternberg. Estas células son anormalmente grandes y por lo general multinucleadas o de núcleo bilobulado dando una apariencia de “ojos de búho”, positivas para CD30 y CD15. Su incidencia es mayor en adolescentes y jóvenes adultos, y menor en personas de edad avanzada. Se clasifican en LH clásico y LH ganglionar con predominio linfocítico o no clásico (Connors et al., 2020). Los LNH engloban al resto de linfomas que no son clasificados como LH y se clasifican de acuerdo al tipo celular de origen (B, T o NK).

Asimismo, los linfomas también se pueden clasificar de acuerdo a su agresividad (alto o bajo grado) (Jamil & Mukkamalla, 2020). Por lo general, los linfomas de bajo grado conllevan un menor riesgo en ausencia de tratamiento por su lento crecimiento y baja tasa de proliferación; no obstante, son menos susceptibles a la quimioterapia y radioterapia (Mugnaini & Ghosh, 2016). Además, algunos linfomas de bajo grado como el linfoma linfocítico pequeño (SLL) pueden transformarse en linfomas agresivos o de alto grado como el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL), proceso denominado síndrome de Richter, en una frecuencia de aproximadamente del 2 al 10% (Douglas, 2022).

1.2. Linfoma no Hodgkin (LNH)

Los LNH representan aproximadamente el 90% de los linfomas diagnosticados y presentan una amplia variedad de apariencias histopatológicas y presentaciones

clínicas que dificultan su diagnóstico. Estos surgen a partir de linfocitos en sus diversas etapas de desarrollo y las características del subtipo de LNH específico reflejan las de la célula de la que se originaron (Armitage, et al., 2017).

1.2.1. Clasificación y epidemiología

Tanto el diagnóstico como la clasificación de los LNH se basa predominantemente en la morfología celular, el inmunofenotipo, la citogenética y las características clínicas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los LNH de acuerdo al origen celular (T, B o NK) y al grado de diferenciación (precursor o maduro) (Figura 1) (Dey, 2021).



Figura 1. Clasificación de los linfomas no Hodgkin. La clasificación de los LNH se basa principalmente en el origen celular (linfocitos B, T o NK) y el grado de diferenciación (células precursoras o maduras). Modificado de Dey, 2021.

Según los datos más recientes de la base de datos Global cancer observatory (GLOBOCAN), en el 2022 se diagnosticaron 553,389 casos nuevos y 250,679 muertes por LNH. Asimismo, se ha reportado que el LNH es más común en países

con un índice de desarrollo humano alto y en la población masculina (Thandra et al., 2021). La OMS reporta que el LNH más común en países occidentales es el DLBCL, representando hasta el 31% de los casos diagnosticados en adultos. Los linfomas de células T solo representan del 10 al 15% de los casos reportados, siendo los más comunes el linfoma de células T periféricas (PTCL, 6%) y el linfoma cutáneo de células T (CTCL, 4%) (De Leval Y Jaffer, 2020).

En las últimas décadas la sobrevivencia a 5 años de los pacientes con LNH ha mejorado de manera significativa, subiendo de un 46% en 1975 hasta un 72.7% en 2016 (Thandra et al., 2021). Esta mejoría se debe principalmente al avance progresivo en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más efectivas y específicas para los diferentes subtipos de LNH, incluyendo a la quimioterapia combinada, la inmunoterapia y la terapia dirigida que han llevado a mejores respuestas y mayores tasas de curación (Shankland et al., 2012).

La frecuencia de LNH diagnosticado aumenta de manera proporcional con la edad de los pacientes. La frecuencia anual en los Estados Unidos para los pacientes pediátricos (menores de 16 años), adolescentes y jóvenes adultos (16 a 39 años), y adultos mayores (mayores de 40 años) es de 0.5 a 1.2 por 100,000; 1.8 a 7.2 por 100,000 y 10.5 a 16.4 por 100,000; respectivamente (Wood & Lee, 2011). Asimismo, la incidencia de los LNH pediátricos ha incrementado progresivamente en las últimas décadas, no obstante, la razón de este incremento a largo plazo no está completamente claro y puede variar según la región y el subtipo (Shankland et al., 2012).

La población pediátrica frecuentemente presenta LNH de alto grado como el DLBCL, el linfoma de Burkitt (BL), el linfoma linfoblástico (LBL) y el linfoma anaplásico de células grandes (ALCL). Mientras que los subtipos histológicos de bajo grado como el linfoma de células B de la zona marginal (MZL) y el linfoma folicular (FL), son más frecuentes en adultos (Figura 2) (Jaglowski et al., 2009). Asimismo, los resultados del tratamiento para los pacientes con LNH recién diagnosticado son generalmente mejores para el grupo de edad pediátrica con respecto a los pacientes adolescentes, jóvenes adultos y adultos mayores. Estas

diferencias se han relacionado con la condición médica general de los pacientes, los subtipos biológicos específicos de LNH y aspectos sociológicos propios de cada grupo de edad (Sandlund & Martin, 2016).

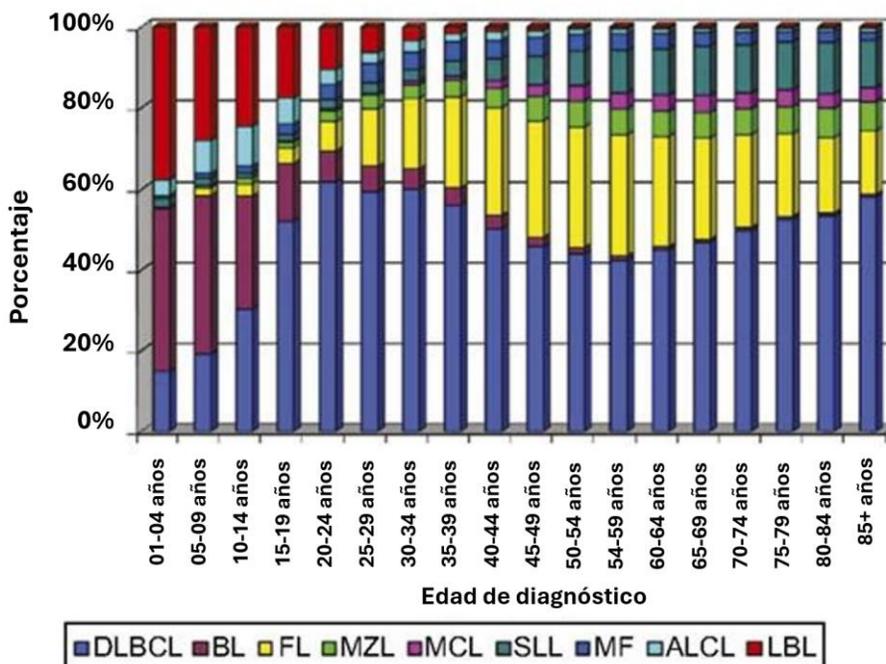


Figura 2. Frecuencia relativa de los subtipos más comunes de LNH por la edad del diagnóstico. Los subtipos de LNH de alto grado como el DLBCL, el BL, el LBL y el ALCL, son más comunes a edades tempranas. Mientras que los subtipos de LNH de bajo grado como el MZL y el FL, son más comunes en la población adulta. DLBCL: Linfoma difuso de células B grandes, BL: Linfoma de Burkitt, FL: Linfoma folicular, MZL: Linfoma de la zona marginal, MCL: Linfoma de células del manto, SLL: Linfoma linfocítico pequeño, MF: Micosis fungoide, ALCL: Linfoma anaplásico de células grandes y LBL: Linfoma linfoblástico. Modificado Jaglowski et al., 2009.

En México, los LNH se ubican como uno de los tipos de cáncer más frecuentes, con una tendencia a la alza desde la década de 1990, principalmente en la población pediátrica, siendo una de las principales causas de muerte en la población infantil (Escamilla-Santiago et al., 2012) (Figura 3). Reportes de estudios multicéntricos de diferentes instituciones de salud y recopilados por la Secretaría de Salud de México indican que los LNH ocupan el tercer lugar entre las neoplasias malignas atendidas en niños menores de 14 años, con una frecuencia de aproximadamente 8% (Fajardo-Gutiérrez et al., 1996).

Si bien en la actualidad no se conoce la etiología exacta de los linfomas, hay numerosos factores de riesgo reportados que predisponen a su desarrollo (Matasar

& Zelenetz, 2008). Entre los factores de riesgo no modificables se encuentran la edad (más del 57% de los casos en pacientes mayores de 65 años), el género (los hombres presentan el doble de riesgo acumulado), la etnia (más común en personas caucásicas), antecedentes familiares de neoplasias hematológicas, enfermedades autoinmunes e inmunosupresión (Thandra et al., 2021). Dentro de los factores de riesgo modificables se incluyen la exposición química, la exposición a la radiación, la obesidad, el tabaquismo, el consumo de alcohol, los implantes mamarios y la deficiencia de vitamina D (Lenz & Staudt, 2010). Asimismo, se ha asociado el desarrollo de tipos específicos de linfomas con procesos infecciosos causados por *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia psittaci*, *Campylobacter jejuni*, el virus linfotrópico de células T humanas, la hepatitis C, el hepesvirus humano 8, el virus Epstein-Barr y el citomegalovirus (Mugnaini & Ghosh, 2016).

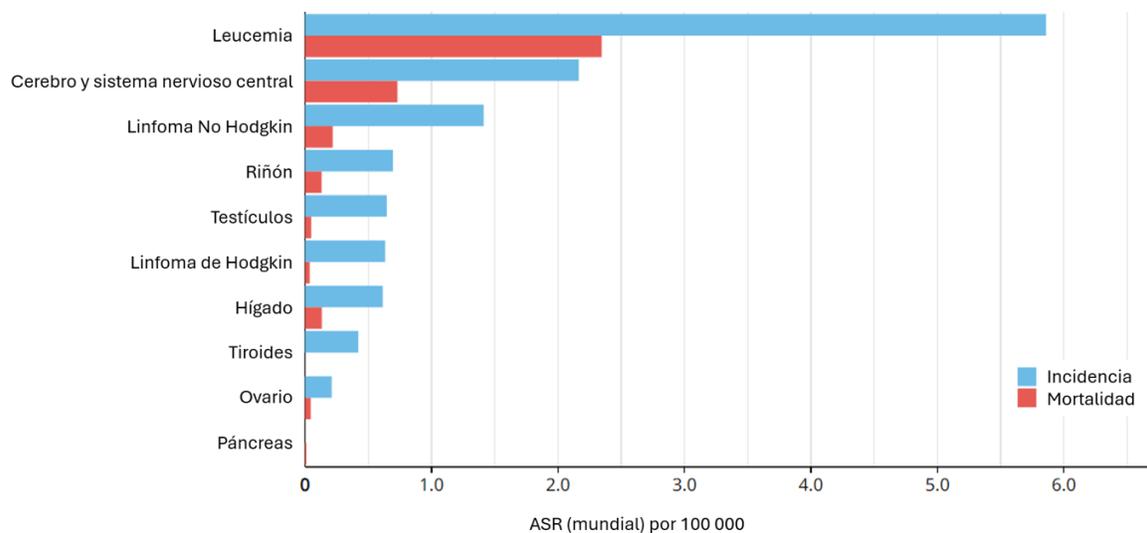


Figura 3. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentes en la población mexicana menor de 14 años. La leucemia, los tumores del sistema nervioso central y los LNH representan las principales causas de muerte por cáncer en la población pediátrica mexicana. Tasa estandarizada por edad (ASR). Globocan 2020.

1.2.2. Patofisiología y genética

Los mecanismos por los que se pueden desarrollar los linfomas están correlacionados con eventos genéticos que ocurren durante la maduración o la activación de los linfocitos, como las recombinación V(D)J, la conmutación de clase y la hipermutación somática (Jung et al., 2006). Normalmente, las rupturas del DNA generadas durante la recombinación son reparadas; no obstante, en algunos casos,

la reparación puede fallar. Estos defectos en la reparación pueden ser la causa de translocaciones cromosómicas que promueven la transformación maligna y el desarrollo de los linfomas a través la activación de protooncogenes (Shankland et al., 2012). Por ejemplo, la translocación t(14;18)(q32;q21) asociada al FL promueve la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica BCL2, y la translocación t(8;14)(q24;q32), característica del BL, resulta en la sobreexpresión del oncogén MYC, causando una proliferación celular descontrolada (Ma, 2017).

En los últimos años, el conocimiento adquirido del perfil transcripcional y la secuenciación del genoma de los linfomas ha permitido desarrollar una subclasificación molecular (Armitage, et al., 2017). Por ejemplo, el DLBCL se ha dividido en dos grupos moleculares conocidos como subtipo de células B del centro germinal y subtipo de células B activadas. Esto ha dado a conocer que las características moleculares de los linfomas están íntimamente correlacionadas con la supervivencia, la progresión y la elección de un tratamiento más eficiente. Por lo tanto, en la actualidad se están realizando esfuerzos para llevar a cabo una disección molecular en todo el espectro de los LNH (Weber & Schmitz, 2022).

Asimismo, algunas de las alteraciones más comúnmente encontradas en los LNH se encuentran en genes que promueven la supervivencia celular (CDKN2A y JAK-STAT), en genes que inhiben la muerte celular (BCL2 y MCL1), vías de señalización que promueven la tumorigenicidad, el escape del sistema inmune y en genes responsables de la remodelación de la cromatina (Armitage, et al., 2017).

1.2.3. Características clínicas y diagnóstico

Al ser un grupo de neoplasias tan variadas, los LNH presentan una gran diversidad de características clínicas. La mayoría de los pacientes con LNH presentan linfadenopatía indolora junto a síntomas sistémicos como fiebre, sudores nocturnos, fatiga, prurito y pérdida de peso (Shankland et al., 2012).

El diagnóstico oportuno es importante debido a que en la actualidad existen terapias eficaces que, a menudo, favorecen la curación (Sandlund & Martin, 2016). El diagnóstico debe sustentarse en los resultados obtenidos del análisis histopatológico de una biopsia proveniente de un ganglio linfático afectado.

Asimismo, la obtención de una cantidad suficiente de tejido tumoral también permitirá estudios inmunohistoquímicos y genéticos que aumentarán la posibilidad de un diagnóstico correcto, un pronóstico más preciso y, por ende, un tratamiento más adecuado. También se puede optar por la biopsia de médula ósea para detectar si esta se encuentra afectada (Reiter, 2007).

Posterior al diagnóstico, la imagenología, mediante tomografía computarizada combinada con tomografía por emisión de positrones (PET-TC), es la modalidad más adecuada para identificar el estadio de la enfermedad en un paciente, así como para predecir la sobrevida libre de enfermedad posterior al tratamiento (Junco et al., 2011).

1.2.4. Tratamiento convencional

En las últimas décadas, el tratamiento LNH ha mejorado considerablemente debido a la incorporación de nuevas estrategias terapéuticas basadas en un mejor entendimiento de su biología y patofisiología. Los diversos tipos y subtipos de LNH, con diferentes características moleculares y clínicas, requieren un abordaje terapéutico personalizado para optimizar los resultados.

El esquema estándar de quimioterapia para el tratamiento del LNH es CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona). Este esquema se emplea principalmente en el tratamiento de LNH de células B agresivos, especialmente el DLBCL, ya que, debido a sus características, se considera que, al momento del diagnóstico, se encuentran ampliamente diseminados, incluso cuando el tumor está aparentemente localizado (Shankland et al., 2012; Sandlund et al., 1996). La combinación de estos agentes permite un ataque más robusto contra las células tumorales, logrando tasas de respuesta bastante significativas. En algunos casos este esquema se combina con el anticuerpo monoclonal Rituximab dirigido a CD20, inmunoquimioterapia denominada R-CHOP. Esta combinación ha mejorado significativamente la sobrevida libre de enfermedad y la sobrevida global en pacientes con DLBCL. Adicionalmente, se puede implementar la radioterapia como tratamiento adyuvante en casos localizados, cuando no hay una respuesta completa

a la quimioterapia, o como tratamiento paliativo para reducir el volumen de la masas tumoral, aliviando los síntomas (Bluhm et al., 2008).

La combinación de los quimioterapéuticos empleados, así como la dosis y la duración del tratamiento dependen del subtipo histológico y del estadio de la enfermedad. Por ejemplo, se ha reportado que terapias más prolongadas son más efectivas en el linfoma linfoblástico agudo, mientras que en pacientes con linfoma de Burkitt los resultados son mejores con una terapia corta, intensiva y pulsada (Anderson et al., 1993; NCI, 2016).

1.2.5. Recaída, resistencia y alternativas terapéuticas

Si bien los tratamientos estándar como la inmunquimioterapia con R-CHOP han mejorado en gran medida la sobrevida de los pacientes con LNH, alcanzando una tasa de respuesta de entre el 70 al 80%, aún hay una población entre el 30 y el 40% de los pacientes que muestran una mala respuesta al tratamiento o desarrollan resistencia. Este grupo de pacientes presenta un mal pronóstico y una sobrevida a 2 años del 20% al 40% (Batgi et al., 2020; Klener & Klanova, 2020).

El desarrollo de resistencia se ha relacionado con todos los tipos de tratamiento en los LNH, incluidas las combinaciones de estos. Esta se puede presentar como resistencia inherente o resistencia adquirida (Klener & Klanova, 2020). La resistencia inherente se debe a factores preexistentes que impiden la acción del agente antitumoral; por lo tanto, en estos casos se observa una falta de respuesta desde el inicio del tratamiento. Mientras que la resistencia adquirida se desarrolla durante el tratamiento, y estos casos se asocian con una respuesta significativa al inicio del tratamiento, lo cual implica la eliminación de las células sensibles, con una consiguiente recaída y progresión del LNH resistente (Wang et al., 2019). En estas circunstancias, las opciones terapéuticas se vuelven bastante limitadas y no se encuentran óptimamente definidas. En muchos casos, el foco central de las opciones terapéuticas son cuidados paliativos que aseguran una adecuada calidad de vida y la reducción de los síntomas y el estrés de la enfermedad terminal (NCI, 2016).

Dentro de las opciones terapéuticas en caso de enfermedad recidivante en pacientes con LNH se encuentra la megaquimioterapia, quimioterapia de rescate por reinducción de vinblastina, el alotrasplante de células troncales hematopoyéticas, entre otras. No obstante, estas opciones terapéuticas presentan tasas de éxito y sobrevida muy reducidas (Derebas et al., 2022).

En los últimos años, se han implementado nuevas opciones terapéuticas como el uso de anticuerpos monoclonales (obituzumab, inotuzumab, pembrolizumab, nivolumab, rituximab, entre otros), terapias dirigidas (bortezomib, ibrutinib, crizotinib, alectinib, ceritinib, buparlisib, ibrutinib, ruxolitinib, navitoclax, venetoclax, entre otros) y la inmunoterapia con células T con receptores de antígeno quimérico (CAR-T) (Derebas et al., 2022) (Figura 4). Sin embargo, estos tratamientos presentan importantes limitaciones tales como una farmacocinética inadecuada, una accesibilidad pobre a tejido tumoral y costos muy elevados (Chames et al., 2009).

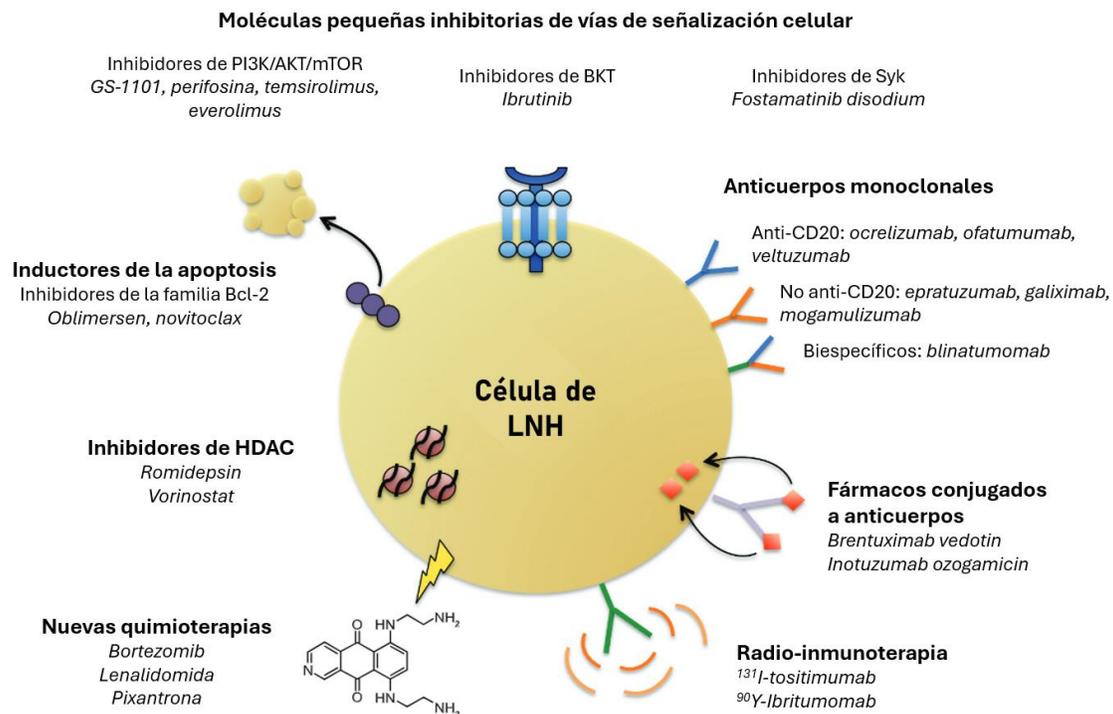


Figura 4. Alternativas terapéuticas en los casos de recaída de LNH. Diversos fármacos están siendo empleados para el tratamiento de LNH resistente a los tratamientos estándar, entre ellos, los anticuerpos monoclonales, fármacos conjugados a anticuerpos, la radio-inmunoterapia, las moléculas pequeñas inhibitorias y las nuevas quimioterapias. Bcl-2: linfoma de células B2, BTK: tirosina quinasa de Bruton, HDAC: histona desacetilasa, mTOR: diana de rapamicina en mamíferos, Syk: tirosina quinasa del bazo, PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa. Modificado de Chao, 2013.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevas e innovadoras estrategias terapéuticas que sean más específicas, efectivas, accesibles y mejor toleradas para el tratamiento de los LNH. En este contexto, la terapia bacteriana contra el cáncer ha surgido como una alternativa terapéutica prometedora que podría ofrecer un enfoque novedoso y potencialmente más efectivo para el tratamiento de los LNH (Mateos-Chávez et al., 2019).

1.3. Terapia bacteriana contra el cáncer

Ha pasado más de un siglo desde que William B. Coley (1862-1936) comenzó el primer estudio sistemático que reporta el uso de la terapia bacteriana para el tratamiento de tumores sólidos. En tal estudio, Coley inyectó la bacteria *Streptococcus pyogenes* a un paciente con sarcoma, causando la desaparición del tumor, presumiblemente por acción del sistema inmune (Coley, 1891). Años más tarde, debido a la preocupación de inocular a pacientes con cáncer con bacterias vivas, Coley optó por utilizar una combinación de bacterias muertas compuesta por las especies *Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens*, a la cual denominó "Toxinas de Coley". Esta combinación fue utilizada para tratar sarcomas, linfomas, melanomas y mielomas, obteniendo buenos resultados. Sin embargo, Coley fue objeto de muchas críticas debido a que sus ensayos no siempre podían ser replicados. Esto en conjunto con la aparición de la radioterapia, condujo a que las toxinas de Coley fueran olvidadas durante décadas (McCarthy, 2006).

En la actualidad, la terapia bacteriana contra el cáncer está ganando importancia a causa de los avances acelerados en los campos de la inmunología y la biotecnología. Organismos bacterianos atenuados anaerobios facultativos y anaerobios estrictos son ampliamente utilizados por su capacidad intrínseca para dirigirse, colonizar y proliferar preferentemente en tejido tumoral (Sedighi et al., 2019, Duong et al., 2019). Estas propiedades se deben a la presencia de un sistema flagelar de locomoción que permite la penetración de tejidos; este sistema se encuentra guiado con sensores quimiotácticos que pueden ser estimulados por compuestos liberados en el microambiente tumoral (MAT) (Figura 5). Asimismo, las

bacterias presentan un crecimiento preferencial en los tumores debido a que estos presentan hipoxia, necrosis e inmunosupresión (Forbes, 2010).

Una vez establecidas en el tumor, las bacterias pueden efectuar una potente reacción antitumoral mediante la activación de vías promotoras de la muerte celular, la competencia por recursos, y la estimulación de la inmunidad innata y adaptativa (Hernández-Luna & Luria-Pérez, 2018). Asimismo, las cepas atenuadas utilizadas en el terapia bacteriana contra el cáncer presentan una patogenicidad reducida, pero conservan sus propiedades antitumorales. Esta alternativa terapéutica presenta un bajo costo y efectos secundarios reducidos en comparación con otros tratamientos, lo que la convierte en una de las terapias en desarrollo más prometedoras para el tratamiento del cáncer (Hernández-Luna et al., 2018).

En los últimos años se ha avanzado mucho en la optimización de la terapia bacteriana contra el cáncer gracias al desarrollo de la ingeniería genética y la biología sintética (Liang et al., 2021). Actualmente, se cuenta con bacterias atenuadas que se pueden modificar genéticamente para que sean capaces de sintetizar, acarrear y liberar moléculas heterólogas antitumorales en el MAT (Liang et al., 2019; Becerra-Báez et al., 2022). Esto permite utilizar a las bacterias como una pequeña fábrica de moléculas antitumorales con la capacidad de liberarlas de forma controlada en el MAT mediante el uso de maquinarias de secreción, reduciendo los efectos secundarios y aumentando la capacidad antitumoral de las drogas acarreadas (Forbes, 2010) (Figura 5).

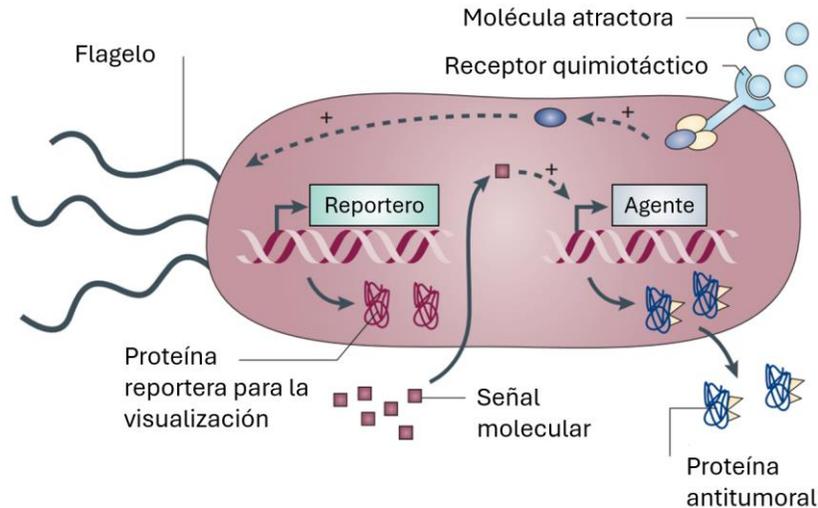


Figura 5. Mecanismos biológicos bacterianos intrínsecos y modificaciones genéticas que favorecen la terapia bacteriana contra el cáncer. Las cepas bacterianas atenuadas empleadas en la terapia bacteriana contra el cáncer presentan la capacidad de dirigirse y establecerse en tumores sólidos debido a la captación de moléculas atractoras liberadas desde el MAT. Además, estas bacterias pueden ser modificadas genéticamente para producir y liberar de manera controlada proteínas heterólogas reporteras y/o antitumorales. Modificado de Forbes, 2010.

1.3.1. *Salmonella enterica* en el tratamiento del cáncer

Salmonella enterica es la especie más estudiada en la terapia bacteriana contra el cáncer. En la actualidad se cuenta con una gran variedad de cepas atenuadas con efectos patogénicos reducidos, que conservan sus propiedades antitumorales. Gran parte de estas cepas atenuadas presentan mutaciones que alteran las vías metabólicas responsables de la biosíntesis de aminoácidos, purinas, toxinas, entre otros (Liang et al., 2021). Asimismo, estas cepas han demostrado ser seguras y eficientes en el tratamiento del cáncer en múltiples modelos preclínicos (Liang et al., 2019). Por ejemplo, la cepa atenuada VNP20009 proviene de *Salmonella enterica* Typhimurium y fue generada por la delección de los genes *msbB* and *purI*, lo cual reduce el riesgo de choque séptico, haciéndola más segura para su uso en el tratamiento del cáncer. VNP20009 muestra direccionamiento específico hacia el tumor, capacidad antitumoral y ha sido probada en ensayos clínicos de fase I, demostrando seguridad. El balance entre la atenuación y la inmunogenicidad es importante para el éxito de la terapia. Las cepas que son sobreatenuadas pierden sus capacidades antitumorales debido a que pierden la capacidad para estimular óptimamente al sistema inmune (Nemunaitis et al., 2003).

La principal ventaja de la terapia bacteriana contra el cáncer recae en la capacidad de las bacterias para dirigirse y colonizar estrictamente tejido tumoral con un daño mínimo en tejidos sanos (Forbes, 2010). La selectividad de *Salmonella* hacia los tumores sólidos fue descrita por primera vez por Pawelek et al. (1997), que reportaron la colonización de tumores por cepas atenuadas de *Salmonella enterica* luego de una inoculación distante en un modelo murino de melanoma (Pawelek et al., 1997). El mecanismo por el cual *Salmonella* coloniza selectivamente tumores no está completamente dilucidado. Se sabe que en parte esto se debe a características del MAT como hipoxia, necrosis e inmunosupresión, las cuales resultan en un ambiente que contribuye al establecimiento y proliferación de *Salmonella* (Forbes, 2010). Además, *Salmonella* responde a la presencia de moléculas del MAT como aminoácidos (ácido aspártico y serina) y carbohidratos (ribosa y galactosa) que actúan como agentes quimioatrayentes, estimulando su direccionamiento y penetración profunda (Kasinskas & Forbes, 2006, Kasinskas & Forbes, 2007). Además, luego de llegar al MAT, *Salmonella* puede distribuirse desde el nicho perivascular hasta las zonas más profundas del tumor, promoviendo la muerte de las células malignas y la activación del sistema inmune (Becerra-Báez et al., 2022) (Figura 6).

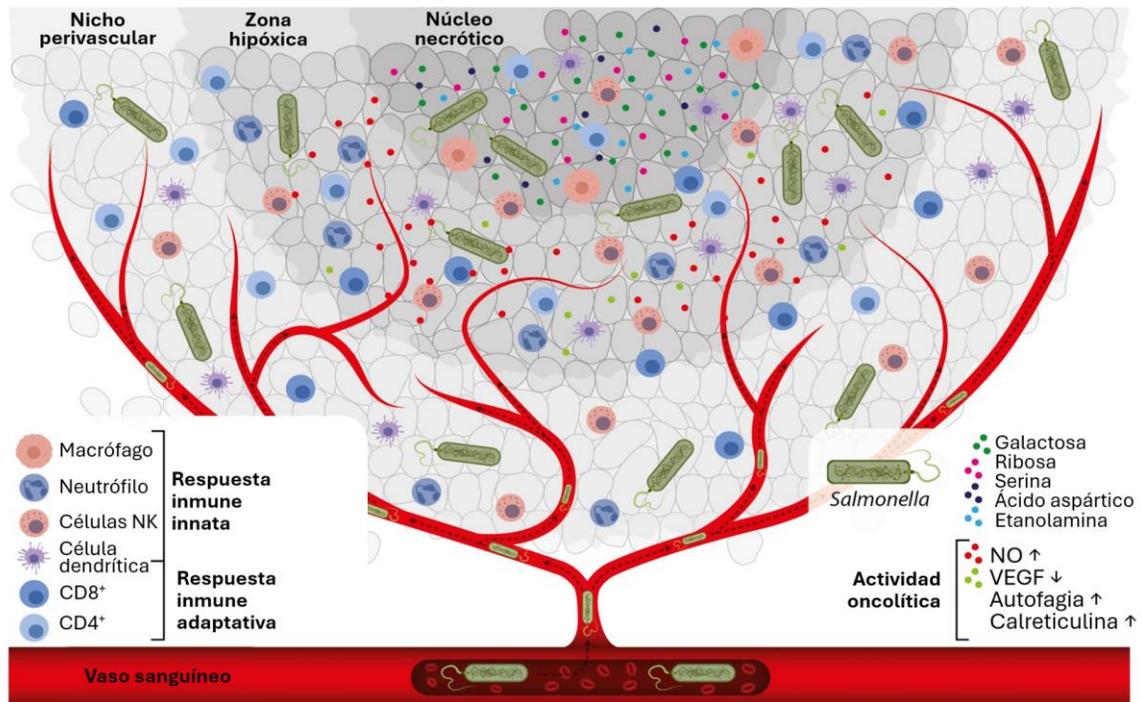


Figura 6. *Salmonella enterica* atenuada presenta selectividad tumoral y actividad antitumoral intrínseca. Posterior a su inoculación por vía intravenosa, *Salmonella* es capaz de dirigirse y colonizar preferentemente tejido tumoral, en donde, promueve una potente reacción antitumoral mediante su actividad oncolítica y la activación de la respuesta inmune. VEGF: factor de crecimiento endotelial-vascular y NO: óxido nítrico. Modificado de Becerra-Báez et al., 2022.

Salmonella puede matar directamente células tumorales induciendo la apoptosis y la autofagia mediante la desregulación de diferentes vías metabólicas, la producción de toxinas bacterianas y la privación de nutrientes. La capacidad de *Salmonella* para promover la apoptosis se debe a que esta puede activar la caspasa 3 y generar óxido nítrico (NO) en tejido tumoral (Spector et al., 1999; Lee et al., 2014). *Salmonella* también estimula el aumento de la expresión de calreticulina en células tumorales, incentivando una muerte celular inmunogénica al facilitar la captación de los cuerpos apoptóticos por las células presentadoras de antígeno y, por ende, la presentación de neoantígenos (Chirullo et al., 2015). Además, aumenta los niveles de autofagia por la desregulación de la vía AKT/mTOR y disminuye la angiogénesis al inhibir la expresión del factor de transcripción HIF-1 α (Lee et al., 2014; Tu et al., 2016). Asimismo, *Salmonella* promueve la quimiosensibilización de las células tumorales mediante el aumento en la expresión de la conexina 43 (Cx43), mejorando la distribución de los fármacos en el tumor, y la inhibición de la expresión

de la glicoproteína-P, la cual es responsable de la resistencia a quimioterapia (Chang et al., 2013; Yang et al., 2018) (Figura 7).

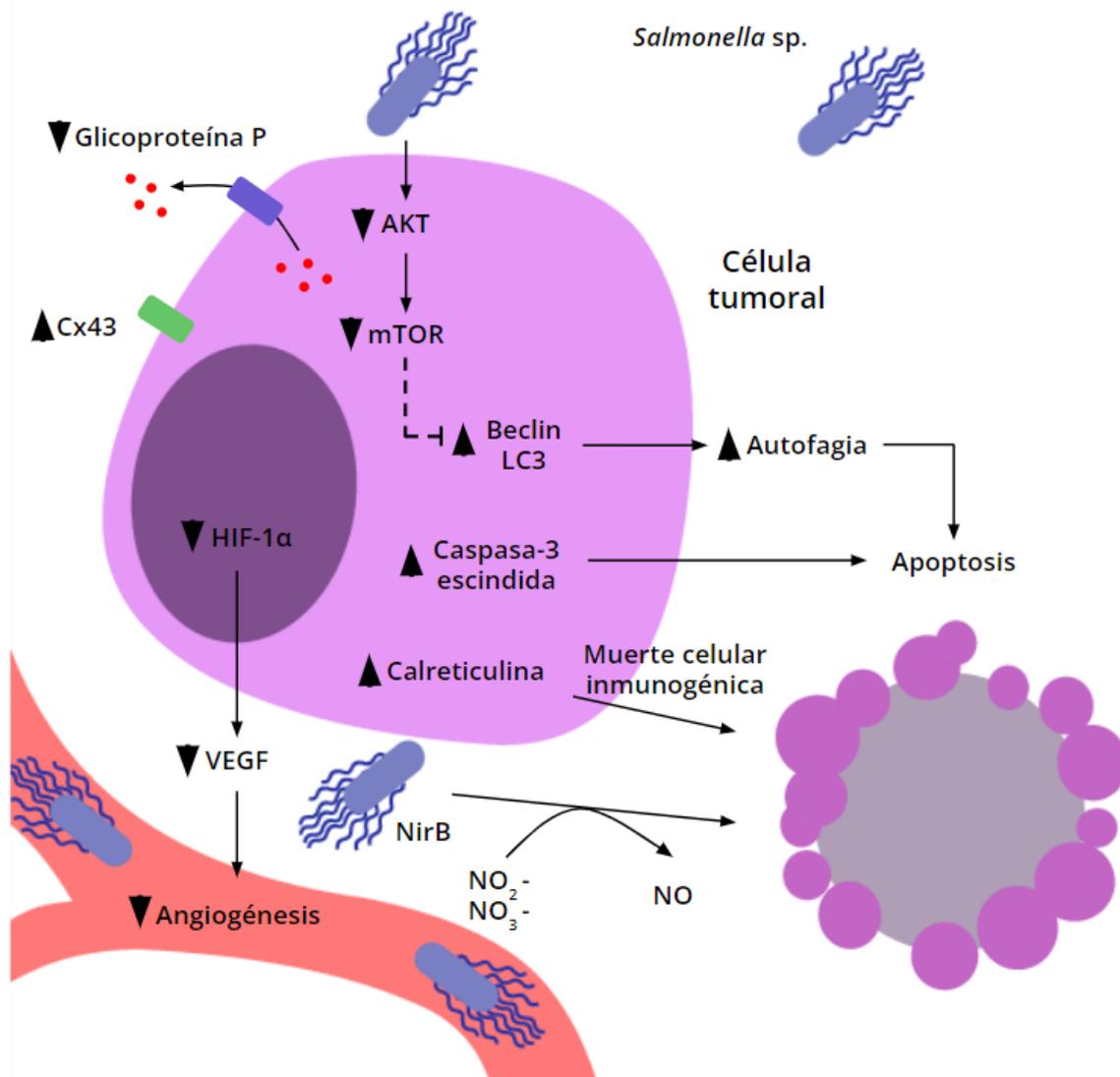


Figura 7. *Salmonella enterica* atenuada promueve la muerte de las células tumorales. *Salmonella* promueve la activación de la apoptosis y la autofagia de las células tumorales, así como la inhibición de la angiogénesis. Además, quimiosensibiliza a las células tumorales por medio de cambios en la expresión de la glicoproteína P y Cx43. AKT: proteína quinasa B, mTOR: diana de rapamicina en mamíferos, LC3: proteína 1A/1B-cadena ligera 3 asociada a microtúbulos, HIF-1α: factor inducible a la hipoxia subunidad 1α, VEGF: factor de crecimiento endotelial-vascular, NirB: nitrato reductasa B, NO: óxido nítrico y Cx43: conexina 43.

La presencia de *Salmonella* en el MAT estimula la activación de la inmunidad innata y adaptativa antitumoral. Esto se debe a que *Salmonella* presenta componentes inmunogénicos como el lipopolisacárido (LPS) y la flagelina que son reconocidos por los receptores tipo Toll 4 y 5 (TLR 4 y 5), respectivamente (Lee et al., 2008; De

Melo et al., 2015). La estimulación de los macrófagos infiltrados en el tumor favorece el fenotipo M1 antitumoral, la activación del inflamósoma NLRC4 y la secreción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β), desencadenando un proceso inflamatorio que promueve el reclutamiento de células inmunes como neutrófilos, linfocitos T, linfocitos B, células NK y células dendríticas (CD) que contribuyen a la erradicación del tumor (Hernández-Luna et al., 2018; Kupz et al., 2014; Chang et al., 2013; Saccheri et al., 2010; Lin et al., 2017). Además, se ha reportado que la interacción de la flagelina con el TLR 5 de las células tumorales suprime su proliferación, reduce la expresión de la enzima inmunosupresora indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y aumenta la expresión de la Cx43. Esta última promueve la presentación cruzada de antígenos, llevando a la activación de linfocitos TCD8+ antitumorales (Cai et al., 2011) (Figura 8).

No obstante, a pesar de mostrar reacciones antitumorales robustas en ensayos realizados en ratones, el uso de *Salmonella* en ensayos clínicos no ha mostrado los resultados esperados. Se ha reportado que *Salmonella* presenta una colonización inconsistente al tejido tumoral y una reacción oncolítica débil en ensayos clínicos fase I (Toso et al., 2002). Por lo tanto, en los últimos años, se han realizado esfuerzos para optimizar la terapia bacteriana contra el cáncer basada en *Salmonella*, haciendo uso principalmente de herramientas como la ingeniería genética y la biología sintética (Duong et al., 2019).

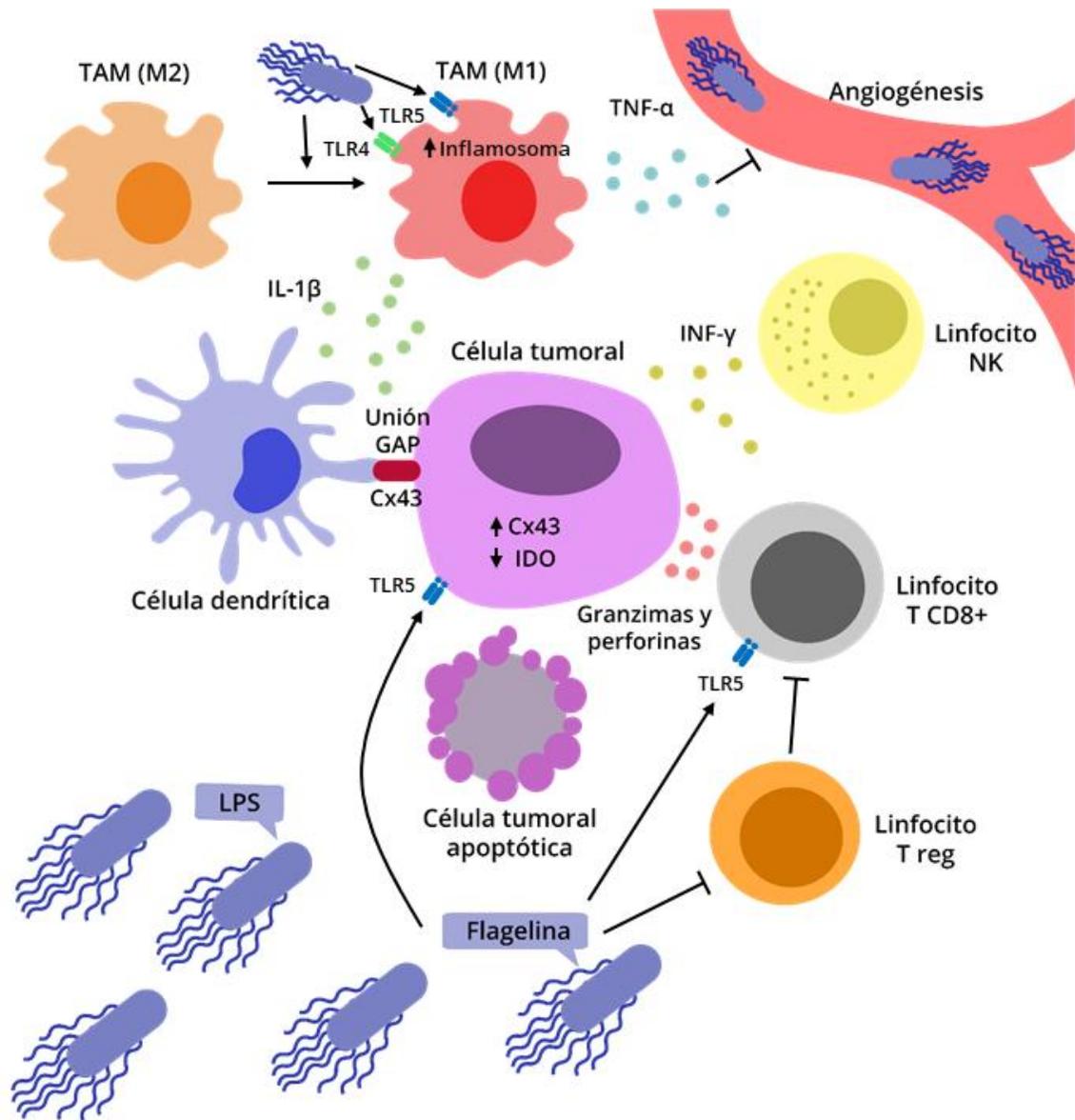


Figura 8. *Salmonella enterica* atenuada estimula la inmunidad antitumoral innata y adaptativa en el microambiente tumoral. Componentes de *Salmonella* como el LPS y la flagelina pueden estimular células de la inmunidad innata como macrófagos, células dendríticas y células NK, así como promover la activación de linfocitos T CD8+ y la inhibición de linfocitos T reguladores. TAM: Macrófagos asociados a tumores, LPS: lipopolisacárido, IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa. TLR: receptor tipo Toll, Cx43: conexina 43, IL: interleucina, IFN: interferón y TNF-α: factor de necrosis tumoral α.

1.3.2. Optimización de la terapia bacteriana basada en *Salmonella*

Con el objetivo de maximizar la actividad antitumoral de la terapia bacteriana contra el cáncer basada en *Salmonella* se han realizado múltiples investigaciones modificando a *Salmonella* para aumentar sus propiedades citotóxicas, presentar antígenos asociados a tumores, acarrear nanopartículas, entre otros (Liang et al., 2020; Chen et al., 2020).

La aplicación intravenosa de fármacos no asegura su correcta biodistribución en el tejido tumoral debido a presencia de barreras físicas del mismo como la alta presión intersticial, la desmoplasia, la vasculatura anormal y la heterogeneidad estructural dentro del tumor (Huo et al., 2020). Gracias a su capacidad para colonizar preferentemente regiones tumorales, *Salmonella* nos brinda una manera única de acarrear fármacos y distribuirlos hasta las zonas más profundas del MAT, disminuyendo la toxicidad y aumentando la efectividad del tratamiento (Becerra-Báez et al., 2022).

La expresión de moléculas heterólogas en *Salmonella* se puede programar mediante su transformación con plásmidos que alberguen la información genética requerida (Fensterle et al., 2008). Mediante esta estrategia se ha reportado la expresión y liberación controlada de antígenos, inmunomoduladores, agentes citotóxicos, enzimas convertidoras de prodrogas, RNA y DNA (bactofección) (Duong et al., 2019).

Con el objetivo de asegurar una liberación controlada de los fármacos acarreados estrictamente en el MAT, se ha reportado el uso de promotores sensibles al MAT o promotores inducibles por señales remotas. Los promotores sensibles al MAT detectan las condiciones únicas del tejido tumoral como la hipoxia y la acidez, activando la expresión de moléculas heterólogas solo en dichas condiciones, mientras que los promotores inducibles por señales remotas pueden activarse mediante un inductor administrado de manera remota, permitiendo un control preciso sobre la expresión de las proteínas heterólogas antitumorales, luego de asegurar la focalización de *Salmonella* en el tumor, ofreciendo un tratamiento

dirigido, eficiente y con mínimos efectos secundarios (Mateos-Chávez et al., 2019; Zheng et al., 2017).

1.3.3. *Combinación de Salmonella con tratamientos estándar*

La terapia bacteriana contra el cáncer basada en *Salmonella* tiene la capacidad de efectuar reacciones antitumorales sinérgicas cuando se la emplea en combinación con los tratamientos convencionales como la quimioterapia y la radioterapia, reforzando significativamente sus efectos antitumorales.

***Salmonella* y quimioterapia:** Recientemente, se ha reportado que la administración de *Salmonella* en combinación con cisplatino, 5-fluorouracilo y gemcitabina, en un modelo de xenotransplante murino de cáncer pancreático resistente a quimioterapia, revirtió la resistencia promoviendo una potente reacción antitumoral (Hiroshima et al., 2013). Asimismo, en un ensayo clínico piloto se evaluó la inoculación intratumoral de la cepa VNP20009 de *Salmonella* que expresa la enzima convertidora de prodrogas, citosina desaminasa de *Escherichia coli* (TAPET-CD), en conjunto con la inoculación vía intravenosa de la prodroga, 5-fluorocitocina (5-FC), con el objetivo de que *Salmonella* convierta la 5-FC en 5-FU preferentemente en el MAT. A pesar de que se observó una mayor acumulación de 5-FU intratumoral en los pacientes tratados, no se observó una respuesta objetiva (Nemunaitis et al., 2003).

***Salmonella* y radioterapia:** Se ha reportado que la incorporación de dosis bajas de radioterapia, luego de la inoculación de *Salmonella*, aumentó su capacidad antitumoral y desencadenó una respuesta inmune de tipo citotóxica contra tumores secundarios que no recibieron radioterapia. Asimismo, se reportó que esta combinación amortigua los mecanismos de escape inmunológico del tumor (Avogadri et al., 2008). De manera similar, Liu y colaboradores reportaron que la radioterapia facilitó la colonización de *Salmonella* en tejido tumoral debido a su capacidad para aumentar la permeabilidad del área irradiada, creando un entorno más accesible para la infiltración bacteriana, lo que desencadenó una reducción en el crecimiento tumoral en un modelo de carcinoma de colon murino (Liu et al., 2016).

1.3.4. Ensayos clínicos empleando *Salmonella enterica*

A partir del año 1999 comenzaron los ensayos clínicos con *Salmonella enterica* empleando a la cepa atenuada VNP20009 y a otras cepas modificadas mediante ingeniería genética. La cepa VNP20009 de *Salmonella*, diseñada por Vion Pharmaceuticals, Inc., fue la primera cepa probada en ensayos clínicos de fase I. En este ensayo participaron 24 pacientes con melanoma metastásico y uno con carcinoma renal metastásico que fueron tratados con dosis de 10^6 a 10^9 UFC/m² de VNP20009 vía intravenosa. Se estimó que la máxima dosis tolerada (MTD) fue de 10^8 UFC/m², y se observó colonización tumoral en dos pacientes que recibieron 1×10^9 UFC/m² y en un paciente que recibió 3×10^8 UFC/m²; se observó toxicidad limitante de dosis en los pacientes que recibieron 1×10^9 UFC/m². La inoculación indujo un aumento de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, ninguno de los pacientes experimentó una regresión tumoral objetiva (Toso et al., 2002). En los siguientes años se realizaron más ensayos clínicos probando a la cepa VNP20009, empleando diferentes concentraciones de bacterias y variando el tiempo de inoculación, con el objetivo de mejorar la colonización tumoral y reducir los efectos adversos; no obstante, no se observaron respuestas significativas (Heimann & Rosenberg, 2003; NCT00004216; NCT00006254 & NCT00004988).

Posteriormente, con el objetivo de mejorar la eficacia del tratamiento con *Salmonella* en ensayos clínicos, se emplearon otras cepas modificadas por ingeniería genética. En un ensayo piloto con solo 3 participantes se evaluó la eficacia de TAPET-CD, una cepa de *Salmonella* que expresa la enzima citosina desaminasa de *Escherichia coli* (*E. coli*), inoculada vía intratumoral. Se observó que esta cepa fue capaz de colonizar el tumor y realizar la conversión de 5-FC a 5-FU en tejido tumoral. Sin embargo, no se observaron remisiones significativas, presumiblemente por el pobre establecimiento de *Salmonella* en el tumor (Nemunaitis et al., 2003). Asimismo, se ha realizado un ensayo clínico en pacientes con cáncer pancreático localmente avanzado o metastásico con *Salmonella typhi* Ty21a VXM01, la cual es portadora de un plásmido de expresión que codifica al receptor 2 del factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGFR2). En este caso, *Salmonella* es empleada como un vector vacunal para la entrega del plásmido en las placas de Peyer a través de su

inoculación vía oral, con la finalidad de desencadenar una respuesta sistémica de células T dirigida al VEGFR2 y, por ende, inhibir la angiogénesis. Los resultados indican que el tratamiento es seguro y aumentó las respuestas de células T específicas; solo un paciente desarrolló una respuesta antitumoral objetiva (Schmitz-Winnenthal et al., 2018).

Se presume que la actividad antitumoral limitada de este tratamiento en los ensayos clínicos, en comparación con lo observado en modelos murinos, se debe principalmente a las diferencias en la estructura tumoral; las barreras físicas de los tumores humanos impiden el correcto establecimiento de *Salmonella*, lo que repercute en su actividad antitumoral.

Por otro lado, si bien la optimización de la capacidad antitumoral de *Salmonella* ha permitido observar una mayor citotoxicidad en modelo murinos, no se ha abordado la problemática relacionada con el pobre establecimiento y la inconsistente colonización en tejido tumoral observado en ensayos clínicos.

Por ende, se requieren nuevos enfoques que permitan la optimización de la selectividad tumoral, la adhesión y la focalización de *Salmonella* hacia tejido tumoral. Esto se puede abordar mediante la expresión en la superficie de *Salmonella* de proteínas o péptidos que se unan específicamente a proteínas sobreexpresadas en tumores, lo que permitiría aumentar la eficacia y la seguridad de la terapia bacteriana contra el cáncer basada en *Salmonella*. Para ello, es posible emplear proteínas autotransportadoras que han demostrado utilidad en la expresión y translocación de péptidos y proteínas en la superficie bacteriana.

1.4. Autotransportadores bacterianos

Los autotransportadores bacterianos o sistemas de secreción tipo V, son los únicos sistemas de secreción en bacterias Gram-negativas formados por una sola proteína autosuficiente que se transloca a la superficie bacteriana. Estos están conformados por una región péptido señal, un dominio pasajero, un dominio conector o enlazador, un dominio de translocación o dominio β -barril y, en algunos casos, un subdominio proteasa y/o una región de corte (Leyton et al., 2012) (Figura 9).

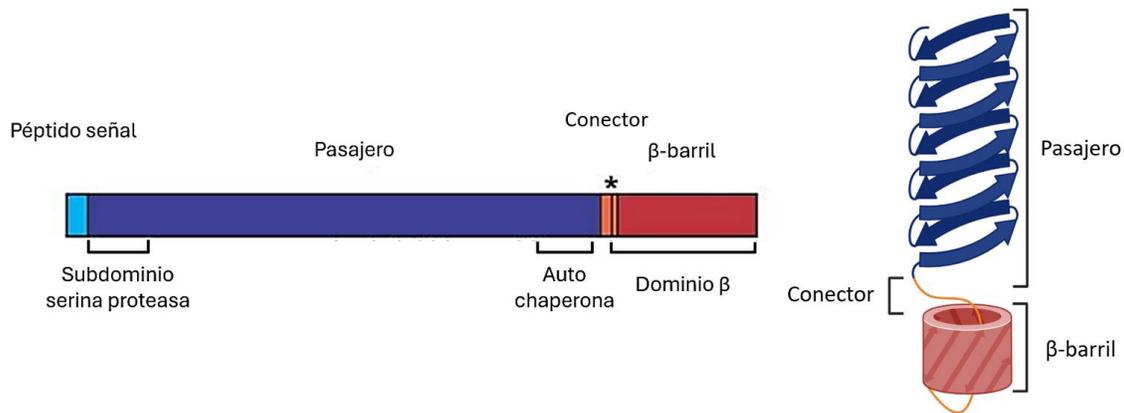


Figura 9. Principales dominios estructurales que conforman a los autotransportadores. Los autotransportadores están conformados por una péptido señal, un dominio pasajero, un dominio conector y el dominio β -barril. La región péptido señal escindible permite la translocación del autotransportador hacia el periplasma. Usualmente, dentro del dominio pasajero encontramos subdominios serina proteasa y autochaperonas. En algunos casos, el pasajero es liberado por escisión proteolítica; en estos casos, encontramos una región de corte (*). Modificado de Van Ulsen et al., 2018.

Además, los autotransportadores pueden separarse en 5 grupos, Va - Ve, de acuerdo a su estructura y mecanismo de secreción. Comúnmente, este sistema está involucrado en la secreción de factores de virulencia como toxinas y proteínas de unión a receptores, y la expresión superficial de moléculas de adhesión (Meuskens et al., 2019).

Los autotransportadores Va son denominados también autotransportadores clásicos y, en la actualidad, son los más estudiados funcional y estructuralmente. Su translocación a la superficie bacteriana requiere de dos pasos; primero la proteína recién sintetizada es transportada al periplasma a través del translocón SecYEG mediante el reconocimiento de la péptido señal Sec escindible en su extremo N terminal y, luego, se incorpora a la membrana externa con ayuda del complejo de maquinaria de ensamblaje del β -barril (BAM), el cual promueve su inserción a la membrana externa formando una estructura β -barril (Leo et al., 2012).

1.4.1. Aplicaciones de los autotransportadores

Los autotransportadores han sido optimizados como herramientas para la expresión de proteínas heterólogas en la superficie bacteriana, principalmente para el desarrollo de vacunas y biosensores. Esto se logra reemplazando o agregando al dominio pasajero extracelular proteínas o péptidos de interés (Figura 10). Las

moléculas que se expresan en la superficie por medio de estos sistemas tienen libre acceso para su unión con moléculas blanco, pueden conservar su actividad y aumentar su estabilidad. Esta estrategia se ha utilizado ampliamente con éxito para la expresión de enzimas, fragmentos de anticuerpos de cadena única (scFv), péptidos sintéticos, entre otros, en la superficie bacteriana (Van Ulsen et al., 2018).

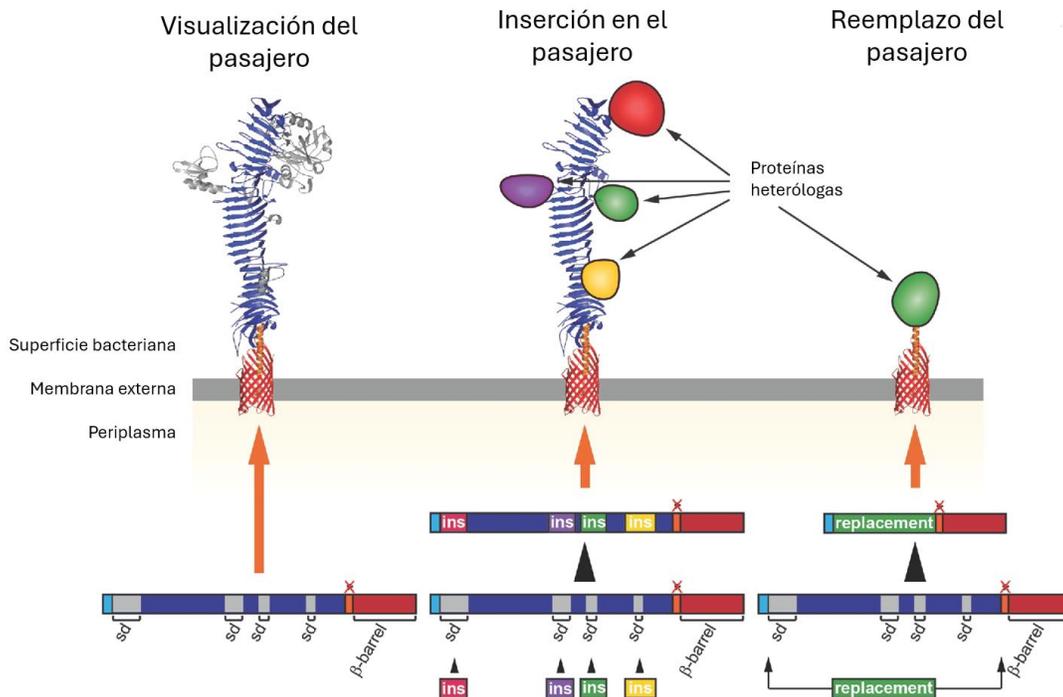


Figura 10. Estrategia para la expresión de proteínas heterólogas en la superficie bacteriana utilizando autotransportadores. Brevemente, los autotransportadores pueden ser modificados para permitir la translocación o secreción de péptidos y proteínas heterólogas. El dominio pasajero puede ser fusionado o reemplazarse con proteínas heterólogas mediante ingeniería genética, lo que permite su expresión en la superficie bacteriana. Asimismo, la adición de una secuencia de reconocimiento de proteasas permite la secreción al medio de proteínas heterólogas. Modificado de Van Ulsen et al., 2018.

1.4.2. El papel de los autotransportadores en la terapia bacteriana contra el cáncer

En el contexto de la terapia bacteriana contra el cáncer basada en *Salmonella*, los autotransportadores han sido empleados para la expresión superficial de antígenos con el fin de desarrollar vacunas antitumorales y para la secreción de péptidos promotores de la apoptosis. Recientemente, Mei y colaboradores emplearon el autotransportador AIDA-1 para la expresión del antígeno del melanoma, Melan-A, en la superficie de la cepa atenuada SL7207 de *Salmonella enterica*. La inoculación de

la vacuna activó la respuesta de linfocitos T CD4+ y T CD8+ específicas del tumor. Asimismo, facilitó la infiltración tumoral de las células T, promovió la producción de citocinas del perfil Th1 y previno la metástasis pulmonar en un modelo de melanoma murino (Mei et al., 2017). Por otro lado, Mateos-Chávez y colaboradores emplearon el autotransportador MisL para la secreción del péptido permeable Bax BH3 en la cepa SL3261 de *Salmonella enterica* Typhimurium, observando una reacción antitumoral potente promovida por un incremento de la vía intrínseca de la apoptosis en un modelo *in vivo* de linfoma no Hodgkin (Mateos-Chavez et al., 2019). De tal manera, es factible emplear el sistema de autotransportadores para expresar moléculas heterólogas como ligandos que reconozcan moléculas blanco sobreexpresadas en la superficie de células tumorales, como es el caso de un scFv dirigido al receptor de transferrina 1 (TfR1).

1.5. Receptor de transferrina 1 (TfR1 o CD71)

El TfR1 es una glicoproteína transmembrana homodimérica conformada por un dominio citoplasmático, una región transmembrana y un dominio extracelular complejo. El dominio extracelular está compuesto por un dominio helicoidal, un dominio tipo proteasa y un dominio apical (Luria-Pérez et al., 2016) (Figura 11a). El TfR1 tiene como función la captación celular de hierro por medio de su unión a la holotransferrina (transferrina cargada con hierro) en su porción basal (Montemiglio et al., 2019) (Figura 11b).

La unión de la holotransferrina al TfR1 facilita la endocitosis de este complejo; posteriormente, la acidificación endosomal (pH: 5.5) induce un cambio conformacional en la holotransferrina que permite la liberación del hierro, seguida de su bombeo desde el endosoma hacia el citosol por medio del transportador de metales divalente 1 (DMT1). Seguido de esto, la transferrina se libera y el TfR1 regresa a la superficie de la célula (Guo et al., 2021; Luria-Pérez et al., 2016).

Por lo general, el TfR1 se expresa a niveles bajos en la mayoría de las células sanas, con la excepción de células con una alta tasa proliferativa (epidermis basal, epitelio intestinal y linfocitos activados) y con una alta necesidad de hierro

(trofoblastos de la placenta, endotelio vascular y progenitores eritroides) (Candelaria et al., 2021).

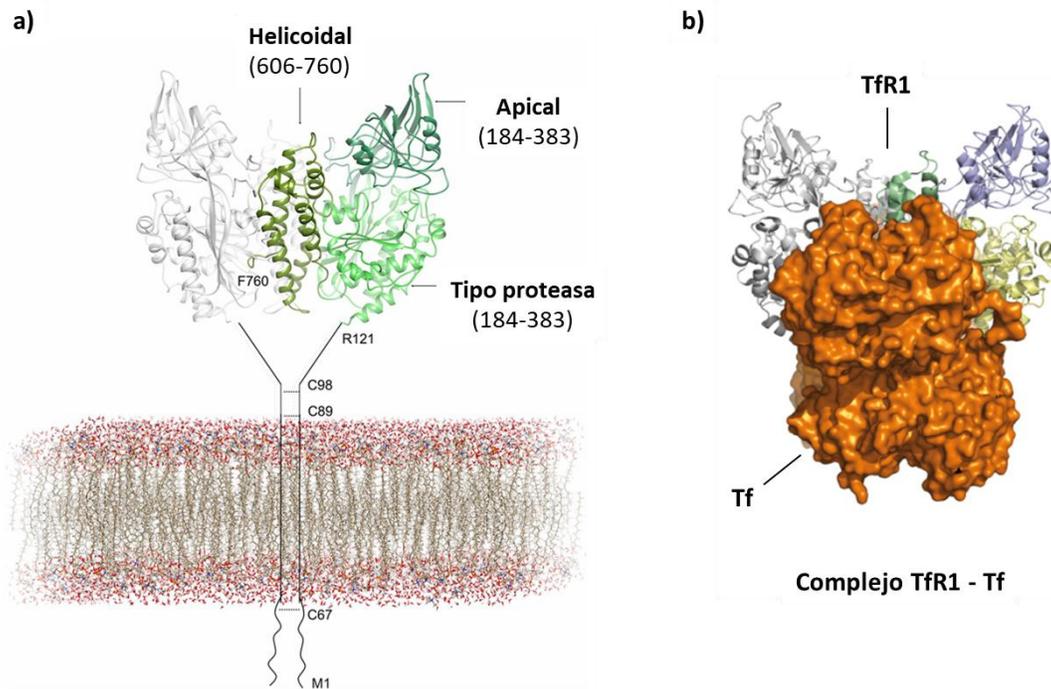


Figura 11. Estructura del receptor de TfR1 humano y su unión a la holotransferrina. a) El TfR1 está conformado por los dominios intracelular, transmembrana y extracelular. Este último se divide en los subdominios tipo proteasa, apical y helicoidal. Este homodímero se encuentra estabilizado mediante uniones covalentes tipo puentes de disulfuro. Modificado de Testi et al., 2019. b) La holotransferrina se une a la porción basal del TfR1; la cual está conformada por los subdominios tipo proteasa y helicoidal. Modificado de Montemiglio et al., 2019.

1.5.1. El papel del TfR1 en el cáncer

La sobreexpresión del TfR1 en neoplasias malignas se reportó por primera vez a principios de la década de 1980 en pacientes con cáncer de mama y, desde entonces, se ha observado en varios tipos de cáncer, incluyendo gliomas, leucemia, linfomas y cáncer de ovario (Guo et al., 2021). En la actualidad, se considera al TfR1 como un marcador universal del cáncer correlacionado con un estadio avanzado y con un peor pronóstico (Essaghir & Demoulin, 2012).

Las células cancerosas presentan una demanda intrínsecamente alta de hierro debido a que este participa en procesos clave como la generación de energía, la progresión del ciclo celular y, la síntesis y reparación del DNA. El TfR1 representa la principal vía de captación celular de hierro; por ende, el aumento de su expresión proporciona un medio para suplir esta demanda (Guo et al., 2021). En comparación

a las células sanas, las células cancerosas presentan una fuerte dependencia al hierro, fenómeno conocido como “adicción al hierro”, siendo muy sensibles a su privación (Basuli et al., 2017).

Se ha descrito que la sobreexpresión de TfR1 es particularmente alta y esencial para la supervivencia de neoplasias hematológicas, debido al importante papel que tiene el hierro en el desarrollo de las células del sistema inmune (Guo et al., 2021).

La sobreexpresión del TfR1 en el cáncer se encuentra favorecida por el factor de transcripción oncogénico c-MYC, la tirosina SRC celular (c-SRC) y el factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) (Jeong et al., 2015). Una elevada expresión de TfR1 está correlacionada con el desarrollo de la resistencia a fármacos por medio de la activación de la vía de señalización de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y con el mantenimiento de las células troncales cancerosas. Además, se ha reportado que el hierro protege a las células tumorales de las células NK e inhibe la apoptosis promovida por el TNF- α (Campisi et al., 2020).

1.5.2. El TfR1: un blanco terapéutico ideal en el tratamiento del cáncer

Su elevada expresión en células cancerosas, accesibilidad en la superficie celular, habilidad para internalizarse y su papel central en la progresión tumoral hacen del TfR1 un blanco terapéutico ideal en el desarrollo de fármacos para el tratamiento del cáncer (Candelaria et al., 2021).

En los últimos años, se han empleado diferentes estrategias terapéuticas dirigidas al TfR1 como el uso de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Estos presentan la capacidad de obstaculizar su unión con la holotransferrina y promover la muerte de las células tumorales por privación de hierro (Daniels-Wells et al., 2016). Dependiendo de la localización del epítipo blanco, los anticuerpos anti-TfR1 pueden clasificarse en:

Neutralizantes: Al unirse al TfR1, impiden la unión de la holotransferrina.

No neutralizantes: No interfieren con la unión a la holotransferrina, pero promueven la internalización del TfR1 y su degradación.

Además, los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos contra TfR1 se han empleado con el fin de administrar y focalizar fármacos como quimioterapias, toxinas, radioisótopos, nanopartículas, oligonucleotidos y vectores para terapia génica, hacia el tejido tumoral (Luria-Pérez et al., 2016) (Figura 12).

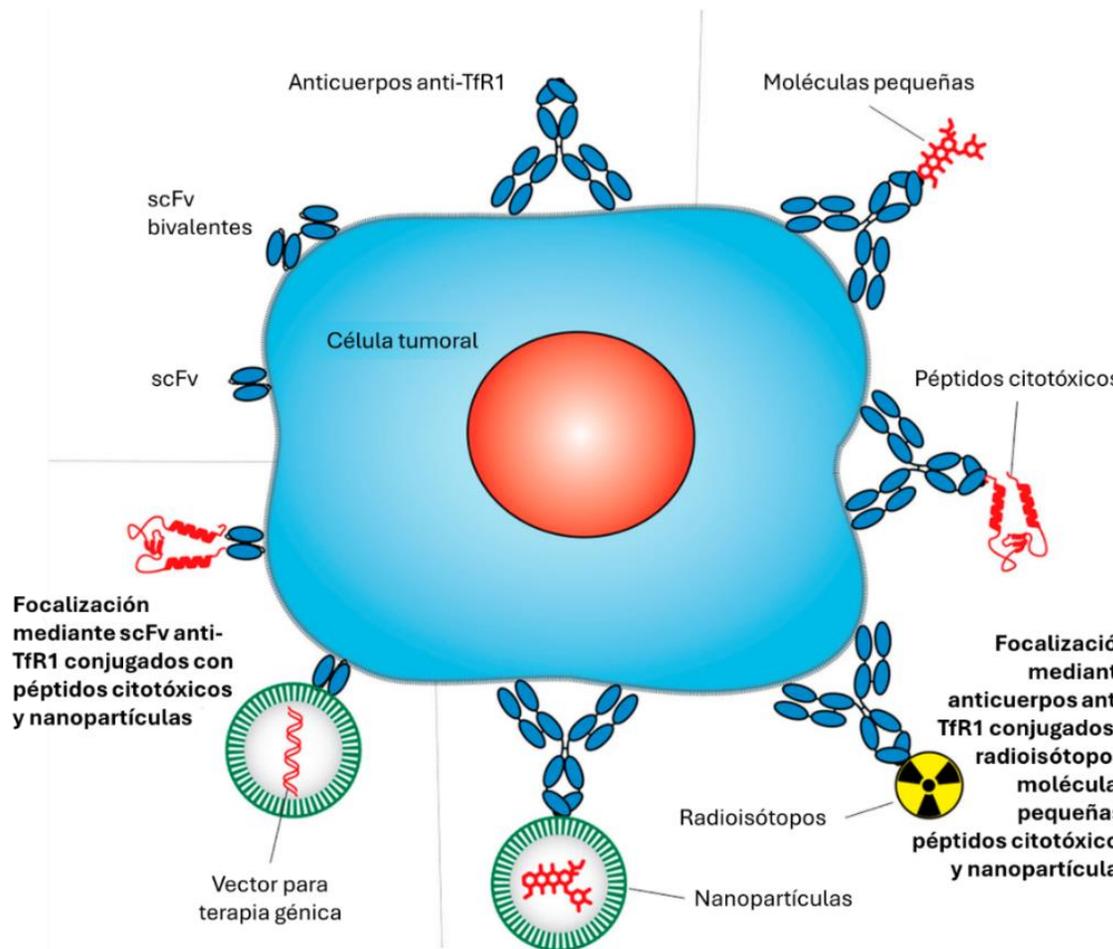


Figura 12. Estrategias empleadas para focalizar fármacos a células tumorales empleando anticuerpos y scFv anti-TfR1. En los últimos años, se ha reportado el uso de anticuerpos y scFv dirigidos al TfR1 con la finalidad de focalizar fármacos como péptidos citotóxicos, vectores para terapia génica, nanopartículas, radioisótopos y moléculas pequeñas. El TfR1 es un blanco terapéutico ideal, ya que, se encuentra accesible en la superficie celular, presenta la capacidad de internalizarse y se sobreexpresa en las células tumorales. TfR1: receptor de transferrina 1, scFv: fragmento variable de cadena única. Modificado de Rosendo-Luria et al., 2016

Si bien en la actualidad aún no se ha obtenido la aprobación de la FDA para algún agente terapéutico dirigido a TfR1 en el tratamiento del cáncer, el fármaco SGT-53, basado en un complejo scFv/liposoma cargado con un plásmido que codifica p53, se encuentra en ensayos clínicos fase I y II en pacientes con glioblastoma, cáncer de páncreas metastásico, entre otros (Pirollo et al., 2016). Asimismo, los resultados

más recientes de un ensayo clínico fase II, en el que se evalúa a este agente antitumoral, muestran un beneficio clínico significativo, particularmente en pacientes con adenocarcinoma ductal pancreático metastásico que no responden a la quimioterapia (Leung et al., 2021).

En este contexto, en el presente trabajo se reporta la construcción de un sistema basado en la expresión de un scFv dirigido contra el TfR1 que, al ser expresado en la superficie de un vector bacteriano atenuado antitumoral, favorecerá su adhesión a las células tumorales humanas de LNH.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los LNH representan uno de los tipos de cáncer más comunes, principalmente en la población pediátrica, siendo una de las principales causas de muerte en niños. La terapia bacteriana contra el cáncer es una alternativa terapéutica prometedora que brinda una forma novedosa de eliminar el cáncer, demostrando una alta eficiencia oncolítica en modelos murinos. Sin embargo, se ha reportado en ensayos clínicos que este tratamiento cuenta con limitaciones, como inconsistencias en la colonización y establecimiento en tejido tumoral, probablemente como consecuencia de las extensas barreras físicas de los tumores humanos y a la débil adhesión natural de las bacterias a células tumorales. Considerando que los efectos antitumorales de este tratamiento dependen del establecimiento bacteriano en el MAT, en el presente trabajo se reporta el diseño, construcción y evaluación de un sistema basado en la expresión de un scFv anti-TfR1 en la superficie bacteriana que mejora la adhesión a células tumorales humanas de LNH.

3. JUSTIFICACIÓN

Los tratamientos convencionales del LNH han mejorado la supervivencia de los pacientes, alcanzando una tasa de respuesta de entre el 70 y el 80%. Sin embargo, aproximadamente el 30% de los pacientes no responden de manera adecuada al tratamiento o desarrollan resistencia. En estos casos, las opciones terapéuticas se reducen drásticamente, brindando una eficiencia limitada o, en algunos casos, ofreciendo solo efectos paliativos. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de LNH. Si bien la terapia bacteriana contra el cáncer es una alternativa atractiva, aún presenta limitaciones, tales como un establecimiento bacteriano inconsistente en tejido tumoral observado en ensayos clínicos. El objetivo de este trabajo está dirigido al desarrollo y evaluación de un sistema que favorece la adhesión bacteriana a células tumorales humanas de LNH a través de la expresión y translocación de un scFv anti-TfR1 a la superficie bacteriana mediante el autotransportador ShdA. Esto permitirá aumentar la eficiencia de la terapia bacteriana contra el cáncer al aprovechar la alta especificidad y afinidad del scFv anti-TfR1 por el TfR1, que está sobreexpresado en el LNH, convirtiendo esta estrategia en una opción más atractiva para el tratamiento del LNH.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

- La expresión de un scFv anti-TfR1 en la superficie de *Escherichia coli* favorece su adhesión a células tumorales humanas de LNH (Ramos).

4.2. Objetivo general

- Desarrollar, caracterizar y evaluar *in vitro* en *Escherichia coli* un sistema recombinante basado en la expresión superficial de un scFv-antiTfR1 que favorece la adhesión bacteriana a células tumorales de LNH (Ramos).

4.3. Objetivos específicos

- Realizar un análisis bioinformático estructural que abarque el modelado, optimización y el análisis de acoplamiento molecular del scFv anti-TfR1 y la proteína recombinante scFv/FLAG/ShdA100.
- Diseñar y construir los plásmidos que permitan la expresión del scFv anti-TfR1 en la superficie bacteriana.
- Evaluar la expresión y translocación del scFv anti-TfR1 a la superficie bacteriana.
- Evaluar la adhesión de *Escherichia coli* recombinante que expresa en su superficie un scFv anti-TfR1 en un modelo *in vitro* de LNH humano.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Métodos bioinformáticos

5.1.1. Modelaje molecular

El modelaje de las estructuras tridimensionales de las proteínas recombinantes propuestas en el presente trabajo se realizó empleando el servidor de inteligencia artificial AlphaFold v1.5.2 Colab (DeepMind) y las secuencias aminoacídicas de las proteínas recombinantes (Jumper et al., 2020) (Tabla 1). Las estructuras obtenidas fueron visualizadas utilizando el programa PyMOL (Delano & Bromberg, 2004).

Tabla 1. Secuencias aminoacídicas de los componentes de las proteínas quiméricas recombinantes scFv/FLAG/ShdA30 y scFv/FLAG/ShdA100.

Nombre	Secuencias
FLAG	DYKDDDDK
ScFv dirigido al TfR1 (VH- (Linker GS)- VL).	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWKQSHGENLEWIG RINPHNGGTDYNQKFKDKAPLTVDKSSNTAYMELLSLTSGDSAVYYCAR GYYYYSLDYWGQGTSTVTVSGSGGGSGGGSGGSQIVLTQSPAIMSVSPG EKVTMTCSASSSIRYIHWYQQRPGTSPKRWIYDTSNLASGVPARFSGSG SGTSYSLTISMEAEADAATYYCHQRNSYPWTFGGGTRLEIR
ShdA-A (Autotransportador ShdA con 38 aminoácidos en su dominio alfa),	PQYRADIGAYMGNQWMARNLQMQLYDREGSQYRNADGSVWARFKAGKA ESEAVSGNIDMDSNYSQFQLGGDILAWGNGQQSVTVGVMASYINADTDS TGNRGADGSQFTSSGNVDGYNLGVYATWFADAQTHSGAYVDSWYQYGFY NNSVESGDAGSESYDSTANAVSLETGYRYDIALSNGNTVSLTPQAQVWV QNYSAHSVKNYGRIDGQDGDWSWTTRLGLRVDGKLYKGSRTVIQPF ANWLHTSDDVSVSFDDATVKQDLPANRAELKVGLQADIDKQWSVRAQVA GQTGSNDFGDLNGSLNLRYNW
ShdA100 (Autotransportador ShdA con 112 aminoácidos en su dominio alfa),	RLYWNESDNDWYLASKAQSDDDDDSGGDDTPSDGGDDGGNVTPDDGGDG GNVTPDDGGDGGDVTPPDHGGDVAPQYRADIGAYMGNQWMARNLQMQL LYDREGSQYRNADGSVWARFKAGKAESEAVSGNIDMDSNYSQFQLGGDI LAWGNGQQSVTVGVMASYINADTDS TGNRGADGSQFTSSGNVDGYNLGV YATWFADAQTHSGAYVDSWYQYGFY NNSVESGDAGSESYDSTANAVSLE TGYRYDIALSNGNTVSLTPQAQVWVQNYSAHSVKNYGRIDGQDGDWS TTRLGLRVDGKLYKGSRTVIQPFANWLHTSDDVSVSFDDATVKQDLP ANRAELKVGLQADIDKQWSVRAQVAGQTGSNDFGDLNGSLNLRYNW

5.1.2. Optimización geométrica y evaluación de la calidad estereoquímica

La optimización de la geometría molecular se realizó en el programa GROMACS empleando el campo de fuerza CHARMM27, un máximo de 50,000 pasos, tamaño de pasos de minimización (emstep) de 0.01 y la detención de la minimización a los 1000 KJ/mol/nm (Van Del Spoel et al., 2005; Rabet & Raabe, 2022). Los resultados de la minimización fueron sometidos a una evaluación de calidad estereoquímica

mediante el uso de los servidores PDBsum y PROCHECK (McGuffin et al., 2021; Laskowski et al., 2018).

5.1.3. Acoplamiento molecular

Los ensayos de acoplamiento molecular y la determinación de los residuos importantes involucrados en la interacción anticuerpo-antígeno se realizaron utilizando el servidor ClusPro 2.0. Se empleó el modo anticuerpo provisto por el servidor y las regiones no determinantes de la complementariedad (CDR) no se enmascararon automáticamente. Se seleccionó el modelo con el nivel de energía más bajo como el mejor modelo. Posteriormente, la identificación de los residuos que participan en la interacción se realizó en el servidor PDBsum y en el programa PyMOL (Delano & Bromberg, 2004).

5.2. Construcción de las bacterias recombinantes

5.2.1. Cepas bacterianas y oligonucleótidos

Se utilizaron las cepas bacterianas de *E. coli* DH5- α (Sup E44 Δ lac169 ϕ lacZ Δ M15 hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1, Invitrogen) y BL21-DE3 (FompT hsdSB (rBmB) gal dcm DE3, Invitrogen) para la construcción de los plásmidos y la evaluación de la expresión y translocación, respectivamente. Se emplearon diferentes oligonucleótidos que permitieron la amplificación de ShdA y el scFv anti-TfR1, así como el acoplamiento de secuencias de corte de enzimas de restricción a sus extremos (Tabla 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR de los insertos de clonación.

Nombre	Secuencia	Descripción
ShdA100	5' cctttggtGCTAGCCGTCTGTACTGGAA TGAAAGTGAC 3'	Sentido. Sitio de restricción NheI (subrayado)
AntShdA	5' gcgtcattGGATCCTTACCAGTTATAGC GCAGATTGAG 3'	Antisentido. Sitios de restricción BamHI (subrayados).
scFvP-F	5' agctagTCTAGAGAGGTTTCAGTTGCAAC AATCAGGC 3'	Sentido. Sitio de restricción XbaI (subrayado)
scFvP-R	5' cgccgcGGATCCTTAACGGATTTCCAGG CGAGTGCC 3'	Antisentido. Sitio de restricción BamHI (subrayado).
scFvS-F	5' ccccccAAGCTTGAGGTTTCAGTTGCAAC AATCAGGC 3'	Sentido. Sitio de restricción HindIII (subrayado)
scFvS-R	5' ccgcccCTCGAGACGGATTTCCAGGCGA GTGC 3'	Antisentido. Sitios de restricción XhoI (Subrayados).

5.2.2. Características de los plásmidos empleados

En total, se construyeron 4 plásmidos a partir del vector parental *pnirBShdA30*, estos fueron *pnirBShdA100*, *pnirBscFvShdA30*, *pnirBscFvShdA100* y *pnirBscFv*, que codifican las proteínas FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100, scFv/FLAG/ShdA30, scFv/FLAG/ShdA100 y FLAG/scFv, respectivamente (Figura 13).

La secuencia que codifica al autotransportador ShdA100 se obtuvo por amplificación por PCR, empleando como molde el DNA genómico de *Salmonella enterica* Typhimurium SL3261. La secuencia que codifica al scFv anti-TfR1 se obtuvo de manera similar, utilizando el plásmido *pMAL-c5X-scFv* como molde. Este plásmido codifica al scFv anti-TfR1 fusionado a la proteína de unión a manosa (MBP), construido y evaluado previamente (Aguilar-González, 2018).

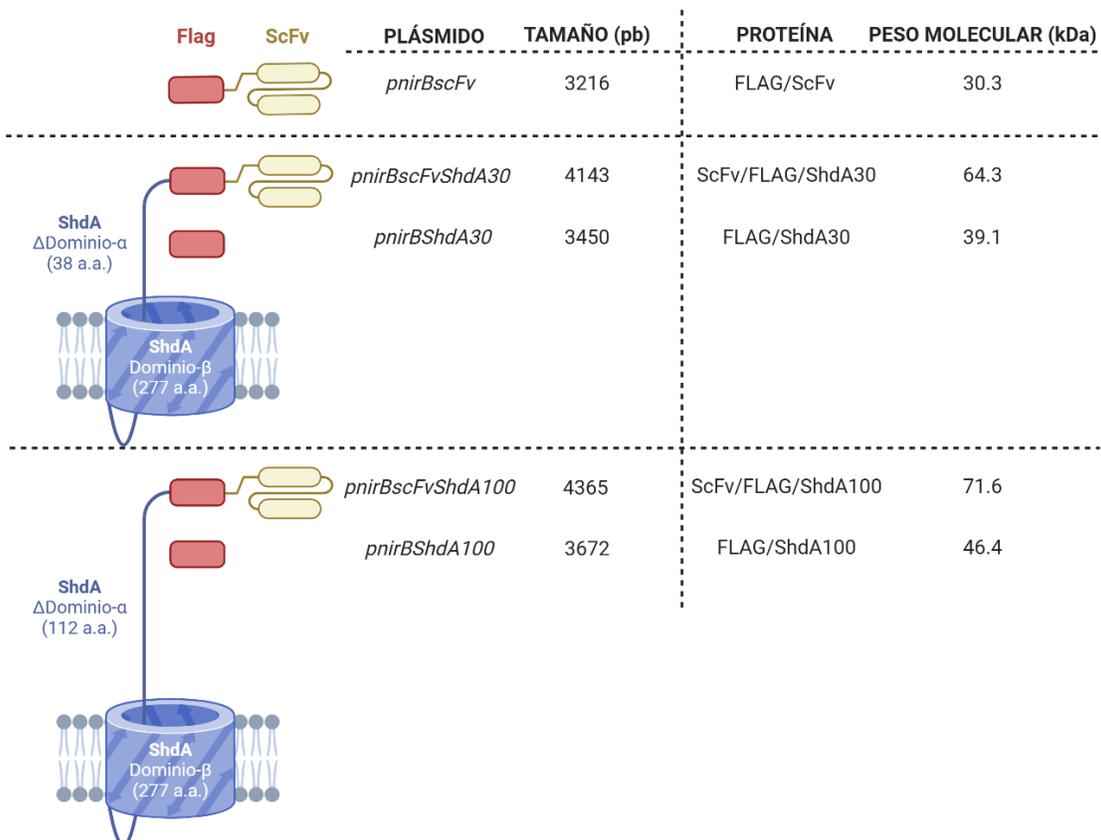


Figura 13. Proteínas recombinantes expresadas por los plásmidos propuestos. Las proteínas recombinantes ShdA30, ShdA100, scFv-ShdA30, scFv-ShdA100 se expresan y se translocan a la superficie bacteriana mediante el autotransportador ShdA. Mientras que la proteína recombinante scFv se expresa a nivel del periplasma bacteriano. El dominio β de ShdA está constituido por 277 aminoácidos, y el dominio α mutado contiene 38 (ShdA30) o 112 aminoácidos (ShdA100). Imagen realizada en BioRender.

Plásmido *pnirBShdA30*: Plásmido parental empleado para la construcción de los demás plásmidos. Presenta una región de resistencia a la ampicilina, el origen de replicación ColEI, el promotor de la nitrato reductasa (*nirB*) y codifica para la proteína ShdA30 (autotransportador ShdA30 con 38 aminoácidos de dominio pasajero) fusionada a la bandera molecular FLAG y a la señal de la toxina termolábil de *E. coli* (LTB) en su extremo N-terminal (Peso molecular: 39.1 kDa). Además, presenta un sitio de clonación múltiple que presenta las secuencias de corte de las enzimas de restricción XbaI, HindIII, SpeI, Sall y XhoI (Figura 14). La proteína se transloca hacia la membrana externa.

Plásmidos *pnirBShdA100*: Plásmido construido a partir de *pnirBShdA30*, con la diferencia que codifica para la proteína ShdA100 (autotransportador ShdA con 112 aminoácidos de dominio pasajero) fusionada a la bandera molecular FLAG y LTB en su extremo N-terminal (Peso molecular: 46.4 kDa). La proteína se transloca hacia la membrana externa.

Plásmido *pnirBscFv*: Plásmido construido a partir de *pnirBShdA30*. Este codifica para la proteína scFv anti-TfR1 fusionada a la bandera molecular FLAG y LTB en su extremo N-terminal (Peso molecular: 30.3 kDa). La proteína se expresa y se transloca hacia el periplasma.

Plásmido *pnirBscFvShdA30*: Plásmido construido a partir de *pnirBShdA30*. Este codifica para la proteína ShdA30 fusionada a la bandera molecular FLAG, el scFv anti-TfR1 y LTB en su extremo N-terminal (Peso molecular: 64.3 kDa). La proteína se transloca hacia la membrana externa.

Plásmido *pnirBscFvShdA100*: Plásmido construido a partir de *pnirBShdA100*. Este codifica para la proteína ShdA100 fusionada a la bandera molecular FLAG, el scFv anti-TfR1 y LTB en su extremo N-terminal (Peso molecular: 71.6 kDa). La proteína se transloca hacia la membrana externa.

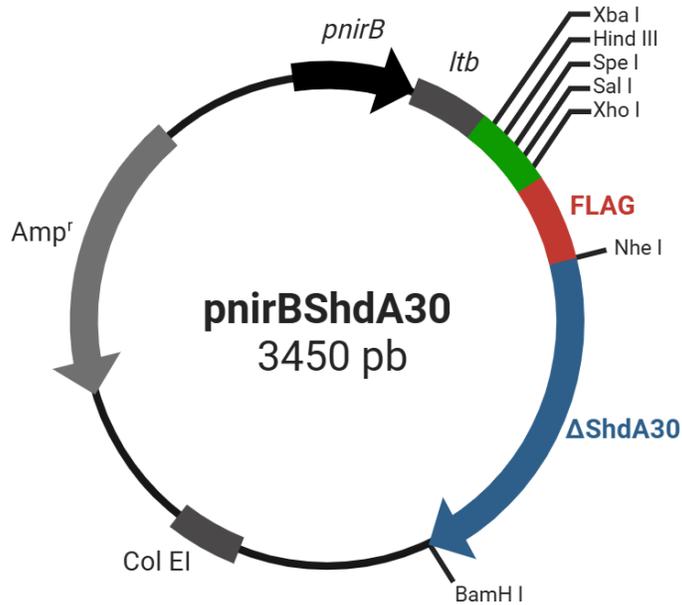


Figura 14. Estructura del plásmido *pnirBShdA30*. Este plásmido cuenta con una región de resistencia a la ampicilina, el origen de replicación Col EI y una región codificante bajo el control del promotor *nirB* (negro). Este promotor promueve la expresión de la región codificante en condiciones microaerofílicas. La región codificante presenta el péptido LTB (que permite la translocación de las proteínas al periplasma), una región de clonación múltiple (verde), el péptido FLAG (rojo) y el autotransportador ShdA30 (38 aminoácidos de dominio pasajero, azul). Imagen realizada en BioRender.

5.2.3. PCR para la amplificación del autotransportador *ShdA100* y del scFv anti-TfR1 con sitios de corte flanqueantes

Para la amplificación del autotransportador ShdA100 se empleó DNA genómico de *Salmonella enterica* Typhimurium SL3261 como molde. Se consideró un volumen final de 20 μ L con 1 μ g de DNA molde, 200 μ M de los dNTPs (New England Biolabs), 1 pM del primer sentido ShdA100, 1 pM del primer antisentido AntShdA, 1.5mM de $MgSO_4$ (Invitrogen), 1 U de Pfx DNA polimerasa (Invitrogen) y 1X de amortiguador Pfx DNA polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo de desnaturalización (94°C, 3.5 minutos); 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 15 segundos), alineamiento (64°C, 30 segundos) y extensión (72°C, 1 minuto); extensión final (72°C, 10 minutos); y enfriamiento (4°C).

Asimismo, para la amplificación del scFv anti-TfR1 se empleó al plásmido *pMALc5x-scFv* como molde (Aguilar-González, 2018). Se consideró un volumen final de 20 μ L con 1 μ g de DNA molde, 200 μ M de los dNTPs (New England Biolabs), 1 pM del primer sentido scFvP-F o scFvS-F, 1 pM del primer antisentido scFvP-R o scFvS-R,

1.5 mM de MgSO₄ (Invitrogen), 1 U de Pfx DNA polimerasa (Invitrogen) y 1X de amortiguador Pfx DNA polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo de desnaturalización (94°C, 3.5 minutos); 30 ciclos de desnaturalización (94°C, 15 segundos), alineamiento (64°C, 30 segundos) y extensión (72°C, 1 minuto); extensión final (72°C, 10 minutos); y enfriamiento (4°C).

5.2.4. Estrategia general para la construcción de los plásmidos

Para construir los diferentes plásmidos propuestos codificantes para las proteínas recombinantes de interés se empleó la tecnología del DNA recombinante partiendo del plásmido *pnirBShdA30* (Figura 15).

Para la construcción de los plásmidos controles *pnirBShdA100* y *pnirBscFv* se realizaron dos cortes consecutivos con las enzimas de restricción NheI-HF y BamHI-HF (New England Biolabs) del plásmido *pnirBShdA30* durante toda la noche a 37°C, esto permitió separar y purificar al vector *pnirB* de la región que codifica para el autotransportador ShdA30 empleando el kit QIAquick Gel Extraction (QUIAGEN). Luego, los productos de PCR ShdA100 y scFv, flanqueados por los sitios de restricción NheI/BamHI y XbaI/BamHI, fueron sometidos a tres digestiones con las enzimas de restricción correspondientes durante toda la noche a 37°C para exponer sus extremos cohesivos. Estos fragmentos fueron purificados empleando el kit QIAquick PCR Purification (QUIAGEN). Finalmente, se realizó la ligación entre el vector *pnirB* y el inserto ShdA100 o scFv, empleando DNA ligasa T4 (New England Biolabs) durante toda la noche a 4°C. La cepa competente DH5- α de *E. coli* fue transformada por choque térmico con los productos de ligación, y las clonas obtenidas fueron evaluadas por análisis de restricción para confirmar la construcción de los plásmidos *pnirBShdA100* y *pnirBscFv* (Figura 15a).

Posteriormente, se construyeron los plásmidos *pnirBscFvShdA30* y *pnirBscFvShdA100*, que permiten la producción de las proteínas recombinantes scFv/FLAG/ShdA30 y scFv/FLAG/ShdA100, respectivamente, que translocan el scFv anti-TfR1 a la superficie bacteriana. Para esto, se utilizaron los plásmidos *pnirBShdA30* y *pnirBShdA100* como vectores parentales. Ambos plásmidos fueron sometidos a tres cortes consecutivos con las enzimas de restricción HindIII y XhoI

(New England Biolabs) durante toda la noche a 37°C para linealizar los plásmidos y exponer los extremos cohesivos de los sitios de corte HindIII y XhoI en sitio de clonación múltiple. Luego los fragmentos fueron purificados empleando el kit QIAquick Gel Extraction (QUIAGEN). El producto de PCR de scFv anti-TfR1, flanqueado por los sitios de restricción HindIII/XhoI, fue sometido a tres digestiones con las enzimas de restricción correspondiente durante toda la noche a 37°C para dejar sus extremos cohesivos expuestos. Estos fragmentos fueron purificados empleando el kit QIAquick PCR Purification (QUIAGEN). La ligación se realizó con DNA ligasa T4 durante toda la noche a 4°C, y los productos fueron empleados para transformar a *E. coli* DH5- α competente (cloruro de rubidio, RbCl) por choque térmico. Las colonias obtenidas fueron evaluadas por análisis de restricción para confirmar la construcción de los plásmidos *pnirBscFvShdA30* y *pnirBscFvShdA100* (Figura 15b).

5.2.5. Transformación de *Escherichia coli*

La transformación de *E. coli* DH5- α y BL21-DE3 se realizó por choque térmico. Brevemente, se agregó el producto de ligación o 100 ng de DNA plasmídico a *E. coli* DH5- α o BL21-DE3 competentes y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se realizó el choque térmico en baño maría a 42°C por 90 segundos, seguido inmediatamente de una incubación por 3 minutos en hielo. Posteriormente, se adicionó 200 μ L de medio súper óptimo con represor catabólico (SOC) (Invitrogen) y se incubó 1 hora a 37°C en agitación constante a 200 rpm. Finalmente, las bacterias transformadas se sembraron en placas Petri con agar infusión de cerebro-corazón (BHI) y ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron por 12 horas a 37°C.

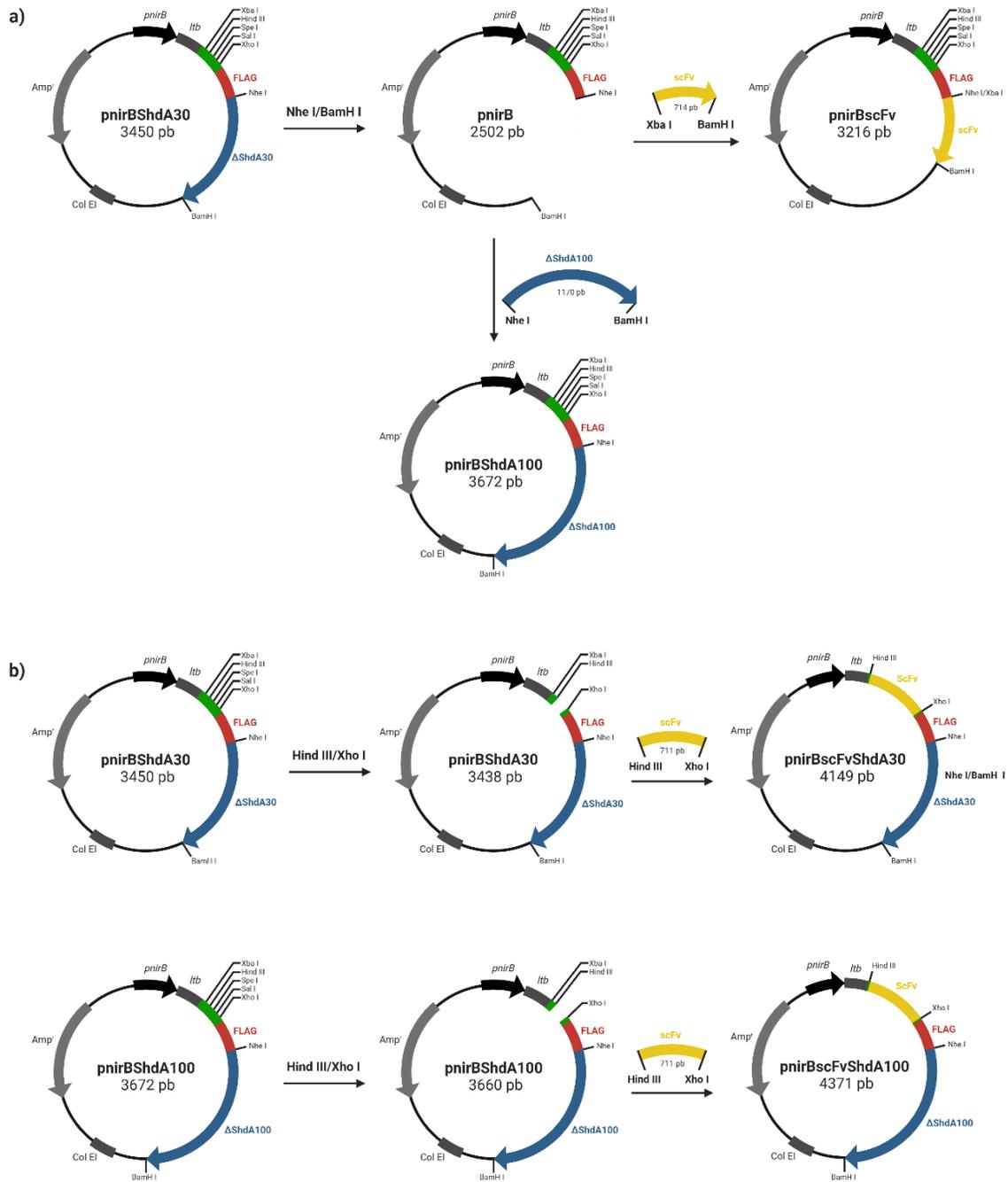


Figura 15. Estrategia general de construcción de los plásmidos. a) Brevemente, la construcción de los plásmidos *pnrBShdA100* y *pnrBscFv* se realizó empleando el vector *pnrB* y los insertos *ShdA100* y *scFv*, respectivamente, los cuales reemplazaron la región ocupada por *ShdA30* en el plásmido *pnrBShdA30*. b) Mientras que para la construcción de los plásmidos *pnrBscFvShdA30* y *pnrBscFvShdA100* se realizó la inserción de la región que codifica para el *scFv* en la región de clonación múltiple, empleando como vectores parentales a los plásmidos *pnrBShd30* y *pnrBShdA100*, respectivamente. Imagen realizada en BioRender.

5.2.6. Secuenciación de los plásmidos

La secuenciación de los plásmidos construidos se realizó empleando el Kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Brevemente, considerando un volumen de reacción final de 20 μ L se agregaron: 8 μ L de BigDye Terminator, 4 μ L del amortiguador BigDye, 120 ng de plásmido molde y 2.5 pM de primer sentido o antisentido. Las condiciones de la reacción de secuenciación fueron: 1 ciclo de desnaturación (95°C, 3 minutos); 60 ciclos de desnaturación (95°C, 30 segundos), alineamiento (59.2°C, 10 segundos) y extensión (60°C, 4 minutos); y enfriamiento (4°C). El producto de la reacción se purificó empleando columnas Centri-Sep (Invitrogen), se secó al vacío y se resuspendió en 20 μ L de formamida. Finalmente, la lectura se realizó en el secuenciador 2500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

5.2.7. Condiciones de cultivo e inducción

La incubación de *E. coli* DH5- α y BL21-DE3 transformadas se realizó en placas Petri con agar BHI y ampicilina (100 μ g/mL) a 37°C por 12 horas. Luego, se tomó una asada y se depositó en 5 mL de caldo BHI con ampicilina (100 μ g/mL) en tubos estériles de 15 mL y se incubó a 37°C por 10 horas en agitación a 200 rpm. Posteriormente, se tomaron 50 μ L y se depositaron en tubos de 15 mL con 5 mL de caldo BHI con ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron bajo las mismas condiciones.

Las condiciones de inducción de la expresión de las proteínas recombinantes se realizaron en condiciones microaerófilas. Para ello, se depositaron 50 μ L del segundo cultivo en caldo BHI con ampicilina (100 μ g/mL) en tubos de 15 mL estériles rebosados de caldo tioglicolato con ampicilina (100 μ g/mL) y se cerraron herméticamente. La incubación se realizó a 37°C por 6, 8, 10 y 12 horas en condiciones de agitación a 200 rpm.

5.2.8. Cinética de crecimiento

Las curvas de crecimiento de *E. coli* DH5- α y BL21-DE3 recombinantes se realizaron en caldo BHI con ampicilina (100 μ g/mL) durante 16 horas, tomando muestras cada 2 horas. El cálculo de la concentración bacteriana se realizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm.

5.3. Evaluación de la expresión y translocación de las proteínas recombinantes a la superficie bacteriana

5.3.1. Extracción de proteínas totales

Se emplearon aproximadamente 3×10^9 bacterias *E. coli* BL21-DE3 recombinantes previamente inducidas. Estas se centrifugaron a 5000 rpm por 4 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspendió en 1 mL de buffer salino fosfato a pH de 7.4 1X (PBS 1X). Luego, se centrifugó a 5000 rpm por 4 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspendió en 300 μ L de urea 8M. Finalmente, se lisaron las bacterias por sonicación, se centrifugaron a 13,500 rpm por 4 minutos y se recuperó el sobrenadante.

5.3.2. Ensayo de dot blot

Se depositaron 10 μ L de cada muestra de proteínas totales provenientes de *E. coli* BL21-DE3 recombinante en una membrana de nitrocelulosa y se dejó secar durante 1 hora. Luego se realizó el bloqueo con solución de leche descremada al 5% en PBS 1X durante 1 hora a 25°C y se lavó una vez con PBS 1X con Tween al 0.05% (PBST) y 3 veces con PBS 1X, 5 minutos por lavado. La membrana se incubó durante 4 horas a 25°C con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-FLAG (1 mg/ml, Sigma-Aldrich) diluido 1:1000 en PBS 1X con albúmina de suero bovino al 1% (PBA) y se lavó una vez con PBST al 0.05% y 3 veces con PBS 1X, 5 minutos por lavado. Luego la membrana se incubó durante 1 hora a 25°C con el anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón HRP (1mg/ml, Abcam) diluido 1:1000 en PBA y se lavó 1 vez con PBST al 0.05% y 3 veces con PBS 1X, 5 minutos por lavado. Finalmente, las membranas se revelaron con luminol (Santa Cruz Biotechnology) y las imágenes fueron tomadas en el equipo ChemiDoc (Bio-Rad).

5.3.3. Citometría de flujo e inmunofluorescencia

Luego de ser inducidas, se tomaron a 2×10^8 bacterias *E. coli* recombinantes y se centrifugaron por 4 minutos a 13,500 rpm y 4°C. Posteriormente se lavaron con 1 mL de PBS 1X y nuevamente se centrifugaron durante 4 minutos a 13,500 rpm y 4°C. Se eliminó el sobrenadante y los pellets bacterianos se resuspendieron con 20 μ L de anticuerpo anti-FLAG FITC inducido en ratón (Sigma-Aldrich) diluido 1:100 y

se incubaron durante 3 horas a 4°C en oscuridad. Luego, se lavaron con 1 mL de PBS 1X y se centrifugaron durante 4 minutos a 13,500 rpm y 4°C; se descartó el sobrenadante y los pellets bacterianos fueron resuspendidos en 150 µL de Sheath Fluid (Beckman Coulter) y 50 µL de solución FixFACS (p-formaldehído al 4% en PBS 1X) para analizarse por citometría de flujo empleando el equipo CytoFLEX (Beckman Coulter), o en 10 µL de PBS 1X para su análisis por microscopía de fluorescencia en el equipo IX-73 (Olympus).

5.3.4. Cinética de expresión

Para determinar el tiempo óptimo de inducción para una mayor expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli* BL21-DE3, se realizó una cinética de expresión con tiempos de inducción de 6, 8, 10 y 12 horas en caldo tioglicolato con ampicilina (100 µg/mL). El nivel de expresión se evaluó por citometría de flujo empleando el anticuerpo anti-FLAG FITC diluido 1:100 en PBS 1X.

5.4. Evaluación de la adhesión en células humanas de LNH

5.4.1. Evaluación del nivel de expresión de TfR1 en la línea celular Ramos por citometría de flujo

Brevemente, 300,000 células Ramos (LNH humano) fueron tratadas con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-TfR1 OKT9 (1:200 en PBA) durante 2 horas a 4°C. Al finalizar la incubación, se realizaron 2 lavados con PBS 1X. Luego, se incubó las células con el anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón FITC (1:200 en PBA) durante 2 horas a 4°C en oscuridad. Se realizaron 2 lavados con PBS 1X y las células se resuspendieron en 150 µL de Sheath Fluid (Beckman Coulter) y 50 µL de solución FixFACS (p-formaldehído al 4% en PBS 1X) para analizarse en el equipo CytoFLEX (Beckman Coulter).

5.4.2. Evaluación de la unión del scFv anti-TfR1 a la línea celular Ramos por citometría de flujo

De manera similar, se trataron 300,000 células Ramos con 25 µg de extractos bacterianos obtenidas por sonicación de *E. coli* BL21-DE3 recombinante que expresan la proteína quimérica MBP/scFv anti-TfR1, previamente inducida con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 2 horas. Posterior a la

incubación con los extractos, se realizaron 2 lavados con PBS 1X y, en seguida, se agregó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-MBP (Abcam) diluido 1:200 en PBA durante 2 horas a 4°C, seguido de 2 lavados con PBS 1X. Finalmente, las células se incubaron con el anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón FITC (1:200 en PBA) durante 2 horas a 4°C y, posterior a los 2 lavados con PBS 1X, las células se resuspendieron en 150 µL de Sheath Fluid (Beckman Coulter) y 50 µL de solución FixFACS (p-formaldehído al 4% en PBS 1X) y se analizaron en el equipo CytoFLEX (Beckman Coulter).

5.4.3. Ensayos de adhesión bacteriana a proteínas inmovilizadas de células Ramos

Se lisaron 3×10^6 de células Ramos (LNH humano) por sonicación en PBS 1X; luego, el extracto obtenido se centrifugó a 13,500 rpm por 4 minutos y se recuperó el sobrenadante. La concentración de proteína en el sobrenadante fue evaluada por medio del kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific) en placas de 96 pozos y leída a 562 nm en el lector de placas EPOCH (BioTek).

Se sensibilizaron placas de 96 pozos (Corning) con 5 µg/mL de extractos proteicos de células Ramos (que expresan el TfR1) durante toda la noche a 4°C; seguido de esto, se realizaron 4 lavados de 5 minutos con 100 µL de PBS 1X. Se bloqueó la placa con 200 µL por pozo de leche descremada al 3% en PBS 1X y se realizaron los lavados como se indicó anteriormente. Posteriormente, se agregaron 100 µL de *E. coli* BL21-DE3 recombinante (que expresa y transloca el scFv anti-TfR1 y controles) previamente inducida durante 8 horas y resuspendida en PBS 1X ($OD_{540} = 3$). La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 2 horas, y al finalizar, se realizaron 5 lavados de 5 minutos con 100 µL de PBS 1X. La cantidad de bacterias adheridas al fondo de los pozos se observó en el microscopio invertido IX-73 (Olympus); la cantidad de bacterias por campo se analizó en el programa ImageJ, para un total de 3 réplicas (Figura 16).

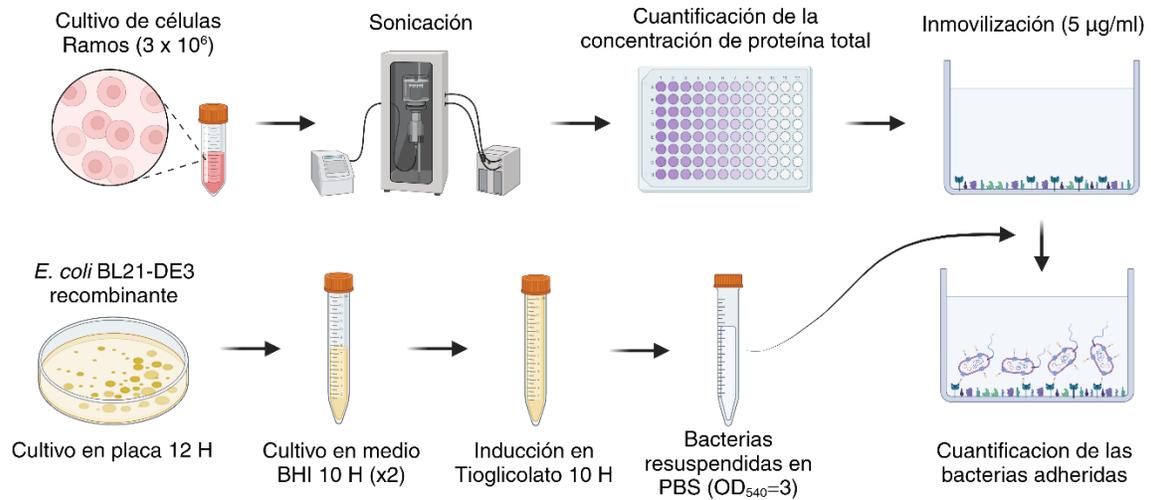


Figura 16. Ensayo de adhesión bacteriana a proteínas inmobilizadas de células Ramos. Se lisaron 3×10^6 células Ramos por sonicación y se cuantificó la cantidad de proteína en los extractos. Empleando una concentración de $5 \mu\text{g/mL}$, se sensibilizó una placa de 96 pozos durante toda la noche. La placa se lavó con PBS 1x y se bloqueó con leche descremada al 3%. Luego, se incubó con las bacterias recombinantes previamente inducidas a temperatura ambiente durante 2 horas. Finalmente, la placa se lavó con PBS 1X y se observó por microscopía óptica. Imagen realizada en BioRender.

6. RESULTADOS

6.1. La simulación de acoplamiento molecular entre el scFv anti-TfR1 y el TfR1 predice una adecuada interacción

A partir de la secuencia aminoacídica del scFv anti-TfR1, se realizó el modelaje y la optimización de su estructura tridimensional en el servidor AlphaFold 2 y el programa GROMACS. La estructura obtenida muestra un correcto plegamiento de los dominios variables de la cadena pesada (VH) y ligera (VL) unidos por un conector flexible de GS que permite que ambos interactúen correctamente (Figura 17a). La calidad estereoquímica evaluada por el análisis de Ramachandran, muestra que la mayoría de los residuos aminoacídicos presentan una correcta orientación encontrándose en regiones muy favorables (Figura 17b). Esta proteína está compuesta por 20 estructuras β -plegadas y 4 α -hélices cortas, así como por dos puentes disulfuro (Figura 17c).

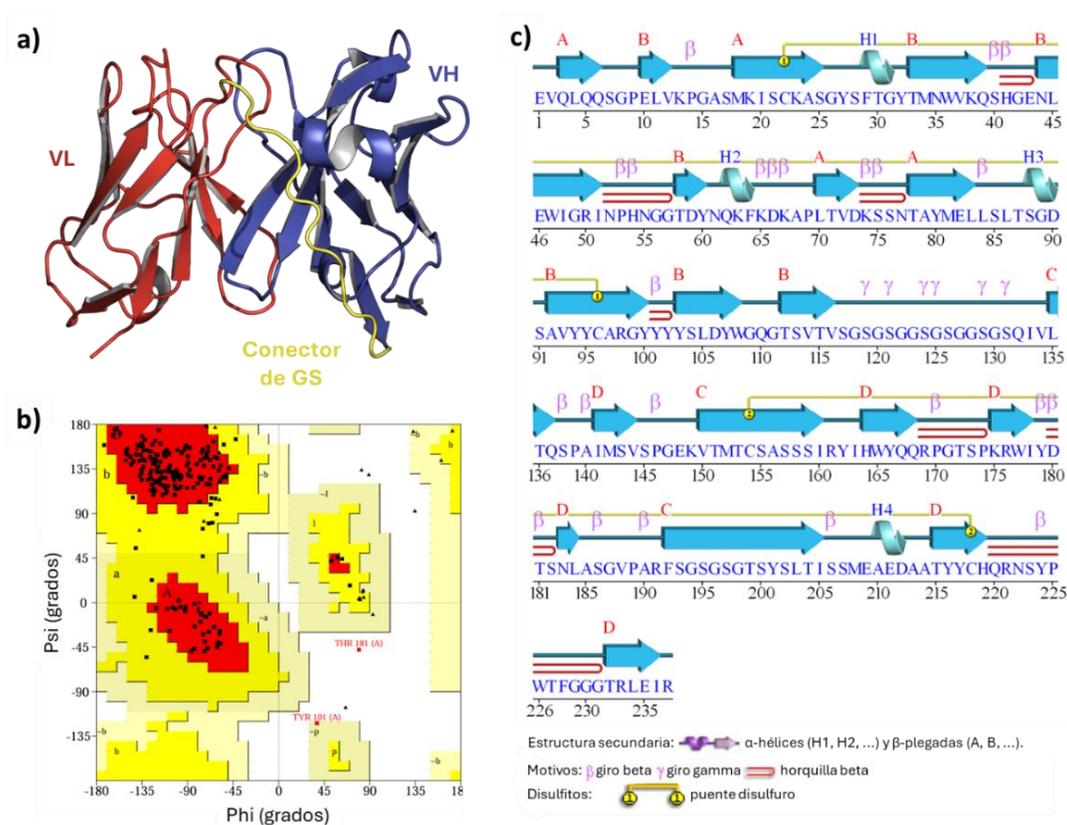


Figura 17. Modelaje y análisis de la estructura tridimensional del scFv anti-TfR1. a) Modelo tridimensional de la estructura del scFv anti-TfR1. b) Gráfico de Ramachandran para la evaluación de la calidad estereoquímica del modelo. c) Análisis de las estructuras secundarias de la proteína scFv anti-TfR1.

La estructura del scFv anti-TfR1 modelada fue empleada para realizar el análisis de acoplamiento molecular contra la estructura del TfR1 humano extraída de la base de datos PDB (3KAS). El resultado muestra que la interacción se da a nivel de las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) del scFv y del dominio apical del TfR1 humano; asimismo, se obtuvo un Weighted Score de -463.8, lo que indica la robustez de la simulación (Figura 18a). En esta interacción participan 23 residuos del dominio apical de TfR1 y 18 residuos de los CDRs del scFv anti-TfR1, formando 23 puentes de hidrógeno y 2 puentes salinos (Figura 18b).

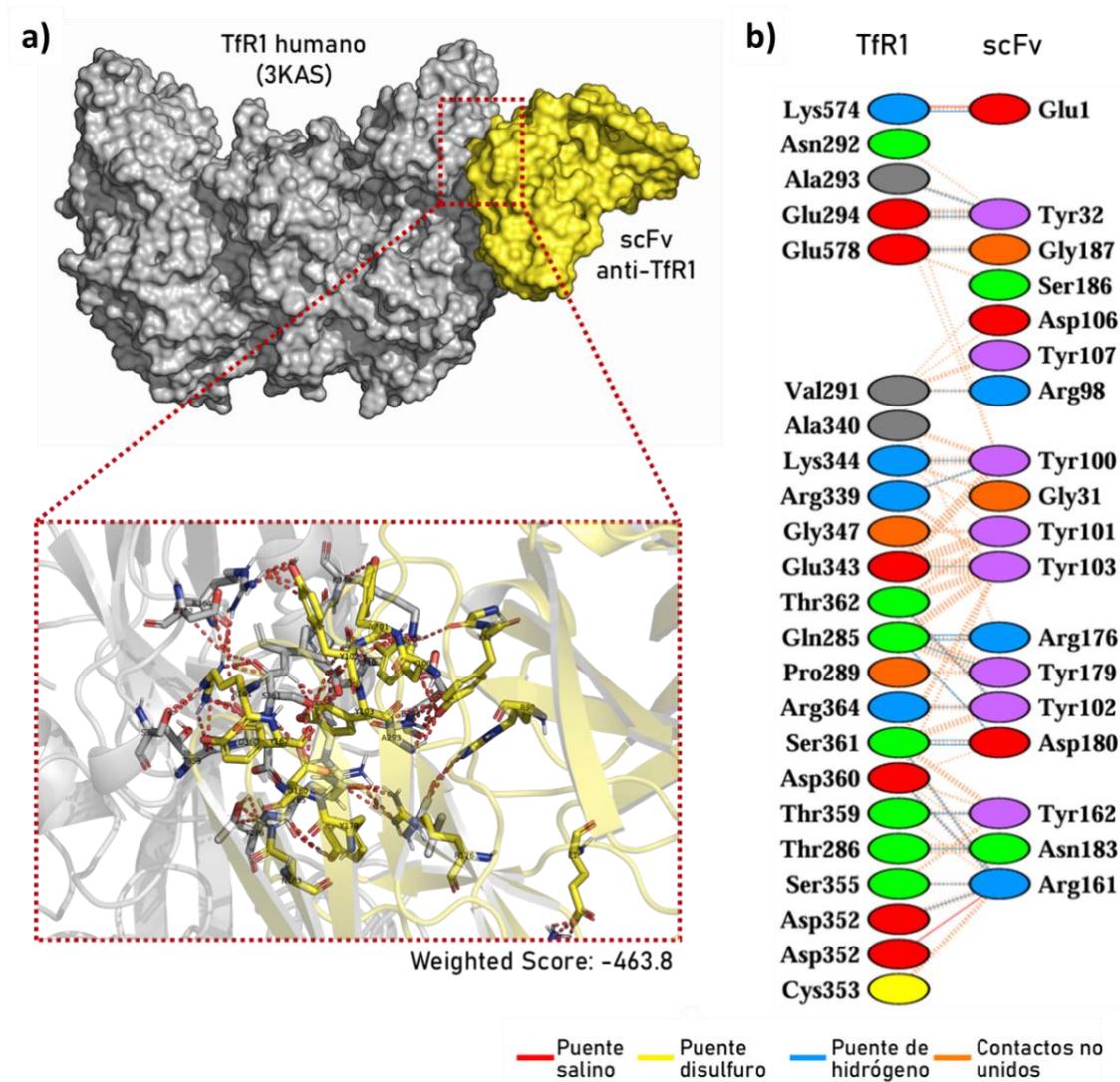


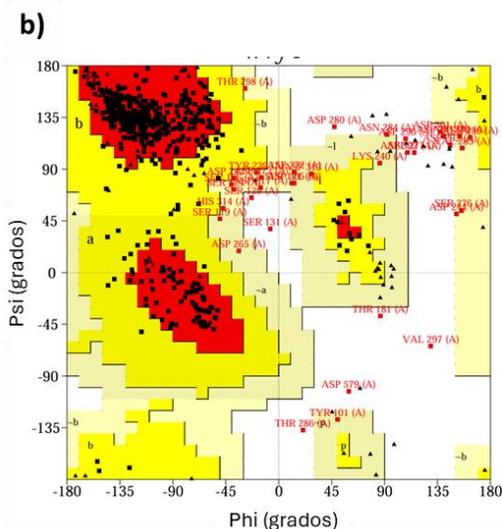
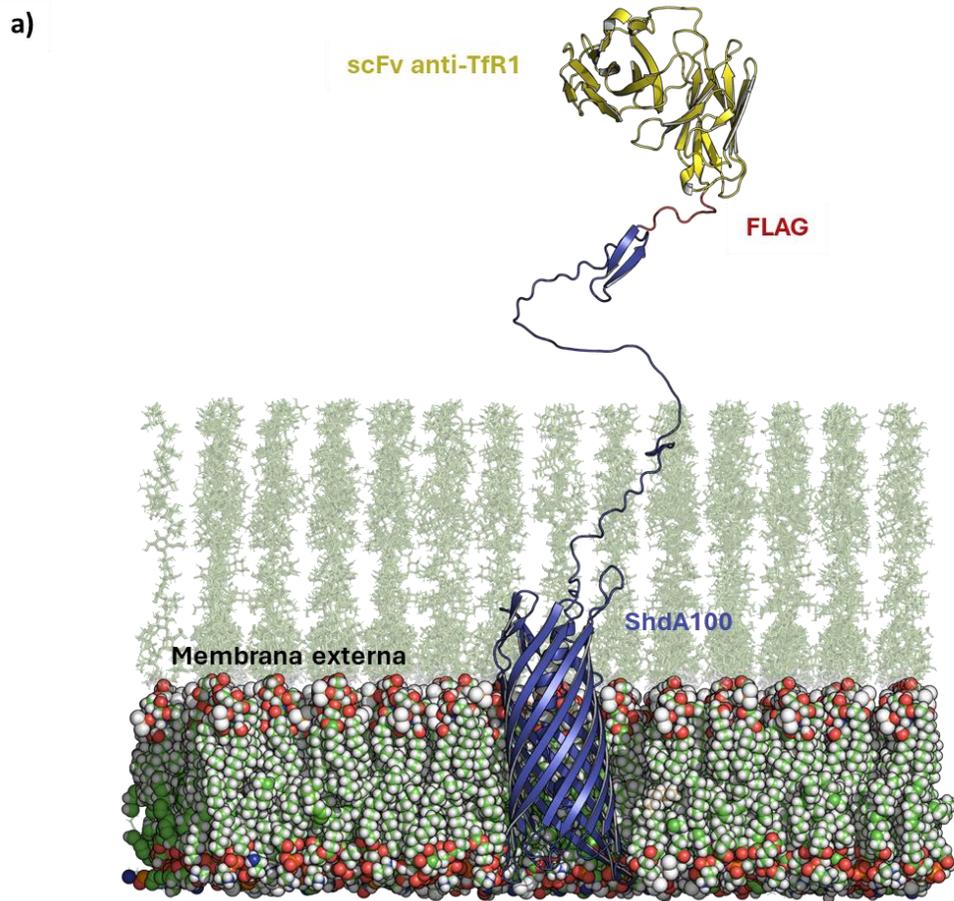
Figura 18. Simulación de acoplamiento molecular entre la estructura del TfR1 humano y el scFv anti-TfR1. a) Visualización en PyMOL de la interacción predicha entre el dominio apical del TfR1 humano y el scFv anti-TfR1. b) Interacción de los residuos aminoacídicos del TfR1 humano y el scFv anti-TfR1.

6.2.El modelo tridimensional de la proteína recombinante scFv/FLAG/ShdA100 predice una conformación adecuada y la translocación del scFv-TfR1 a la superficie bacteriana a través del autotransportador ShdA

Se empleó el mismo protocolo para el modelaje y optimización de la estructura de la proteína recombinante scFv/FLAG/ShdA100. Adicionalmente, se realizó la predicción y simulación de la inserción de esta proteína a la membrana externa de *E. coli* en el servidor CHARMM-GUI utilizando la herramienta membrane builder. La visualización de los resultados se realizó en el programa PyMOL.

La estructura muestra un correcto plegamiento de la proteína recombinante conformada por el autotransportador ShdA100 (dominio β -barril y el dominio pasajero de 112 aminoácidos), la bandera molecular FLAG y el scFv anti-TfR1. Se observa que el dominio pasajero está conformado por una región intrínsecamente desordenada, lo que otorga una mayor libertad de movimiento al scFv anti-TfR1 situado en la superficie bacteriana (Figura 19a). El análisis estereoquímico indica un resultado moderado, con menos del 3% de aminoácidos en regiones poco favorables, debido a la presencia de un dominio intrínsecamente desordenado (Figura 19b).

La predicción y simulación de la inserción a la membrana externa de *E. coli* muestra un correcto posicionamiento de la proteína recombinante. Como se ha reportado previamente, el dominio β -barril de este autotransportador se inserta en la membrana externa, proceso favorecido por la presencia de residuos hidrofóbicos que forman una estructura con un espesor hidrofóbico de $25.9 \pm 1.2 \text{ \AA}$ que se embebe en la membrana (Figura 19c). La inserción en la membrana de esta proteína permite que el dominio pasajero junto con el scFv anti-TfR1 sean translocados hacia la superficie de la bacteria. Asimismo, se observa que el largo y flexible dominio pasajero estaría permitiendo exponer el scFv anti-TfR1 más allá del LPS, permitiendo una mejor interacción con su ligando (Figura 19a).



c)

Espesor hidrofóbico	ΔG transferido
25.9 \pm 1.2 Å	51.5 kcal/mol
Residuos embebidos	
338-351,353,357-366,383-393,401-411,437-446,454-465,485-495,505-516,539-549,551,558-569,591-602,605-615,623-634	
Estructuras secundarias embebidas	
1(357- 366), 2(384- 393), 3(402- 411), 4(436- 444), 5(455- 465), 6(485- 495), 7(505-516), 8(539- 549), 9(559- 569),10(592- 600),11(608- 615),12(623- 633)	

Figura 19. Modelaje, análisis y simulación de la inserción a la membrana externa de *E. coli* de la proteína scFv/FLAG/ShdA100. a) Modelo tridimensional de la estructura de la proteína scFv/FLAG/ShdA100 embebida en una simulación de la membrana externa de *E. coli*. Imagen visualizada en PyMOL. b) Gráfico de Ramachandran para la evaluación de la calidad estereoquímica del modelo tridimensional. c) Análisis de los residuos aminoacídicos y las estructuras secundarias embebidas en la membrana externa de *E. coli*.

6.3. Construcción del plásmido *pnirBShdA100*

El plásmido *pnirBShdA30* sirvió como punto de partida para la construcción de los demás plásmidos. Este plásmido codifica la proteína quimérica FLAG/ShdA30 bajo el promotor *nirB*, que es sensible a condiciones hipóxicas (Figura 20a). Se realizó un análisis de restricción para evaluar los sitios de restricción de interés. Los cortes con HindIII, XhoI, NheI y BamHI permitieron linealizar el plásmido, mientras que el corte con NheI/BamHI permitió la separación del vector *pnirB*, con un tamaño de 2502 pares de bases (pb), de la secuencia codificante para el autotransportador ShdA30 (948 pb) (Figura 20b). La secuenciación del plásmido confirmó que todos sus elementos se encuentran en marco de lectura (Figura 20c).

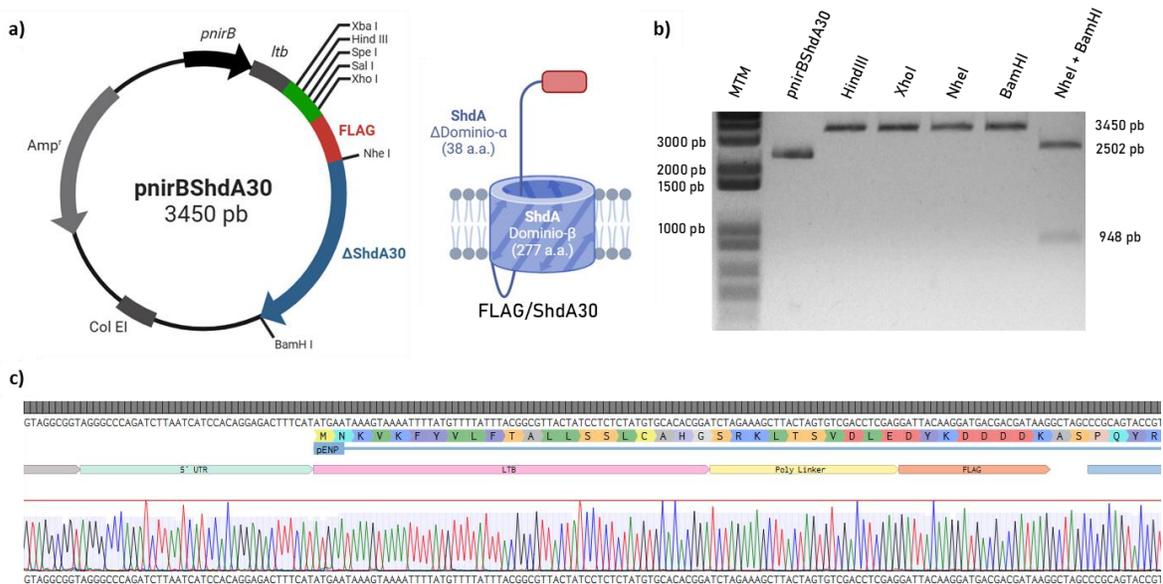


Figura 20. Caracterización del plásmido *pnirBShdA30*. a) Mapa del plásmido *pnirBShdA30* y representación de la proteína que codifica. b) Análisis de restricción en un gel de agarosa al 1%, marcador de tamaño molecular (carril 1, 1 kb Invitrogen), control sin digerir (carril 2) y digestiones del plásmido con las enzimas HindIII, XhoI, NheI, BamHI y NheI/BamHI (carriles 3, 4, 5, 6 y 7). c) Secuencia de las principales regiones del plásmido *pnirBShdA30* (gris: promotor *nirB*, azul: autotransportador ShdA30). MTM: marcador de tamaño molecular, pb: pares de bases. Imagen realizada en BioRender.

La construcción del plásmido *pnirBShdA100* se inició con la obtención de la secuencia codificante del autotransportador ShdA100 flanqueada por los sitios de restricción NheI y BamHI mediante su amplificación por PCR utilizando como molde el DNA genómico de *Salmonella enterica* Typhimurium SL3261 y los primers ShdA100 y antShdA (Figura 21a). Se determinó que la T_m óptima de la reacción

fue de 59.2 °C mediante una PCR en gradiente (Figura 21b). El producto amplificado obtenido a la temperatura óptima se purificó y se sometió a dos digestiones consecutivas con las enzimas NheI/BamHI para exponer los extremos cohesivos de sus sitios de corte y, finalmente, se purificó.

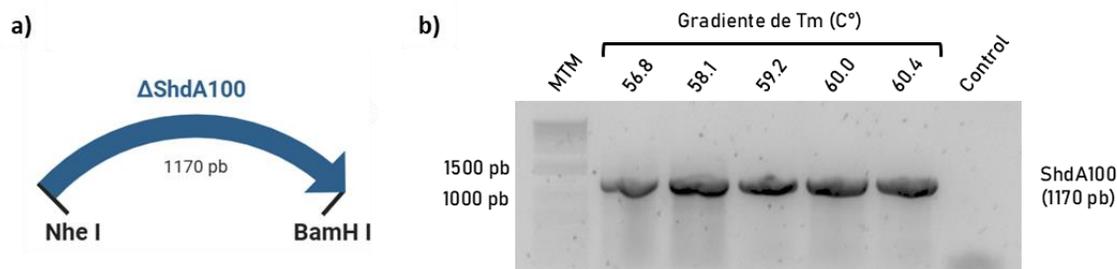


Figura 21. Obtención del fragmento que codifica al autotransportador ShdA100 flanqueado por los sitios de restricción NheI y BamHI. a) Representación gráfica del fragmento que codifica a ShdA100 flanqueado por NheI y BamHI. b) Resultado de la amplificación del fragmento mediante PCR en gradiente de Tm en un gel de agarosa al 1%, marcador de tamaño molecular (carril 1, 1 kb Invitrogen). Control: reacción de PCR sin molde. MTM: marcador de tamaño molecular, pb: pares de bases. Imagen realizada en BioRender.

Para la obtención del vector *pnirB*, el plásmido *pnirBShdA30* fue sometido a dos cortes con las enzimas de restricción NheI/BamHI. Después de correr un gel de agarosa al 1.2% con el producto de la digestión, se purificó la banda correspondiente al vector *pnirB*. Luego se realizó la ligación del vector (*pnirB*) y el inserto (ShdA100) con la DNA ligasa T4 (New England Biolabs), y el producto de ligación se empleó para transformar a *E. coli* DH5- α competentes (Figura 22a). Las colonias obtenidas fueron aisladas y cultivadas para su análisis.

Se evaluó la construcción del plásmido *pnirBShdA100* mediante un análisis de restricción, observándose que el corte con las enzimas NheI/BamHI separa al vector *pnirB* (2502 pb) de la región codificante para el autotransportador ShdA100 (1170 pb) (Figura 22b). Este plásmido codifica para la proteína FLAG/ShdA100, la cual se expresa en la membrana externa bacteriana permitiendo la translocación de la bandera molecular FLAG a la superficie bacteriana (Figura 22c). La secuenciación del plásmido *pnirBShdA100* permitió confirmar que la región que codifica para el autotransportador ShdA100 se encuentra en marco de lectura (Figura 22d).

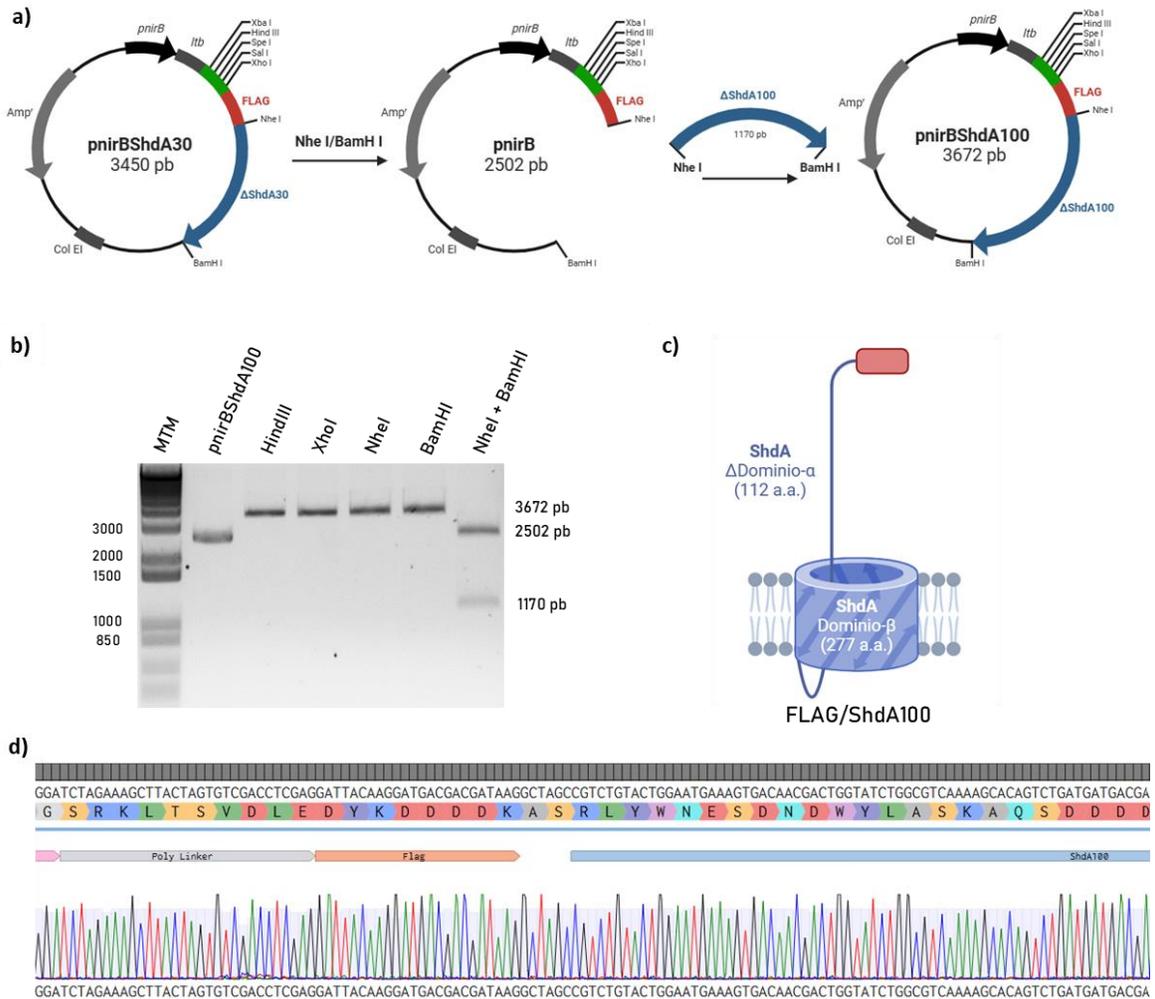


Figura 22. Construcción y caracterización del plásmido *pnirBShdA100*. a) Estrategia de construcción del plásmido *pnirBShdA100*. b) Análisis de restricción en un gel de agarosa al 1%, marcador de tamaño molecular (carril 1, 1 kb Invitrogen), control sin digerir (carril 2) y digestiones del plásmido con las enzimas *Hind*III, *Xho*I, *Nhe*I, *Bam*HI y *Nhe*I/*Bam*HI (carriles 3, 4, 5, 6 y 7). c) Representación de la proteína FLAG/ShdA100, que transloca la bandera molecular FLAG a la superficie bacteriana por medio del autotransportador ShdA100, codificada por el plásmido *pnirBShdA100*. d) Secuencia de las principales regiones del plásmido *pnirBShdA100*. MTM: marcador de tamaño molecular, pb: pares de bases. Imagen realizada en BioRender.

6.4. Construcción del plásmido *pnirBscFv*

De manera similar, la construcción del plásmido *pnirBscFv* requirió la obtención del fragmento codificante para el scFv anti-TfR1 flanqueado por los sitios de restricción XbaI y BamHI (Figura 23a). Una vez más, se realizó una PCR en gradiente de empleando los primers scFvP-F y scFvP-R, observando que la T_m óptima es de 58.4°C (Figura 23b). Empleando el producto de PCR purificado, se realizaron 3 cortes con las enzimas de restricción XbaI/BamHI para dejar expuestos los extremos cohesivos; finalmente, se purificó el producto de la digestión.

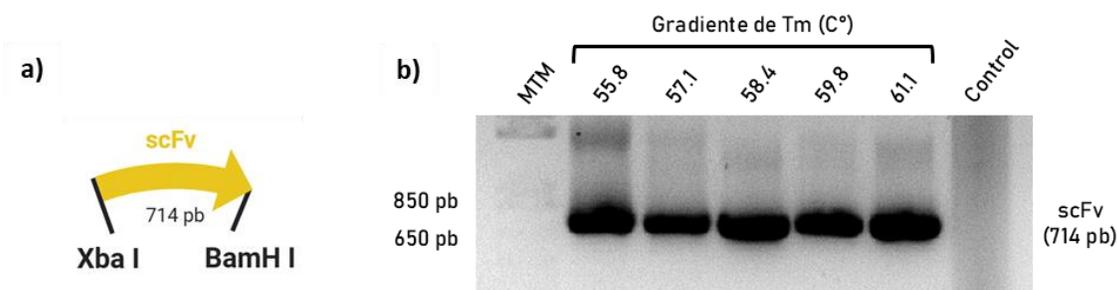


Figura 23. Obtención del fragmento que codifica al scFv anti-TfR1 flanqueado por los sitios de restricción XbaI y BamHI. a) Representación gráfica del fragmento que codifica al scFv anti-TfR1 flanqueado por XbaI y BamHI. b) Resultado de amplificación del fragmento mediante PCR en gradiente de T_m en un gel de agarosa al 1%, marcador de tamaño molecular (carril 1, 1 kb Invitrogen). Control: reacción de PCR sin molde. MTM: marcador de tamaño molecular, pb: pares de bases. Imagen realizada en BioRender.

La obtención del vector (*pnirB*) se realizó de la misma manera que para la construcción del plásmido *pnirBShdA100*. Luego, se realizó la ligación del vector (*pnirB*) y el inserto (scFv) con la DNA ligasa T4 (New England Biolabs), y el producto de ligación se utilizó para transformar a *E. coli* DH5 α competentes (Figura 24a). Las colonias obtenidas fueron aisladas y cultivadas para su análisis. Se confirmó la construcción del plásmido *pnirBscFv* mediante de un análisis de restricción. Se observó que la digestión con las enzimas XbaI y NheI no corta este plásmido debido a la pérdida de estos sitios de restricción durante la ligación; el plásmido puede ser linealizado por el corte con BamHI, y el corte con HindIII/BamHI permite liberar el fragmento correspondiente al scFv anti-TfR1 (714 pb) (Figura 24b). Este plásmido codifica el scFv anti-TfR1 fusionado a la bandera molecular FLAG en el periplasma bacteriano (Figura 24c).

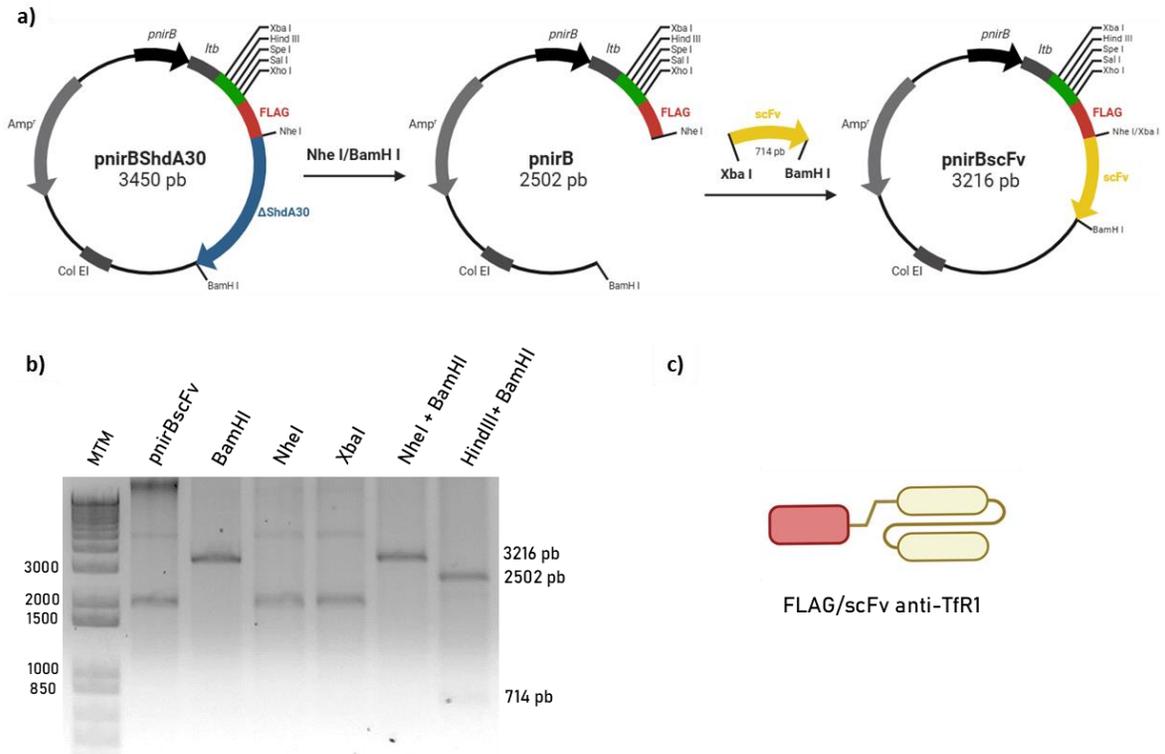


Figura 24. Construcción y caracterización del plásmido *pnrBscFv*. a) Estrategia de construcción del plásmido *pnrBscFv*. b) Análisis de restricción en un gel de agarosa al 1%, marcador de tamaño molecular (carril 1, 1 kb Invitrogen), control sin digerir (carril 2) y digestiones del plásmido con las enzimas BamHI, NheI, XbaI, NheI/BamHI y HindIII/BamHI (carriles 3, 4, 5, 6 y 7). c) Representación de la proteína FLAG/scFv que se expresa a nivel del periplasma, codificada por el plásmido *pnrBscFv*. MTM: marcador de tamaño molecular, pb: pares de bases. Imagen realizada en BioRender.

6.5. Construcción del plásmido *pnirBscFvShdA30*

Para la construcción del plásmido *pnirBscFvShdA30*, primero se amplificó la región codificante para el scFv anti-TfR1 añadiendo los sitios de restricción HindIII y XhoI a sus extremos para su inserción en la región de clonación múltiple (Figura 25a). El resultado de la PCR en gradiente, empleando los primers scFvS-F y scFvS-R, reveló una T_m óptima de 58.4°C (Figura 25b). El producto de PCR se purificó y se llevaron a cabo 3 digestiones consecutivas con las enzimas HindIII/XhoI para exponer los sitios cohesivos. El producto de la digestión fue purificado para después emplearse en una ligación.

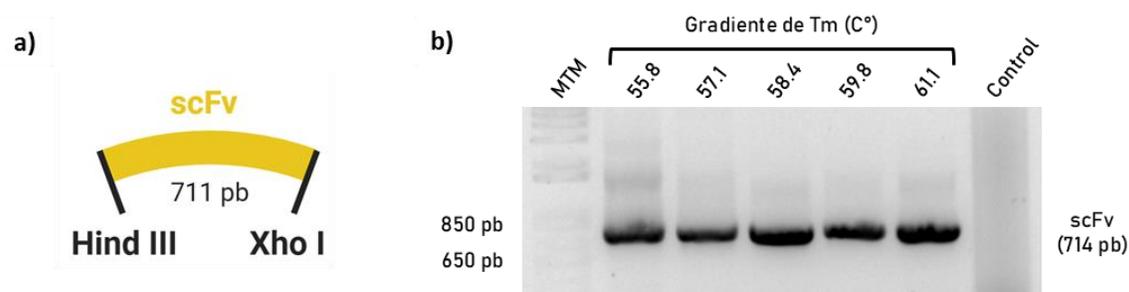


Figura 25. Obtención del fragmento que codifica al scFv anti-TfR1 flanqueado por los sitios de restricción HindIII y XhoI. a) Representación gráfica del fragmento que codifica al scFv anti-TfR1 flanqueado por HindIII y XhoI. b) Resultado de amplificación del fragmento mediante PCR en gradiente de T_m en un gel de agarosa al 1%, marcador de tamaño molecular (carril 1, 1 kb Invitrogen). Control: reacción de PCR sin molde. MTM: marcador de tamaño molecular, pb: pares de bases. Imagen realizada en BioRender.

Para la obtención del vector se realizaron 3 cortes consecutivos con las enzimas de restricción HindIII/XhoI al plásmido *pnirBShdA30*, purificándose el vector linealizado. Luego, se realizó la ligación del vector (*pnirBShdA30*) con el inserto (scFv) empleando la DNA ligasa T4 (New England Biolabs), y se transformó a *E. coli* DH5- α con el producto de la ligación (Figura 26a). Se aislaron las colonias obtenidas y se cultivaron. Posteriormente, se confirmó la construcción del plásmido *pnirBscFvShdA30* mediante un análisis de restricción. El corte con las enzimas HindIII/XhoI permite la liberación del fragmento que codifica para el scFv anti-TfR1 (711 pb), lo que confirma su correcta inserción en el sitio de clonación múltiple. Este plásmido codifica la proteína scFv/FLAG/ShdA30, que permite la translocación del scFv anti-TfR1 a la superficie bacteriana por medio del autotransportador ShdA30

(Figura 26c). La secuenciación permitió confirmar que el fragmento fue insertado en marco de lectura (Figura 26d).

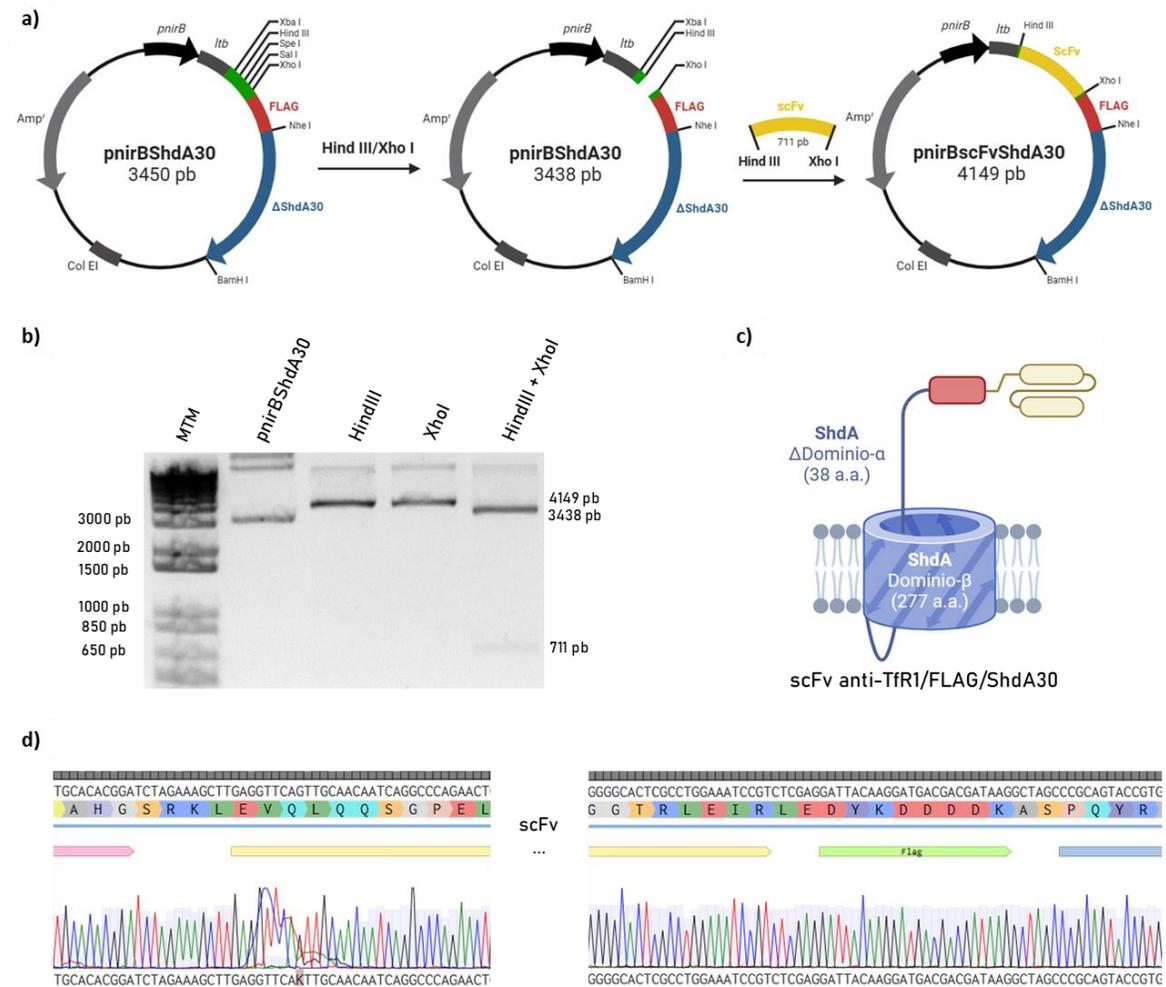


Figura 26. Construcción y caracterización del plásmido *pNirBscFvShdA30*. a) Estrategia de construcción del plásmido *pNirBscFvShdA30*. b) Análisis de restricción en un gel de agarosa al 1%, marcador de tamaño molecular (carril 1, 1 kb Invitrogen), control sin digerir (carril 2) y digestiones del plásmido con las enzimas HindIII, XhoI y HindIII/XhoI (carriles 3, 4 y 5). c) Representación de la proteína scFv/FLAG/ShdA30, que transloca el scFv anti-TfR1 y la bandera molecular FLAG a la superficie bacteriana por medio del autotransportador ShdA30 codificada por el plásmido *pNirBscFvShdA30*. d) Secuencia de las principales regiones del plásmido *pNirBscFvShdA30*. MTM: marcador de tamaño molecular, pb: pares de bases. Imagen realizada en BioRender.

6.6. Construcción del plásmido *pnirBscFvShdA100*

Para la construcción del plásmido *pnirBscFvShdA100* se empleó el mismo inserto utilizado para la construcción del plásmido *pnirBscFvshdA30*, y el vector se obtuvo realizando 3 digestiones consecutivas con las enzimas de restricción HindIII/XhoI al plásmido *pnirBShdA100*, purificando el vector linealizado. Luego, el vector (*pnirBShdA100*) y el inserto (scFv) se ligaron utilizando la DNA ligasa T4 (New England Biolabs), y el producto fue empleado para transformar a *E. coli* DH5- α (Figura 27a). La construcción del plásmido *pnirBscFvShdA100* se confirmó mediante un análisis de restricción, observándose que el corte con las enzimas HindIII/XhoI libera el fragmento que codifica al scFv anti-TfR1 (711 pb) (Figura 27b). Este plásmido codifica la proteínas scFv/FLAG/ShdA100, que permite la translocación del scFv anti-TfR1 a la superficie bacteriana a través del autotransportador ShdA100 (Figura 27c). Finalmente, la secuenciación del plásmido confirmó que el inserto se encuentra en marco de lectura (Figura 27d).

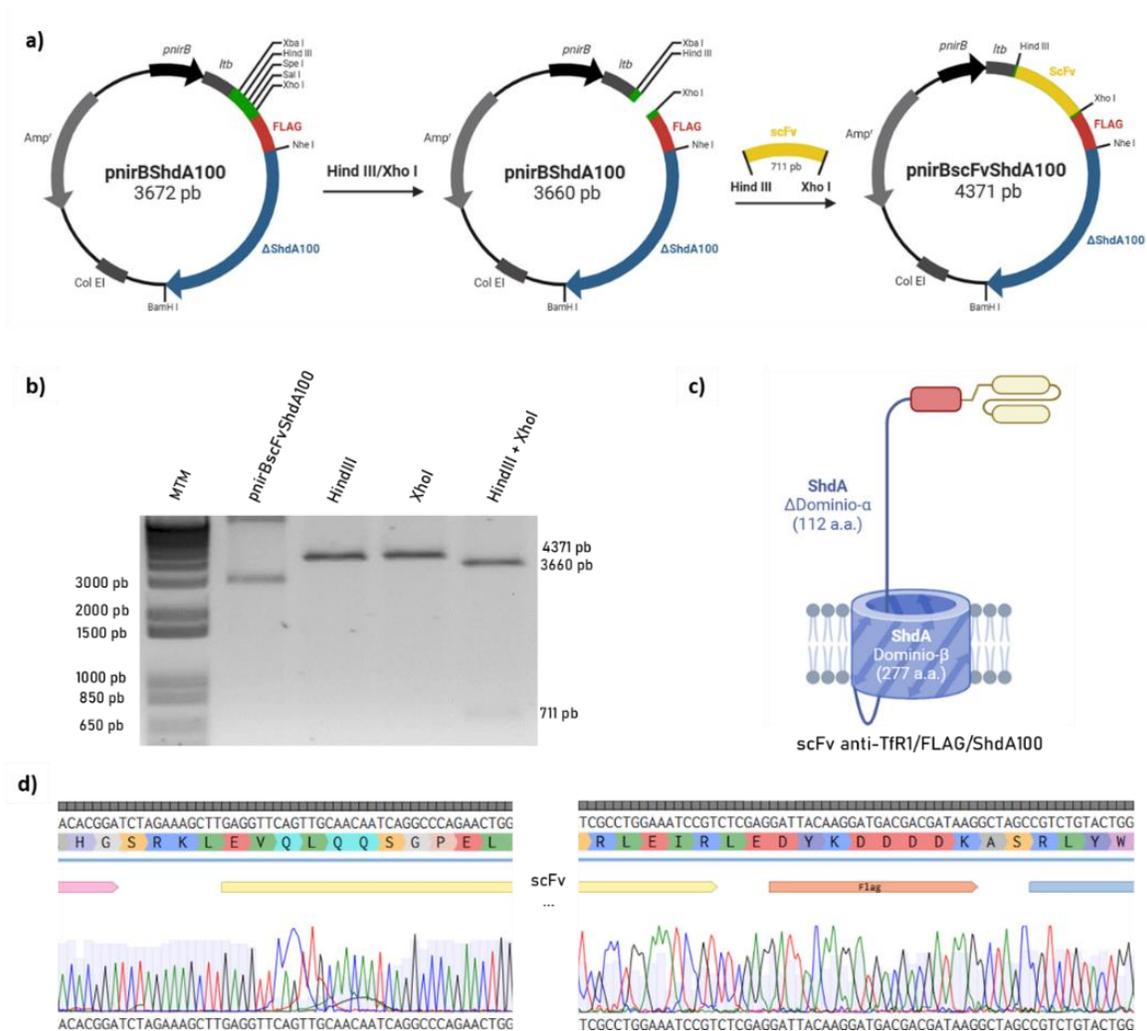


Figura 27. Construcción y caracterización del plásmido *pnirBscFvShdA100*. a) Estrategia de construcción del plásmido *pnirBscFvShdA100*. b) Análisis de restricción en un gel de agarosa al 1%, marcador de tamaño molecular (carril 1, 1 kb Invitrogen), control sin digerir (carril 2) y digestiones del plásmido con las enzimas *Hind*III, *Xho*I y *Hind*III/*Xho*I (carriles 3, 4 y 5). c) Representación de la proteína *scFv*/FLAG/*ShdA100* que transloca el *scFv* anti-TfR1 y la bandera molecular FLAG a la superficie bacteriana por medio del autotransportador *ShdA100*, codificada por el plásmido *pnirBscFvShdA100*. d) Secuencia de las principales regiones del plásmido *pnirBscFvShdA100*. MTM: marcador de tamaño molecular, pb: pares de bases. Imagen realizada en BioRender.

6.7. Los plásmidos empleados no afectan el crecimiento de *E. coli* BL21-DE3

Una vez construidos los plásmidos de interés, fueron purificados con el kit de Midiprep (QIAGEN), y las bacterias *E. coli* BL21-DE3 (Invitrogen) competentes fueron transformadas para realizar la evaluación de la expresión y translocación de las proteínas recombinantes a la superficie bacteriana a través del autotransportador ShdA. En primer lugar, se evaluó si alguno de los plásmidos construidos afecta la viabilidad o el crecimiento de *E. coli* BL21-DE3 en condiciones normales en caldo BHI o en condiciones de inducción microaerófilas (en caldo de tioglicolato). Se realizaron curvas de crecimiento de las bacterias transformadas con los plásmidos *pnirBscFv*, *pnirBShdA30*, *pnirBscFvShdA30*, *pnirBShdA100* y *pnirBscFvShdA100* hasta las 16 horas de incubación, tomando muestras cada 2 horas. Se observó que con respecto a la *E. coli* BL21-DE3, las bacterias transformadas no presentan un retraso en su crecimiento en caldo BHI (Figura 28a) ni en caldo de tioglicolato (Figura 28b), sugiriendo que la incorporación de los plásmidos a esta bacteria no afecta su crecimiento.

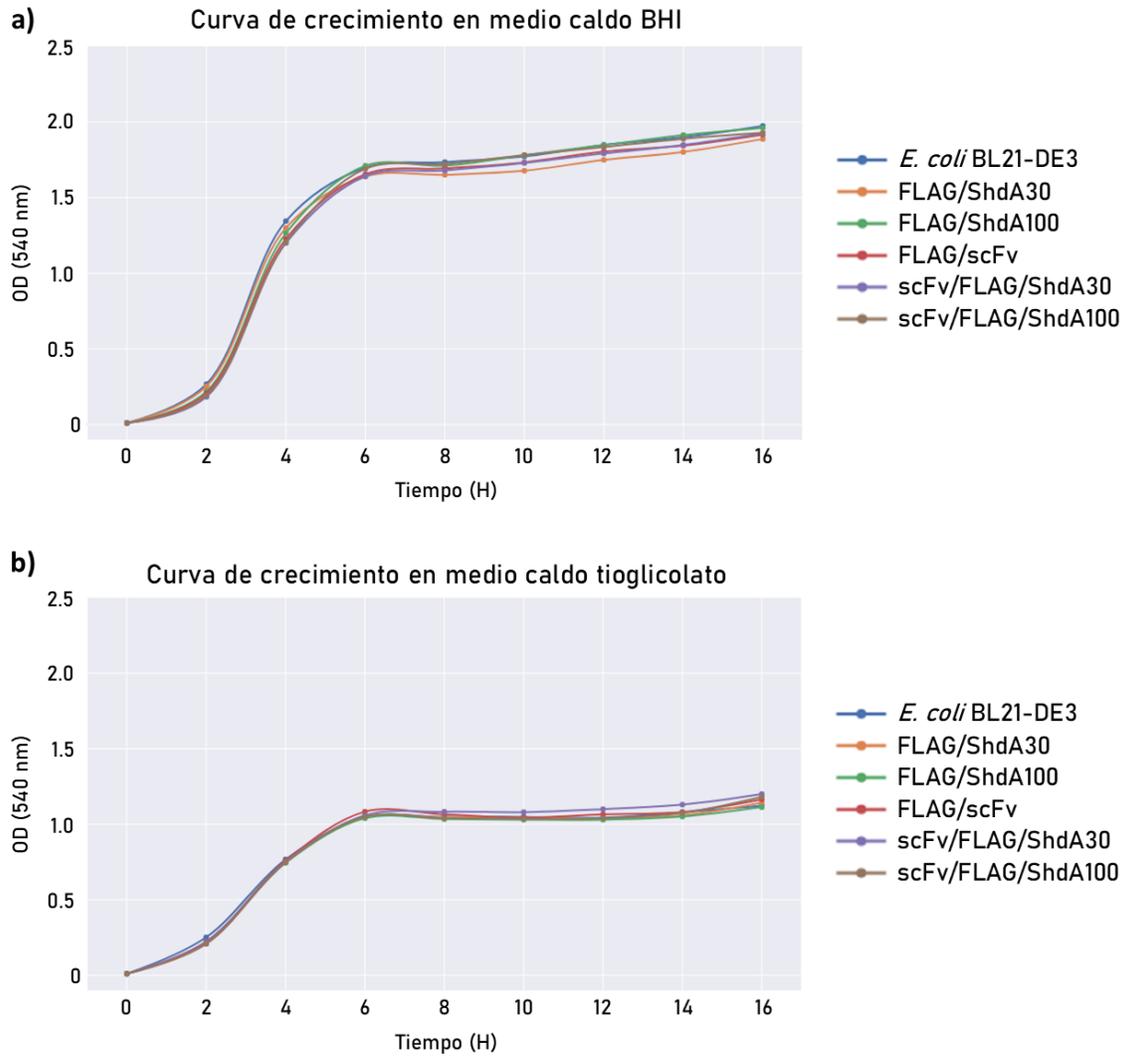


Figura 28. Cinética de crecimiento bacteriano en medio BHI y en medio de tioglicolato. a) Curva de crecimiento realizada en caldo BHI bajo condiciones normales de oxígeno durante 16 horas. b) Curva de crecimiento realizada en caldo de tioglicolato bajo condiciones reductoras de oxígeno durante 16 horas.

6.8. *E. coli* BL21-DE3 recombinante expresa y transloca el scFv-TfR1 en su superficie

Como primer abordaje de la evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes codificadas por los plásmidos descritos, se realizó un ensayo dot blot. Se utilizaron extractos de *E. coli* BL21-DE3 transformada con los plásmidos *pnirBscFv*, *pnirBShdA30*, *pnirBscFvShdA30*, *pnirBShdA100* y *pnirBscFvShdA100*, previamente inducida en condiciones microaerófilas, lisada por sonicación y resuspendida en urea al 8M. Brevemente, se depositaron 10 µL de los extractos de *E. coli* BL21-DE3 recombinante en una membrana de nitrocelulosa; luego de secar, se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS 1X y se lavó. La membrana se incubó con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-FLAG (1:1000) y con el anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-IgG de ratón HRP (1:1000). Después de los respectivos lavados, se reveló con luminol en el equipo ChemiDoc (Bio-Rad). El resultado de este ensayo muestra una adecuada traducción de las proteínas quiméricas FLAG/scFv, FLAG/ShdA30, scFv/FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100 y scFv/FLAG/ShdA100 en *E. coli* BL21-DE3 transformada (Figura 29).

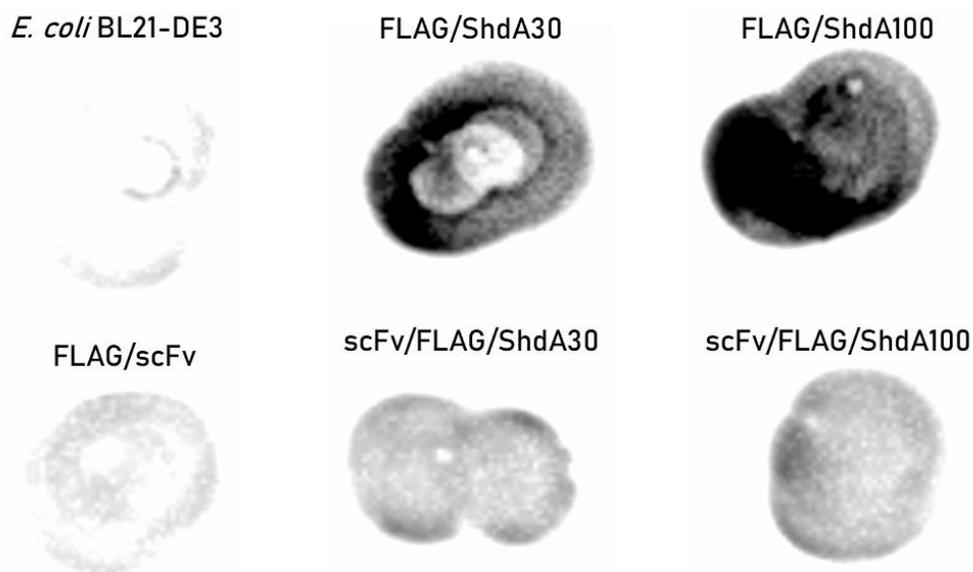


Figura 29. Evaluación de la expresión de las proteínas recombinantes FLAG/scFv, FLAG/ShdA30, scFv/FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100 y scFv/FLAG/ShdA100 por dot blot. Dot blot realizado con extractos de *E. coli* BL21-DE3 recombinantes. La inmunodetección se realizó empleando el anticuerpo anti-FLAG (1:1000) y el anticuerpo anti-IgG de ratón HRP (1:1000). Se reveló con luminol y se capturó la imagen en el equipo ChemiDoc (Bio-Rad). Se observa una adecuada expresión de las proteínas recombinantes FLAG/scFv, FLAG/ShdA30, scFv/FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100 y scFv/FLAG/ShdA100. Control negativo: *E. coli* BL21-DE3.

Posteriormente, se evaluó si las proteínas recombinantes FLAG/ShdA30, scFv/FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100 y scFv/FLAG/ShdA100 se translocan a la superficie bacteriana a través del autotransportador ShdA30 o ShdA100. Para ello, se realizó una tinción superficial de las bacterias recombinantes previamente inducidas durante 10 horas, y se analizó por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Brevemente, se centrifugaron 2×10^8 bacterias recombinantes previamente inducidas a 13,500 rpm y 4°C, se lavaron con PBS 1X, y se incubaron con anticuerpo anti-FLAG FITC (1:100) durante 3 horas a 4°C. Después de lavar y centrifugar nuevamente, se resuspendieron en Sheath Fluid (Beckman Coulter) y FixFACS para su análisis por citometría de flujo, o en PBS 1X para su observación por microscopía de fluorescencia. Se observó que las *E. coli* BL21-DE3 recombinantes que expresan las proteínas FLAG/ShdA30, scFv/FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100 y scFv/FLAG/ShdA100 son positivas a las tinciones, lo que indica que se está permitiendo la translocación de FLAG y del scFv anti-TfR1 a la superficie de la bacteria. No obstante, la expresión de las proteínas scFv/FLAG/ShdA30 y scFv/FLAG/Shd100 muestran una disminución de la fluorescencia con respecto a las proteínas FLAG/ShdA30 y FLAG/ShdA100, que solo expresan FLAG en la superficie. Esto podría deberse a que el scFv podría estar obstaculizando la detección de FLAG en la tinción por un impedimento estérico (Figura 30).

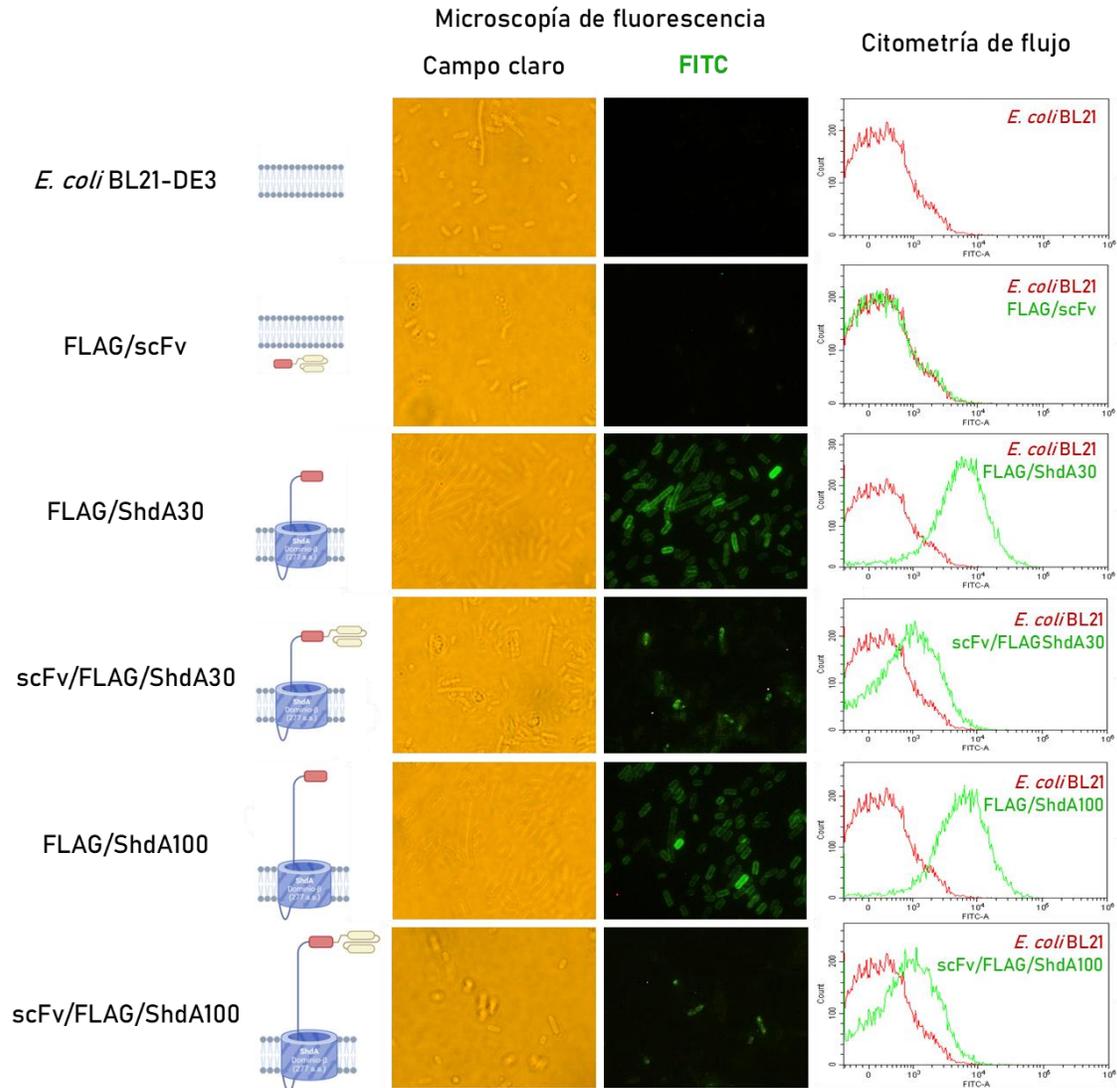


Figura 30. Evaluación de la expresión y translocación a la superficie bacteriana de las proteínas recombinantes FLAG/scFv, FLAG/ShdA30, scFv/FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100 y scFv/FLAG/ShdA100 por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Se emplearon 2×10^8 *E. coli* BL21-DE3 recombinantes previamente inducidas por 10 horas. La inmunodetección se realizó mediante una tinción superficial con el anticuerpo anti-FLAG FITC (1:100). Las suspensiones de bacterias teñidas se analizaron por citometría de flujo y por microscopía de fluorescencia. Se observa la expresión en la superficie bacteriana de las proteínas FLAG/ShdA30, scFv/FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100 y scFv/FLAG/ShdA100, lo que confirma la translocación de FLAG y el scFv anti-TfR1 a la superficie bacteriana, con respecto a los controles *E. coli* BL21-DE3 y FLAG/scFv (periplasma). Resultado representativo de 3 réplicas. Imagen realizada en BioRender.

Para determinar si el nivel de expresión de las proteínas recombinantes varía según el tiempo de inducción en caldo de tioglicolato, se realizó una curva de inducción a 6, 8, 10 y 12 horas, y se evaluó mediante una tinción superficial por citometría de flujo, siguiendo la metodología descrita previamente. El resultado muestra que no hay un cambio sustancial en el nivel de expresión de las proteínas recombinantes,

a excepción de las 12 horas, en donde se observa una reducción. Por lo tanto, para los ensayos de funcionalidad de scFv anti-TfR1, se pueden emplear tiempos de inducción de 6 a 10 horas sin cambios significativos en el nivel de expresión de las proteínas recombinantes (Figura 31).

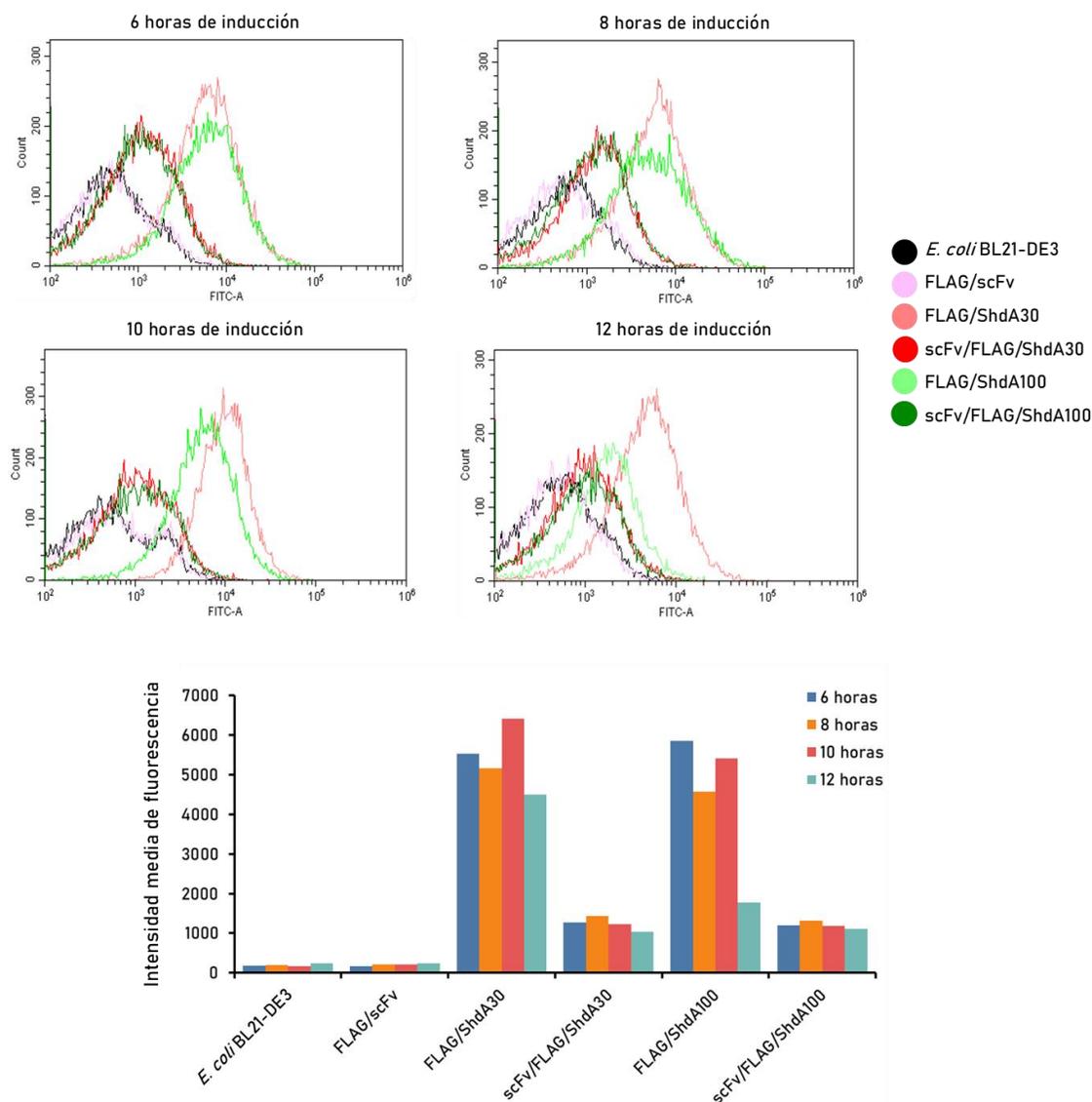


Figura 31. Cinética de expresión y translocación de las proteínas recombinantes FLAG/scFv, FLAG/ShdA30, scFv/FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100 y scFv/FLAG/ShdA100 a 6, 8, 10 y 12 horas, evaluada por citometría de flujo. Se emplearon 2×10^8 *E. coli* BL21-DE3 recombinantes previamente inducidas por 6, 8, 10 y 12 horas. La inmunodetección se realizó mediante una tinción superficial con el anticuerpo anti-FLAG FITC (1:100). Las suspensiones de bacterias teñidas se analizaron por citometría de flujo y por microscopía de fluorescencia. El nivel de expresión y translocación de las proteínas recombinantes FLAG/scFv, FLAG/ShdA30, scFv/FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100 y scFv/FLAG/ShdA100 no varía desde las 6 hasta las 10 horas de inducción. Resultado representativo de 3 réplicas.

6.9. El scFv anti-TfR1 reconoce a la proteína TfR1 en la línea celular de LNH humano Ramos

La evaluación del reconocimiento y unión del scFv anti-TfR1 a la línea celular Ramos (LNH humano) se realizó por citometría de flujo. El tratamiento de células Ramos con el anticuerpo monoclonal OKT9 dirigido a TfR1 muestra que esta línea celular presenta una alta expresión de TfR1 en su superficie (Figura 32). Asimismo, el tratamiento de células Ramos con extracto bacteriano proveniente de *E. coli* BL21-DE3 recombinante que expresa el scFv anti-TfR1 mostró una alta afinidad, comparable a la del anticuerpo OKT9. Estos resultados nos indican que el scFv anti-TfR1 está reconociendo al TfR1 sobreexpresado en la superficie de la línea celular Ramos (Figura 32).

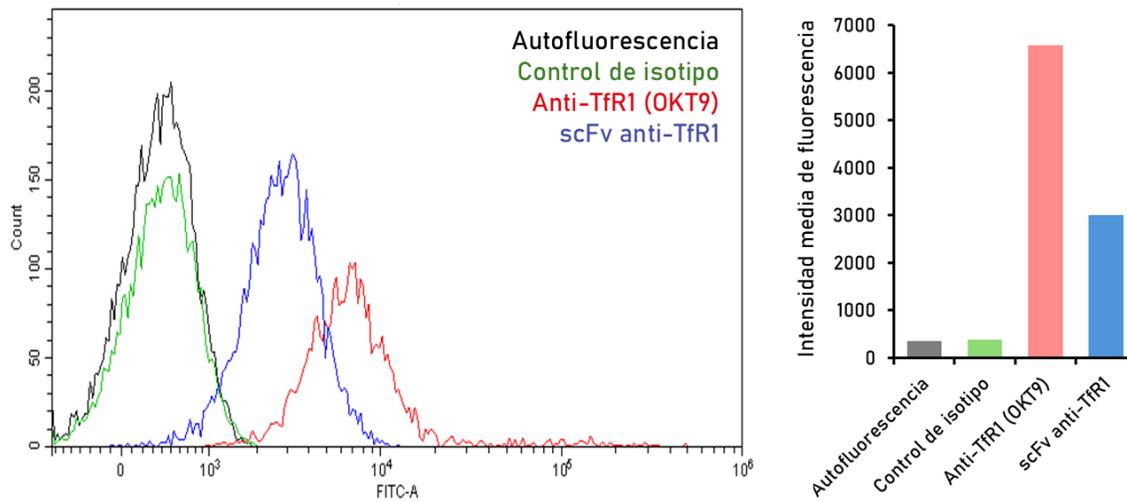


Figura 32. Evaluación del reconocimiento del TfR1 en células Ramos por el scFv anti-TfR1 empleando citometría de flujo. Se trataron 300,000 células Ramos con anticuerpo monoclonal anti-TfR1 (OKT9) (1:200) o con extracto de *E. coli* BL21-DE3 que expresa el scFv anti-TfR1 fusionada a MBP, y luego se empleó anticuerpo anti-IgG de ratón FITC (1:200) o anticuerpo anti-MBP FITC (1:200), respectivamente. La evaluación por citometría de flujo muestra una elevada expresión del TfR1 en la línea celular Ramos y su reconocimiento específico por el scFv anti-TfR1, con respecto al control de isotipo. Resultado representativo de 3 réplicas.

6.10. *E. coli* BL21-DE3 que expresa y transloca un scFv anti-TfR1 en su superficie presenta una mayor adhesión a proteínas inmovilizadas de LNH humano (Ramos)

Finalmente, se realizó un ensayo de adhesión bacteriana a proteínas inmovilizadas provenientes de células Ramos (LNH humano). Brevemente, se lisaron células Ramos por sonicación en PBS 1X, se cuantificó la concentración de proteínas en el extracto y se inmovilizaron en una placa de 96 pozos a una concentración de 5 µg/mL. Posteriormente, se bloqueó con leche descremada al 3%, se lavó con PBS 1X, y se agregaron las bacterias recombinantes previamente inducidas por 10 horas en condiciones microaerofílicas. Finalmente, se lavaron los pozos con PBS 1X para retirar el exceso de bacteria no adherida y se observó bajo el microscopio óptico en campo claro (100X) (Figura 33a).

El análisis del número de bacterias en los campos observados se realizó empleando el programa ImageJ. Los resultados muestran que *E. coli* BL21-DE3 recombinante que translocan el scFv anti-TfR1 a su superficie (scFv/FLAG/ShdA30 y scFv/FLAG/ShdA100) presentan una mayor adhesión a las proteínas inmovilizadas de células Ramos, evidenciada en un mayor número de bacterias observadas por campo con respecto a los controles (*E. coli* BL21-DE3, FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100 y FLAG/scFv). Además, se observa que los controles presentan cierta capacidad de adhesión, lo que representaría la capacidad natural que tienen las bacterias para unirse a células tumorales. Finalmente, se observó un número significativamente mayor de bacterias adheridas que expresan la proteína recombinante scFv/FLAG/ShdA100 con respecto a las que expresan scFv/FLAG/ShdA30. Esto podría deberse a que un dominio pasajero más largo permite que el scFv se encuentre más expuesto en la superficie de la membrana, mejorando el reconocimiento de su ligando (Figura 33b).

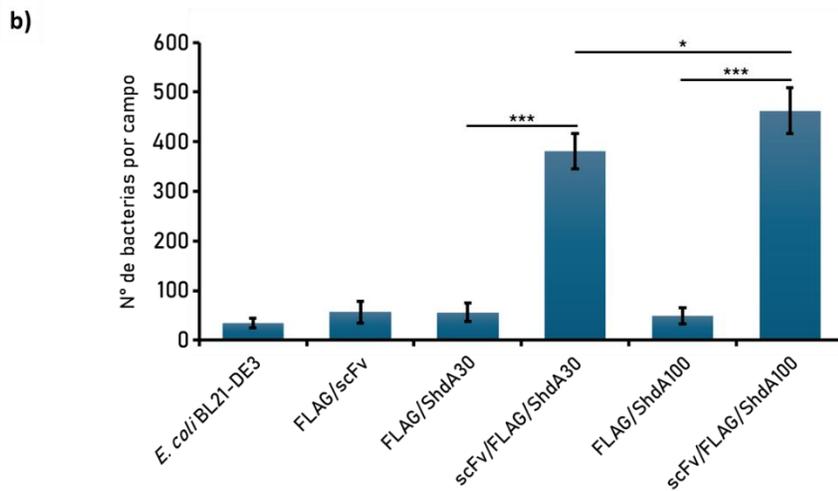
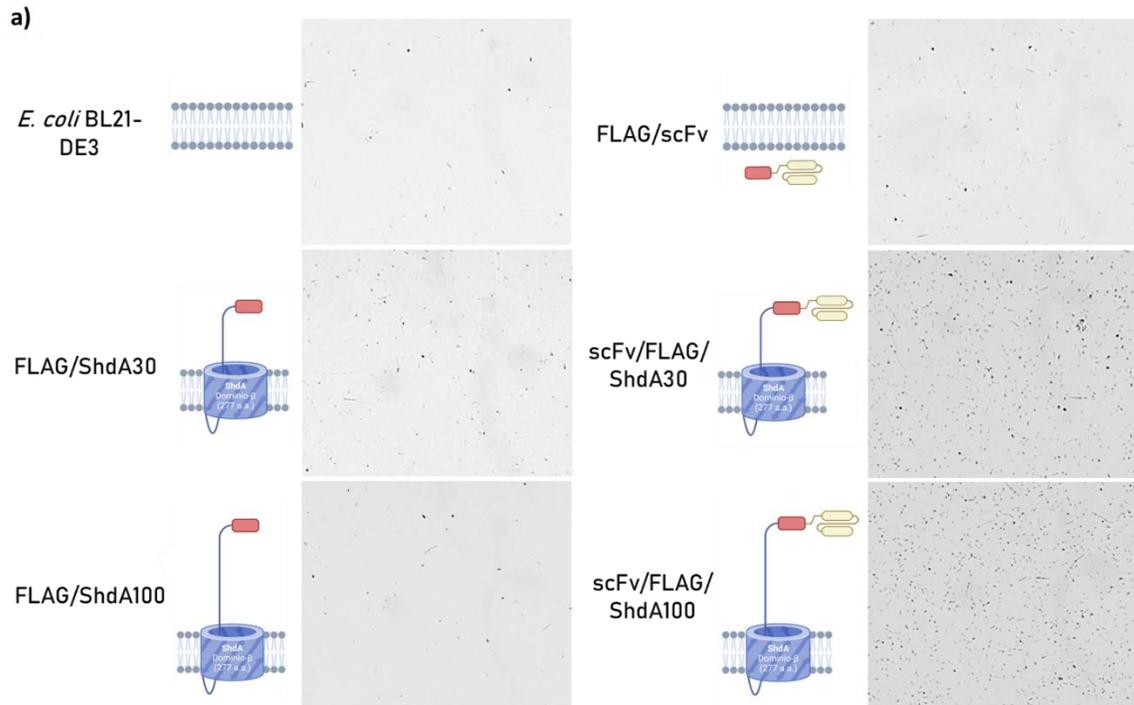


Figura 33. Evaluación de la adhesión de *E. coli* BL21-DE3 recombinante que expresa las proteínas recombinantes FLAG/scFv, FLAG/ShdA30, scFv/FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100 y scFv/FLAG/ShdA100 a proteínas inmovilizadas de células Ramos. Se inmovilizaron proteínas provenientes de células Ramos en placas de 96 pozos y, posteriormente, se incubaron con *E. coli* BL21-DE3 recombinante que expresa las proteínas recombinantes FLAG/scFv, FLAG/ShdA30, scFv/FLAG/ShdA30, FLAG/ShdA100 y scFv/FLAG/ShdA100, previamente inducida ($OD_{540} = 3$). a) Adhesión bacteriana a una superficie plástica recubierta con proteínas de células Ramos observada bajo el microscopio óptico. b) Cuantificación y análisis estadístico del número de bacterias adheridas por campo empleando ImageJ y RStudio (ANOVA con Tukey post hoc, $*p < 0.05$, $*p < 0.0005$).**

7. DISCUSIÓN

En la actualidad, los linfomas se encuentran entre los tipos de cáncer más frecuentes, particularmente, los LNH representan aproximadamente el 90% de los linfomas diagnosticados y son una de las principales causas de muerte en niños (Escamilla-Santiago et al., 2012). En las últimas décadas, se ha reportado un aumento en la frecuencia de diagnóstico de LNH pediátricos en México; no obstante, se desconoce la causa de esto. Si bien el tratamiento estándar presenta una tasa de respuesta de hasta el 80% de los pacientes, aproximadamente el 30% no responde adecuadamente o desarrolla resistencia. En estos casos las opciones terapéuticas son bastante limitadas y la supervivencia después de dos años es de aproximadamente el 20% (Batgi et al., 2020; Klener & Klanova, 2020).

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar e implementar nuevos tratamientos que permitan una mejor eficiencia en la eliminación del tumor. En este contexto, la terapia bacteriana contra el cáncer es una alternativa que permite tratar al cáncer de una forma novedosa. No obstante, las limitaciones que presenta han obstaculizado su traslado a la clínica. Una de las principales limitaciones es la colonización tumoral inconsistente observada en ensayos clínicos (Toso et al., 2002; Nemunaitis et al., 2003). Como se ha mencionado anteriormente, se presume que esto se debe a la pobre capacidad natural que presentan las bacterias para adherirse a las células tumorales, así como a las extensas barreras físicas de los tumores humanos que obstaculizan el establecimiento bacteriano (Beyer et al., 2013). Para compensar esta limitación, en el presente trabajo se diseñó, construyó y evaluó un sistema de proteínas quiméricas que favorece la adhesión bacteriana a células tumorales de LNH humano. Este sistema representará un avance significativo en la terapia bacteriana contra el cáncer, permitiendo una mayor precisión en la localización de las bacterias modificadas en el tejido tumoral. El sistema propuesto se basa en la expresión y translocación de un scFv anti-TfR1 a la superficie bacteriana por medio del autotransportador ShdA (Figura 34).

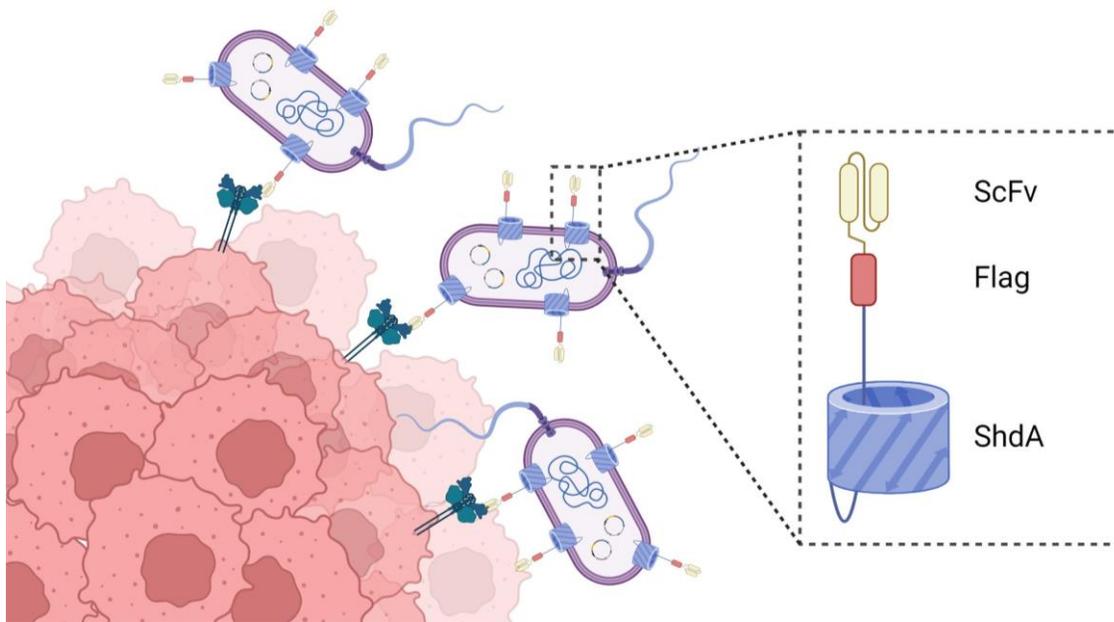


Figura 34. La expresión y translocación de un scFv anti-TfR1 en la superficie bacteriana mejora la adhesión de *Escherichia coli* a células de LNH humano (Ramos). En el presente trabajo se reporta la construcción y evaluación de un sistema basado en la expresión y translocación de un scFv anti-TfR1 en la superficie bacteriana. Este sistema tiene como finalidad mejorar la adhesión bacteriana a células tumorales que sobreexpresan al TfR1 en su superficie, como la línea celular Ramos de LNH humano. Imagen realizada en BioRender.

La expresión de este sistema en *E. coli* BL21-DE3 no ha implicado consecuencias en la carga metabólica de la bacteria, permitiendo un adecuado crecimiento tanto en condiciones normales de oxígeno (caldo BHI) como en condiciones reductoras de oxígeno (caldo tioglicolato), en comparación con *E. coli* BL21-DE3 no recombinante. Por lo tanto, ni la presencia de los plásmidos ni la producción del scFv anti-TfR1 impactan negativamente a las bacterias recombinantes.

Los plásmidos propuestos en el presente trabajo están bajo el promotor nirB, el cual se clasifica como un promotor sensible al microambiente tumoral debido a que promueve la expresión de las proteínas recombinantes en un ambiente hipóxico, que es favorecido en tumores sólidos (Nguyen et al., 2023). Los promotores sensibles al microambiente se activan en respuesta a características únicas del MAT, como la hipoxia y la acidosis. Estos han sido empleados en la terapia bacteriana contra el cáncer para dirigir la expresión de moléculas heterólogas predominantemente en el MAT, minimizando el daño a tejido sano y mejorando la eficacia del tratamiento al concentrar la acción del agente antitumoral (Zhou et al.,

2018). En este contexto, se hipotetiza que el promotor *nirB* promoverá la expresión de las proteínas scFv/FLAG/ShdA30 y scFv/FLAG/ShdA100 preferentemente en el MAT, lo que reduciría la probabilidad de que las bacterias recombinantes se adhieran a células sanas que expresan el TfR1.

Los autotransportadores brindan una plataforma versátil para la expresión de proteínas heterólogas en la superficie bacteriana. Al estar conformados por una sola proteína, los autotransportadores son relativamente sencillos de manipular por ingeniería genética. Estas proteínas se insertan en la membrana externa bacteriana gracias a su dominio β -barril y translocan su dominio pasajero al exterior, exponiéndolo en la superficie de la bacteria (Leo et al., 2012; Van Ulsen et al., 2018). En particular, el autotransportador ShdA ha sido empleado para exportar péptidos y proteínas heterólogas fusionadas a su dominio pasajero a la superficie bacteriana, principalmente con fines vacunales (Pompa-Mera et al., 2011; Solís-Andrade, 2012). Los ensayos de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia muestran que el autotransportador ShdA permite la translocación del scFv anti-TfR1 a la superficie bacteriana, confirmando lo reportado anteriormente sobre la utilización de ShdA para expresar péptidos y proteínas en la superficie bacteriana (Pompa-Mera et al., 2011).

Asimismo, se ha descrito que un dominio pasajero de mayor longitud permite una translocación más eficiente de proteínas heterólogas (Muñoz-López, 2018). Por esta razón, se optó por construir dos plásmidos que permiten la translocación del scFv anti-TfR1 a la superficie bacteriana (*pnirBscFvShdA30* y *pnirBscFvShdA100*). Estos codifican dos versiones ShdA que se diferencian en la longitud de su dominio pasajero, de acuerdo a lo descrito anteriormente. Si bien no se observó diferencia a nivel de la cantidad de proteína translocada a la superficie bacteriana entre *pnirBscFvShdA30* y *pnirBscFvShdA100* en los ensayos de citometría de flujo y microscopía de fluorescencia, sí se observó una diferencia significativa en su capacidad para adherirse a proteínas inmovilizadas de células Ramos. Esto implica que una mayor longitud del dominio pasajero brinda mayor flexibilidad y libertad de movimiento al scFv anti-TfR1, lo que favorece su interacción con el ligando.

Por otro lado, los scFv consisten únicamente en las regiones variables (VH y VL) de un anticuerpo conectadas por un enlazador flexible, lo que permite la combinación única de alta especificidad, un tamaño reducido y la capacidad de expresarse en sistemas bacterianos (Monnier et al., 2013). En el tratamiento del cáncer, se han empleado scFv dirigidos contra moléculas sobreexpresadas en tejido tumoral con el fin de focalizar moléculas antitumorales y nanopartículas cargadas hacia las células tumorales, minimizando el daño a tejido sano (Muñoz-López et al., 2022).

En el presente estudio empleamos un scFv dirigido al TfR1, el cual es considerado un marcador universal del cáncer debido a su sobreexpresión en tejido tumoral y a su papel crucial en el desarrollo, progresión y supervivencia de las células tumorales (Guo et al., 2021). Asimismo, este receptor presenta una expresión limitada en la mayoría de los tejidos sanos, lo que brinda una ventaja terapéutica (Candelaria et al., 2021).

La simulación de acoplamiento molecular indica que el scFv anti-TfR1 reconoce el dominio apical de TfR1 humano, sin interferir con la unión de la holotransferrina, por lo que podría clasificarse como no neutralizante. Este dato corrobora lo reportado por Helguera et al. (2012), quienes demostraron experimentalmente que el anticuerpo anti-TfR1 ch128.1, del que se originó el scFv reportado en el presente estudio, se une a la región apical del TfR1, destacando que los residuos situados entre la Ser 324 y Ser 368 del TfR1 son esenciales para esta interacción (Helguera et al., 2012). Los anticuerpos y scFv dirigidos al TfR1 no neutralizantes empleados en la clínica han demostrado menor toxicidad en comparación con los neutralizantes, debido a que no obstaculizan en gran medida la captación de hierro en células sanas (Candelaria et al., 2021). Cabe resaltar que el sistema propuesto en el presente trabajo apunta a emplear al scFv anti-TfR1 para mejorar el establecimiento bacteriano en tejido tumoral y no para promover la muerte de las células tumorales por privación de hierro. No obstante, esto podría ocurrir, lo cual sería una ventaja adicional para el sistema propuesto.

El enfoque propuesto en este trabajo representa una alternativa innovadora frente a otras estrategias terapéuticas como la inmunoterapia con células CAR-T, la

terapia génica y las nanopartículas. A pesar de que la terapia con células CAR-T han demostrado eficacia en el tratamiento de linfomas, su aplicación está limitada por desafíos como la toxicidad asociada al síndrome de liberación de citocinas, la necesidad de una personalización extensiva y un costo demasiado elevado (Ramos et al., 2016). La terapia génica ofrece la posibilidad de corregir defectos genéticos o introducir genes terapéuticos directamente en las células tumorales, pero enfrenta obstáculos significativos en términos de eficiencia de entrega y riesgo de efectos no específicos (Amer, 2014). Por otro lado, las nanopartículas dirigidas permiten la liberación localizada de agentes terapéuticos, pero pueden verse afectadas por problemas de biodistribución y acumulación no específica en tejidos sanos (Nie, 2010). En contraste, el sistema propuesto en el presente estudio ofrece un enfoque único al aprovechar la capacidad natural de las bacterias oncolíticas para proliferar y establecerse en el MAT y la capacidad del scFv anti-TfR1 para dirigir la adhesión bacteriana a células tumorales; promoviendo, un mejor establecimiento bacteriano en el tejido tumoral y la reducción del daño a tejidos sanos.

Este sistema puede ser implementado para mejorar la focalización y acumulación de fármacos antitumorales sintetizados y liberados por bacterias oncolíticas en el MAT. Este enfoque permitiría minimizar la exposición de los tejidos sanos a los fármacos, reduciendo los efectos secundarios y mejorando la seguridad del tratamiento. Además, la capacidad de las bacterias oncolíticas para proliferar y sobrevivir preferentemente en tejido tumoral asegura una entrega sostenida y localizada de los agentes terapéuticos (Becerra-Báez et al., 2022).

La adaptabilidad y versatilidad del sistema propuesto permite la modificación o reemplazo del scFv, expresado en la superficie bacteriana, con la finalidad de dirigir la adhesión bacteriana a diversos objetivos, facilitando su uso en diferentes tipos de tumores. No obstante, la eficacia del sistema en distintos contextos tumorales puede depender de la densidad y distribución de la molécula blanco en el MAT específico.

Se considera la futura implementación del sistema propuesto en la cepa atenuada SL3261 de *Salmonella enterica* Typhimurium debido a las características oncolíticas intrínsecas que presenta esta especie. Esta implementación permitiría una acción

sinérgica entre la afinidad del scFv anti-TfR1 por el TfR1 sobreexpresado en las células tumorales con la capacidad oncolítica de *Salmonella*, mejorando su infiltración, establecimiento y persistencia en tejido tumoral. Asimismo, se propone evaluar este sistema en un modelo *in vivo* de LNH en ratones que abarque el uso de líneas celulares y cultivos primarios de pacientes; esto permitirá determinar la capacidad del sistema para mejorar el establecimiento, focalización y acumulación bacteriana en el MAT. Además, también se tiene como perspectiva emplear este sistema para mejorar la entrega y liberación controlada de fármacos antitumorales.

El desarrollo de este sistema en *E. coli* es una “prueba de principio” y representa un paso inicial con resultados prometedores, siendo un avance importante en la terapia bacteriana contra el cáncer al abordar una de las principales limitaciones que ha dificultado su implementación en la clínica.

8. CONCLUSIÓN

La expresión y translocación de un scFv anti-TfR1 en la superficie de *Escherichia coli* por medio del autotransportador ShdA mejora su adhesión a células tumorales humanas de linfoma no Hodgkin (Ramos).

9. PERSPECTIVAS

- Trasladar este sistema a la bacteria atenuada *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cepa SL3261 y evaluar la expresión y translocación del scFv anti-TfR1 en su superficie.
- Evaluar *in vitro* la capacidad de adhesión a células de LNH humanas de la *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cepa SL3261 recombinante que expresará y translocará el scFv anti-TfR1 en su superficie a través del autotransportador ShdA
- Evaluar *in vivo* la focalización y establecimiento en tejido tumoral de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium cepa SL3261 recombinante que expresa y transloca un scFv anti-TfR1 en su superficie a través del autotransportador ShdA en un modelo de xenotrasplante murino de LNH humano inoculada por vía intravenosa e intratumoral.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-González, C. (2018). Desarrollo y caracterización de un minianticuerpo (scFv) que reconoce al Receptor de Transferrina 1 (TfR1) en células de linfoma. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Amer, M. H. (2014). Gene therapy for cancer: present status and future perspective. *Molecular and cellular therapies*, 2, 1-19.
- Anderson, J. R., Jenkin, R. D., Wilson, J. F., Kjeldsberg, C. R., Sposto, R., Chilcote, R. R., ... & Meadows, A. T. (1993). Long-term follow-up of patients treated with COMP or LSA2L2 therapy for childhood non-Hodgkin's lymphoma: a report of CCG-551 from the Childrens Cancer Group. *Journal of Clinical Oncology*, 11(6), 1024-1032.
- Armitage, J. O., Gascoyne, R. D., Lunning, M. A., & Cavalli, F. (2017). Non-hodgkin lymphoma. *The lancet*, 390(10091), 298-310.
- Avogadri, F., Mittal, D., Saccheri, F., Sarrafiore, M., Ciocca, M., Larghi, P., ... & Rescigno, M. (2008). Intra-tumoral *Salmonella typhimurium* induces a systemic anti-tumor immune response that is directed by low-dose radiation to treat distal disease. *European journal of immunology*, 38(7), 1937-1947.
- Basuli, D., Tesfay, L., Deng, Z., Paul, B., Yamamoto, Y., Ning, G., ... & Torti, S. V. (2017). Iron addiction: a novel therapeutic target in ovarian cancer. *Oncogene*, 36(29), 4089-4099.
- Batgi, H., Merdin, A., Dal, M. S., Kızıl Çakar, M., Yıldız, J., Başçı, S., ... & Altuntaş, F. (2020). The effect of gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin chemotherapy in relapsed/refractory NHL and HL patients: A single center experience. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 26(8), 1857-1863.
- Becerra-Báez, E. I., Meza-Toledo, S. E., Muñoz-López, P., Flores-Martínez, L. F., Fraga-Pérez, K., Magaña-Bocanegra, K. J., ... & Luria-Pérez, R. (2022). Recombinant Attenuated *Salmonella enterica* as a Delivery System of Heterologous Molecules in Cancer Therapy. *Cancers*, 14(17), 4224.

- Beyer, I., van Rensburg, R., & Lieber, A. (2013). Overcoming physical barriers in cancer therapy. *Tissue Barriers*, 1(1), 3340-51.
- Bluhm, E. C., Ronckers, C., Hayashi, R. J., Neglia, J. P., Mertens, A. C., Stovall, M., ... & Inskip, P. D. (2008). Cause-specific mortality and second cancer incidence after non-Hodgkin lymphoma: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 111(8), 4014-4021.
- Cai, Z., Sanchez, A., Shi, Z., Zhang, T., Liu, M., & Zhang, D. (2011). Activation of Toll-like receptor 5 on breast cancer cells by flagellin suppresses cell proliferation and tumor growth. *Cancer research*, 71(7), 2466-2475.
- Campisi, A., Bonfanti, R., Raciti, G., Bonaventura, G., Legnani, L., Magro, G., ... & Parenti, R. (2020). Gene silencing of transferrin-1 receptor as a potential therapeutic target for human follicular and anaplastic thyroid cancer. *Molecular Therapy-Oncolytics*, 16, 197-206.
- Candelaria, P. V., Leoh, L. S., Penichet, M. L., & Daniels-Wells, T. R. (2021). Antibodies targeting the transferrin receptor 1 (TfR1) as direct anti-cancer agents. *Frontiers in immunology*, 12, 607692.
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., & Baty, D. (2009). Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British journal of pharmacology*, 157(2), 220-233.
- Chang, W. W., Lai, C. H., Chen, M. C., Liu, C. F., Kuan, Y. D., Lin, S. T., & Lee, C. H. (2013). Salmonella enhance chemosensitivity in tumor through connexin 43 upregulation. *International journal of cancer*, 133(8), 1926-1935.
- Chen, Y., Du, M., Yu, J., Rao, L., Chen, X., & Chen, Z. (2020). Nanobiohybrids: a synergistic integration of bacteria and nanomaterials in cancer therapy. *BIO Integration*, 1(1), 25-36.
- Chirullo, B., Ammendola, S., Leonardi, L., Falcini, R., Petrucci, P., Pistoia, C., ... & Pasquali, P. (2015). Attenuated mutant strain of *Salmonella Typhimurium*

- lacking the ZnuABC transporter contrasts tumor growth promoting anti-cancer immune response. *Oncotarget*, 6(19), 17648.
- Coley, W. B. (1891). II. Contribution to the knowledge of sarcoma. *Annals of surgery*, 14(3), 199.
- Connors, J. M., Cozen, W., Steidl, C., Carbone, A., Hoppe, R. T., Flechtner, H. H., & Bartlett, N. L. (2020). Hodgkin lymphoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1), 61.
- Daniels-Wells, T. R., & Penichet, M. L. (2016). Transferrin receptor 1: a target for antibody-mediated cancer therapy. *Immunotherapy*, 8(9), 991-994.
- De Leval, L., & Jaffe, E. S. (2020). Lymphoma classification. *The Cancer Journal*, 26(3), 176-185.
- De Melo, F. M., Braga, C. J., Pereira, F. V., Maricato, J. T., Origassa, C. S., Souza, M. F., ... & Rodrigues, E. G. (2015). Anti-metastatic immunotherapy based on mucosal administration of flagellin and immunomodulatory P10. *Immunology and cell biology*, 93(1), 86-98.
- DeLano, W. L., & Bromberg, S. (2004). *PyMOL user's guide*. DeLano Scientific LLC, 629.
- Derebas, J., Panuciak, K., Margas, M., Zawitkowska, J., & Lejman, M. (2022). The new treatment methods for non-hodgkin lymphoma in pediatric patients. *Cancers*, 14(6), 1569.
- Dey, P. (2021). Classification of Lymphoma, Different Markers and Approach. In *Diagnostic Flow Cytometry in Cytology* (pp. 85-95). Singapore: Springer Singapore.
- Douglas, M. (2022). Richter Transformation: Clinical Manifestations, Evaluation, and Management. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*, 13(5), 525.

- Duong, M. T. Q., Qin, Y., You, S. H., & Min, J. J. (2019). Bacteria-cancer interactions: bacteria-based cancer therapy. *Experimental & molecular medicine*, 51(12), 1-15.
- Escamilla-Santiago, R. A., Narro-Robles, J., Fajardo-Gutiérrez, A., Rascón-Pacheco, R. A., & López-Cervantes, M. (2012). Trends of cancer mortality rates in children and adolescents by level of marginalization in Mexico (1990-2009). *Salud Pública de México*, 54(6), 587-594.
- Essaghir, A., & Demoulin, J. B. (2012). A minimal connected network of transcription factors regulated in human tumors and its application to the quest for universal cancer biomarkers. *PloS one*, 7(6), e39666.
- Fajardo-Gutiérrez, A., Mendoza-Sánchez, H., AGUILAR-MARTINEZ, M., FARFAN-CANTO, J. M., GONZALEZ-CHIRINOS, P., & VALDEZ-MARTINEZ, E. (1996). Frecuencia de neoplasias malignas en niños atendidos en hospitales del Distrito Federal. Estudio multicéntrico. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México (Ed. española)*, 53(2), 57-66.
- Fensterle, J., Bergmann, B., Yone, C. L. R. P., Hotz, C., Meyer, S. R., Spreng, S., ... & Gentschev, I. (2008). Cancer immunotherapy based on recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium aroA strains secreting prostate-specific antigen and cholera toxin subunit B. *Cancer gene therapy*, 15(2), 85-93.
- Forbes, N. S. (2010). Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 10(11), 785-794.
- Ganai, S., Arenas, R. B., & Forbes, N. S. (2009). Tumour-targeted delivery of TRAIL using *Salmonella typhimurium* enhances breast cancer survival in mice. *British journal of cancer*, 101(10), 1683-1691.
- Guo, Q., Li, L., Hou, S., Yuan, Z., Li, C., Zhang, W., ... & Li, X. (2021). The role of iron in cancer progression. *Frontiers in Oncology*, 11, 778492.

- Heimann, D. M., & Rosenberg, S. A. (2003). Continuous intravenous administration of live genetically modified salmonella typhimurium in patients with metastatic melanoma. *Journal of Immunotherapy*, 26(2), 179-180.
- Helguera, G., Jemielity, S., Abraham, J., Cordo, S. M., Martinez, M. G., Rodríguez, J. A., ... & Choe, H. (2012). An antibody recognizing the apical domain of human transferrin receptor 1 efficiently inhibits the entry of all new world hemorrhagic fever arenaviruses. *Journal of virology*, 86(7), 4024-4028.
- Hernández-Luna, M. A., & Luria-Pérez, R. (2018). Cancer immunotherapy: priming the host immune response with live attenuated *Salmonella enterica*. *Journal of Immunology Research*, 2018.
- Hernández-Luna, M. A., Muñoz-López, P., Aguilar-González, C. A., & Luria-Pérez, R. (2018). Infection by *Salmonella enterica* promotes or demotes tumor development. *Salmonella: A Re-Emerging Pathogen*, 55-71.
- Hiroshima, Y., Zhao, M., Zhang, Y., Maawy, A., Hassanein, M., Uehara, F., ... & Hoffman, R. M. (2013). Comparison of efficacy of *Salmonella typhimurium* A1-R and chemotherapy on stem-like and non-stem human pancreatic cancer cells. *Cell Cycle*, 12(17), 2774-2780.
- Huo, D., Jiang, X., & Hu, Y. (2020). Recent advances in nanostrategies capable of overcoming biological barriers for tumor management. *Advanced Materials*, 32(27), 1904337.
- Jaglowski, S. M., Linden, E., Termuhlen, A. M., & Flynn, J. M. (2009, October). Lymphoma in adolescents and young adults. In *Seminars in oncology* (Vol. 36, No. 5, pp. 381-418). WB Saunders.
- Jamil, A., & Mukkamalla, S. K. R. (2020). Lymphoma.
- Jeong, S. M., Lee, J., Finley, L. W. S., Schmidt, P. J., Fleming, M. D., & Haigis, M. C. (2015). SIRT3 regulates cellular iron metabolism and cancer growth by repressing iron regulatory protein 1. *Oncogene*, 34(16), 2115-2124.

- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Tunyasuvunakool, K., ... & Hassabis, D. (2020). AlphaFold 2. Fourteenth Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction; DeepMind: London, UK.
- Junco, B. R. V., León, N. G., Fernández, I. P., del Campo, L., Maraver, D. H., & Coya, J. (2011). Estadificación de los linfomas no hodgkinianos: estudio prospectivo de la tomografía por emisión de positrones/tomografía computarizada (PET/TC) frente a la PET ya la TC. *Medicina clínica*, 137(9), 383-389.
- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., & Alt, F. W. (2006). Mechanism and control of V (D) J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu. Rev. Immunol.*, 24, 541-570.
- Kasinskas, R. W., & Forbes, N. S. (2006). Salmonella typhimurium specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue in vitro. *Biotechnology and bioengineering*, 94(4), 710-721.
- Kasinskas, R. W., & Forbes, N. S. (2007). Salmonella typhimurium lacking ribose chemoreceptors localize in tumor quiescence and induce apoptosis. *Cancer research*, 67(7), 3201-3209.
- Klener, P., & Klanova, M. (2020). Drug resistance in non-Hodgkin lymphomas. *International journal of molecular sciences*, 21(6), 2081.
- Kupz, A., Curtiss III, R., Bedoui, S., & Strugnell, R. A. (2014). In vivo IFN- γ secretion by NK cells in response to Salmonella typhimurium requires NLRC4 inflammasomes. *PloS one*, 9(5), e97418.
- Laskowski, R. A., Jabłońska, J., Pravda, L., Vařeková, R. S., & Thornton, J. M. (2018). PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein science*, 27(1), 129-134.
- Lee, C. H., Lin, S. T., Liu, J. J., Chang, W. W., Hsieh, J. L., & Wang, W. K. (2014). Salmonella induce autophagy in melanoma by the downregulation of AKT/mTOR pathway. *Gene Therapy*, 21(3), 309-316.

- Lee, C. H., Wu, C. L., & Shiau, A. L. (2008). Toll-like receptor 4 mediates an antitumor host response induced by *Salmonella choleraesuis*. *Clinical Cancer Research*, 14(6), 1905-1912.
- Lenz, G., & Staudt, L. M. (2010). Aggressive lymphomas. *New England Journal of Medicine*, 362(15), 1417-1429.
- Leo, J. C., Grin, I., & Linke, D. (2012). Type V secretion: mechanism (s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1592), 1088-1101.
- Leung, C. P., Barve, M. A., Wu, M. S., Pirollo, K. F., Strauss, J. F., Liao, W. C., ... & Chang, E. H. (2021). A phase II trial combining tumor-targeting TP53 gene therapy with gemcitabine/nab-paclitaxel as a second-line treatment for metastatic pancreatic cancer.
- Leyton, D. L., Rossiter, A. E., & Henderson, I. R. (2012). From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 10(3), 213-225.
- Liang, K., Liu, Q., & Kong, Q. (2021). New technologies in developing recombinant-attenuated bacteria for cancer therapy. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(2), 513-530.
- Liang, K., Liu, Q., Li, P., Luo, H., Wang, H., & Kong, Q. (2019). Genetically engineered *Salmonella Typhimurium*: Recent advances in cancer therapy. *Cancer letters*, 448, 168-181.
- Lin, H. C., Yang, C. J., Kuan, Y. D., Wang, W. K., Chang, W. W., & Lee, C. H. (2017). The inhibition of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 by connexin 43. *International Journal of Medical Sciences*, 14(12), 1181.
- Liu, X., Jiang, S., Piao, L., & Yuan, F. (2016). Radiotherapy combined with an engineered *Salmonella typhimurium* inhibits tumor growth in a mouse model of colon cancer. *Experimental animals*, 65(4), 413-418.

- Luria-Pérez, R., Helguera, G., & Rodríguez, J. A. (2016). Antibody-mediated targeting of the transferrin receptor in cancer cells. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 73(6), 372-379.
- Ma, E. S. (2017). Recurrent cytogenetic abnormalities in Non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cytogenetics: Methods and Protocols*, 279-293.
- Matasar, M. J., & Zelenetz, A. D. (2008). Overview of lymphoma diagnosis and management. *Radiologic Clinics of North America*, 46(2), 175-198.
- Mateos-Chávez, A. A., Muñoz-López, P., Becerra-Báez, E. I., Flores-Martínez, L. F., Prada-Gracia, D., Moreno-Vargas, L. M., ... & Luria-Pérez, R. (2019). Live attenuated *Salmonella enterica* expressing and releasing cell-permeable Bax BH3 peptide through the MisL autotransporter system elicits antitumor activity in a murine Xenograft model of human B non-hodgkin's lymphoma. *Frontiers in immunology*, 10, 2562.
- McCarthy, E. F. (2006). The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *The Iowa orthopaedic journal*, 26, 154.
- McGuffin, L. J., Aldowsari, F. M., Alharbi, S. M., & Adiyaman, R. (2021). ModFOLD8: accurate global and local quality estimates for 3D protein models. *Nucleic acids research*, 49(W1), W425-W430.
- Mei, Y., Zhao, L., Liu, Y., Gong, H., Song, Y., Lei, L., ... & Liu, H. (2017). Combining DNA vaccine and AIDA-1 in attenuated salmonella activates tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses. *Cancer immunology research*, 5(6), 503-514.
- Meuskens, I., Saragliadis, A., Leo, J. C., & Linke, D. (2019). Type V secretion systems: an overview of passenger domain functions. *Frontiers in microbiology*, 10, 1163.
- Monnier, P. P., Vigouroux, R. J., & Tassew, N. G. (2013). In vivo applications of single chain Fv (variable domain)(scFv) fragments. *Antibodies*, 2(2), 193-208.

- Montemiglio, L. C., Testi, C., Ceci, P., Falvo, E., Pitea, M., Savino, C., ... & Vallone, B. (2019). Cryo-EM structure of the human ferritin–transferrin receptor 1 complex. *Nature communications*, 10(1), 1121.
- Mugnaini, E. N., & Ghosh, N. (2016). Lymphoma. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 43(4), 661-675.
- Muñoz-López, P. (2018). Desarrollo y caracterización de una *Salmonella enterica* que expresa el dominio III de la proteína E del virus Dengue 2 a través del auttransportador ShdA (Doctoral dissertation, Universidad Veracruzana. Instituto de Ciencias de la Salud. Región Xalapa).
- Muñoz-López, P., Ribas-Aparicio, R. M., Becerra-Báez, E. I., Fraga-Pérez, K., Flores-Martínez, L. F., Mateos-Chávez, A. A., & Luria-Pérez, R. (2022). Single-chain fragment variable: recent progress in cancer diagnosis and therapy. *Cancers*, 14(17), 4206.
- National Cancer Institute. (2016). Childhood non-Hodgkin lymphoma treatment (PDQ®)—health professional version.
- Nemunaitis, J., Cunningham, C., Senzer, N., Kuhn, J., Cramm, J., Litz, C., ... & Sz nol, M. (2003). Pilot trial of genetically modified, attenuated *Salmonella* expressing the *E. coli* cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. *Cancer gene therapy*, 10(10), 737-744.
- Nguyen, D. H., Chong, A., Hong, Y., & Min, J. J. (2023). Bioengineering of bacteria for cancer immunotherapy. *nature communications*, 14(1), 3553.
- Nie, S. (2010). Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. *Nanomedicine*, 5(4), 523-528.
- Park, S. H., Zheng, J. H., Nguyen, V. H., Jiang, S. N., Kim, D. Y., Szardenings, M., ... & Min, J. J. (2016). RGD peptide cell-surface display enhances the targeting and therapeutic efficacy of attenuated *Salmonella*-mediated cancer therapy. *Theranostics*, 6(10), 1672.

- Pawelek, J. M., Low, K. B., & Bermudes, D. (1997). Tumor-targeted Salmonella as a novel anticancer vector. *Cancer research*, 57(20), 4537-4544.
- Piñero-Lambea, C., Bodelón, G., Fernández-Periáñez, R., Cuesta, A. M., Álvarez-Vallina, L., & Fernández, L. A. (2015). Programming controlled adhesion of *E. coli* to target surfaces, cells, and tumors with synthetic adhesins. *ACS synthetic biology*, 4(4), 463-473.
- Pirollo, K. F., Nemunaitis, J., Leung, P. K., Nunan, R., Adams, J., & Chang, E. H. (2016). Safety and efficacy in advanced solid tumors of a targeted nanocomplex carrying the p53 gene used in combination with docetaxel: a phase 1b study. *Molecular Therapy*, 24(9), 1697-1706.
- Pompa-Mera, E. N., Yopez-Mulia, L., Ocana-Mondragon, A., Garcia-Zepeda, E. A., Ortega-Pierres, G., & Gonzalez-Bonilla, C. R. (2011). *Trichinella spiralis*: intranasal immunization with attenuated *Salmonella enterica* carrying a gp43 antigen-derived 30mer epitope elicits protection in BALB/c mice. *Experimental parasitology*, 129(4), 393-401.
- Rabet, S., & Raabe, G. (2022). Comparison of the GAFF, OPLSAA and CHARMM27 force field for the reproduction of the thermodynamics properties of furfural, 2-methylfuran, 2, 5-dimethylfuran and 5-hydroxymethylfurfural. *Fluid Phase Equilibria*, 554, 113331.
- Ramos, C. A., Heslop, H. E., & Brenner, M. K. (2016). CAR-T cell therapy for lymphoma. *Annual review of medicine*, 67(1), 165-183.
- Reiter, A. (2007). Diagnosis and treatment of childhood non-Hodgkin lymphoma. *ASH Education Program Book*, 2007(1), 285-296.
- Saccheri, F., Pozzi, C., Avogadri, F., Barozzi, S., Faretta, M., Fusi, P., & Rescigno, M. (2010). Bacteria-induced gap junctions in tumors favor antigen cross-presentation and antitumor immunity. *Science translational medicine*, 2(44), 44ra57-44ra57.

- Sandlund, J. T., & Martin, M. G. (2016). Non-Hodgkin lymphoma across the pediatric and adolescent and young adult age spectrum. *Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book*, 2016(1), 589-597.
- Sandlund, J. T., Downing, J. R., & Crist, W. M. (1996). Non-Hodgkin's lymphoma in childhood. *New England Journal of Medicine*, 334(19), 1238-1248.
- Schmitz-Winnenthal, F. H., Hohmann, N., Schmidt, T., Podola, L., Friedrich, T., Lubenau, H., ... & Beckhove, P. (2018). A phase 1 trial extension to assess immunologic efficacy and safety of prime-boost vaccination with VXM01, an oral T cell vaccine against VEGFR2, in patients with advanced pancreatic cancer. *Oncoimmunology*, 7(4), e1303584.
- Sedighi, M., Zahedi Bialvaei, A., Hamblin, M. R., Ohadi, E., Asadi, A., Halajzadeh, M., ... & Kouhsari, E. (2019). Therapeutic bacteria to combat cancer; current advances, challenges, and opportunities. *Cancer medicine*, 8(6), 3167-3181.
- Shankland, K. R., Armitage, J. O., & Hancock, B. W. (2012). Non-hodgkin lymphoma. *The Lancet*, 380(9844), 848-857.
- Silva-Valenzuela, C. A., Desai, P. T., Molina-Quiroz, R. C., Pezoa, D., Zhang, Y., Porwollik, S., ... & McClelland, M. (2016). Solid tumors provide niche-specific conditions that lead to preferential growth of *Salmonella*. *Oncotarget*, 7(23), 35169.
- Solís-Andrade, K. I. (2012). Expresión de interferón gamma humano y la proteína verde fluorescente en *E. coli* usando el sistema de autotransporte ShdA (Master's thesis).
- Spector, M. P., Garcia del Portillo, F., Bearson, S. M., Mahmud, A., Magut, M., Finlay, B. B., ... & Pallen, M. J. (1999). The *rpoS*-dependent starvation-stress response locus *stiA* encodes a nitrate reductase (*narZYWV*) required for carbon-starvation-inducible thermotolerance and acid tolerance in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology*, 145(11), 3035-3045.

- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R., ... & Jaffe, E. S. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 127(20), 2375-2390.
- Testi, C., Boffi, A., & Montemiglio, L. C. (2019). Structural analysis of the transferrin receptor multifaceted ligand (s) interface. *Biophysical Chemistry*, 254, 106242.
- Thandra, K. C., Barsouk, A., Saginala, K., Padala, S. A., Barsouk, A., & Rawla, P. (2021). Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Medical Sciences*, 9(1), 5.
- Toso, J. F., Gill, V. J., Hwu, P., Marincola, F. M., Restifo, N. P., Schwartzentruber, D. J., ... & Rosenberg, S. A. (2002). Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology*, 20(1), 142-152.
- Tu, D. G., Chang, W. W., Lin, S. T., Kuo, C. Y., Tsao, Y. T., & Lee, C. H. (2016). *Salmonella* inhibits tumor angiogenesis by downregulation of vascular endothelial growth factor. *Oncotarget*, 7(25), 37513.
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A. E., & Berendsen, H. J. (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*, 26(16), 1701-1718.
- Van Ulsen, P., Zinner, K. M., Jong, W. S., & Luirink, J. (2018). On display: autotransporter secretion and application. *FEMS microbiology letters*, 365(18), fny165.
- Wang, X., Zhang, H., & Chen, X. (2019). Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer drug resistance*, 2(2), 141.
- Weber, T., & Schmitz, R. (2022). Molecular subgroups of diffuse large B cell lymphoma: biology and implications for clinical practice. *Current Oncology Reports*, 24(1), 13-21.

- Wood, W. A., & Lee, S. J. (2011). Malignant hematologic diseases in adolescents and young adults. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 117(22), 5803-5815.
- Yang, C. J., Chang, W. W., Lin, S. T., Chen, M. C., & Lee, C. H. (2018). Salmonella overcomes drug resistance in tumor through P-glycoprotein downregulation. *International journal of medical sciences*, 15(6), 574.
- Zheng, J. H., Nguyen, V. H., Jiang, S. N., Park, S. H., Tan, W., Hong, S. H., ... & Min, J. J. (2017). Two-step enhanced cancer immunotherapy with engineered *Salmonella typhimurium* secreting heterologous flagellin. *Science translational medicine*, 9(376), eaak9537.
- Zhou, S., Gravekamp, C., Bermudes, D., & Liu, K. (2018). Tumour-targeting bacteria engineered to fight cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(12), 727-743.