



**Nueva herramienta biotecnológica para el tratamiento de tumores sólidos cancerosos:
transformación genética de bacterias anaerobias.**

Stefanny Melissa Bejarano Díaz

María Alejandra Martínez Delgado

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá DC, noviembre del 2023



**Nueva herramienta biotecnológica para el tratamiento de tumores sólidos cancerosos:
transformación genética de bacterias anaerobias.**

Monografía requisito para optar por el título de Bacteriólogo y Laboratorista Clínico

Stefanny Melissa Bejarano Díaz

María Alejandra Martínez Delgado

Asesora: PhD Mary Luz Yaya Lancheros

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá DC, noviembre del 2023



**Nueva herramienta biotecnológica para el tratamiento de tumores sólidos cancerosos:
transformación genética de bacterias anaerobias.**

APROBADA: _____

JURADOS: _____

ASESORA: _____

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá DC, noviembre del 2023

Tabla de contenido

Resumen	1
1. Introducción.....	3
2. Planteamiento del problema	4
3. Justificación.....	5
4. Objetivos	6
4.1 Objetivo general	6
4.2 Objetivos específicos.....	6
5. Marco de referencia	7
5.1 Antecedentes	7
5.2 Marco teórico	12
5.2.1 Generalidades del cáncer	12
5.2.2 Fisiopatología	16
5.2.3 Terapia basada en la programación de bacterias (chasis bacteriano).....	20
5.2.4 Bacterias como vectores de terapia génica	25
5.2.5 Cargas útiles terapéuticas proporcionadas por bacterias diseñadas	28
5.2.6 Ventajas y desventajas de la terapia.....	35
6. Diseño metodológico	37
6.1 Tipo de investigación.....	37

6.2 Universo.....	37
6.3 Revisión de la información.....	37
6.5 Selección de la información.....	39
6.6 Gestor de referencia.....	40
7. Resultados.....	40
7.1 Análisis bibliométrico.....	40
7.2 Pruebas clínicas.....	42
7.3 Análisis de resultados.....	44
7.3.1 Eficacia, bioseguridad y consideraciones éticas.....	45
8. Conclusiones.....	50
9. Bibliografía.....	51

Lista de tablas

Tabla 1: Virus oncogénicos.....	19
Tabla 2: Bacterias más utilizadas en estudios para reducir la tasa de crecimiento tumoral.....	22
Tabla 3: Citocinas administradas por bacterias modificadas en estudios preclínicos.....	31
Tabla 4: Ventajas y desventajas de la terapia.....	35
Tabla 5: Estudios reportados en Clinicaltrials.....	43

Lista de figuras

Figura 1: Características biológicas del Cáncer y alteraciones génicas principales.....	13
Figura 2: Número estimado de nuevos casos en 2020, todos los cánceres, ambos sexos, todas las edades.....	14
Figura 3: Cáncer principal por país, número estimado de nuevos casos en 2020, ambos sexos, todas las edades.....	15
Figura 4: Cáncer principal por país, número estimado de muertes en 2020, ambos sexos, todas las edades.....	15
Figura 5: Factores de riesgo para desarrollar cáncer.....	16
Figura 6: Proceso de carcinogénesis.....	19
Figura 7: Modificación bacteriana para la terapia del cáncer mediante la técnica de ADN recombinante.....	26
Figura 8: Componentes de bacterias vivas diseñadas genéticamente con fines terapéuticos.....	28
Figura 9: Representación esquemática del proceso de dos pasos en la terapia génica suicida.....	34
Figura 10: Bases de datos consultadas.....	38
Figura 11: Diagrama de flujo del proceso de selección de estudios en esta monografía.....	39

Figura 12: Representación esquemática de documentos por año encontrados en la base de datos Scopus que comprenden un período de tiempo entre 2012-2023.....41

Figura 13: Representación esquemática de documentos por países encontrados en la base de datos Scopus.....41

Resumen

El cáncer representa una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial debido a su comportamiento agresivo y a la carga de resistencia a los tratamientos convencionales; esto, ha impulsado a explorar otras alternativas terapéuticas más específicas y con una toxicidad limitada hacia los tejidos circundantes. La terapia contra el cáncer mediada por bacterias se basa en el tropismo inherente de las bacterias por regiones hipóxicas de los tumores sólidos y su capacidad para ser manipuladas genéticamente como un vector para la terapia farmacológica considerándose como un arma potencial contra esta enfermedad, debido a que reducen la tasa de crecimiento de células aberrantes involucrando las respuestas inmunitarias del huésped y las respuestas moleculares celulares. En esta revisión, se presenta esta terapia novedosa haciendo énfasis en los géneros y especies bacterianas más estudiadas y los diversos mecanismos implicados en el direccionamiento y la supresión tumoral.

Palabras clave: Cáncer, bacterias dirigidas a tumores, terapia oncológica, transformación genética bacteriana.

Summary

Cancer represents one of the main causes of mortality worldwide due to its aggressive behavior and the burden of resistance to conventional treatments; this has prompted the exploration of other more specific therapeutic alternatives with limited toxicity to normal tissues. Bacterial-mediated cancer therapy is based on the inherent tropism of bacteria for

hypoxic regions of solid tumors and their ability to be genetically manipulated as a vector for gene and drug therapy and is considered as a potential strategies against this disease, because they reduce the growth rate of aberrant cells by involving host immune responses and cellular molecular responses. In this review, this therapy is presented with emphasis on the most studied bacterial genera and species and the various mechanisms involved in tumor targeting and suppression.

Keywords: Cancer, tumor-targeted bacteria, oncology therapy, bacterial genetic transformation.

1. Introducción

El principal reto que se debe enfrentar en la constante lucha contra el cáncer es reforzar la investigación oncológica como factor esencial para frenar la progresión de la enfermedad, ya que a pesar de los avances terapéuticos y de las nuevas tecnologías, en un porcentaje significativo de pacientes, los tumores terminan desarrollando mecanismos de resistencia y/o metástasis. Por ello, es crucial seguir avanzando en la comprensión de la biología del cáncer, identificando nuevas vías celulares involucradas en la aparición y el crecimiento de tumores, así como factores que puedan predecir la respuesta a distintos tratamientos.

Las bacterias son los organismos más abundantes del planeta y aunque muchas de ellas son patógenas para el ser humano, se han reportado una serie de efectos benéficos de distintas especies implicadas en estudios con fines terapéuticos. En dichos estudios, se evidencia la relación de estos microorganismos con el cáncer donde se ha explorado el potencial terapéutico de bacterias genéticamente modificadas por diferentes herramientas biotecnológicas; consecuentemente, se han logrado importantes descubrimientos en beneficio de la terapia oncológica y por lo tanto en este proyecto se planteó como pregunta de investigación: ¿Cómo funcionan las bacterias modificadas genéticamente para combatir los tumores sólidos y cuáles son los mecanismos específicos involucrados en su acción terapéutica contra el cáncer?, su respectiva respuesta suscita a diferentes investigaciones con las cuales se abren nuevas posibilidades para desarrollar terapias más efectivas y personalizadas en Oncología.

2. Planteamiento del problema

A pesar de los avances en el tratamiento y diagnóstico, el cáncer sigue siendo una de las principales patologías que afectan a la población a nivel mundial. Según Globocan¹ se estima que en el año 2040 aproximadamente habrá 30.2 millones de personas afectadas por esta enfermedad. En Colombia, el cáncer constituye un problema significativo de salud pública, con un aumento constante en el número de casos y defunciones, las estadísticas indican que cerca de 96 personas fallecen diariamente en Colombia por esta causa².

Actualmente, las terapias convencionales predominantes incluyen: cirugías (extirpación, citorreducción, cirugía paliativa), radioterapia (radioterapia con haz externo y radioterapia interna) y quimioterapia (quimioterapia estándar, tradicional o citotóxica), las cuales, suelen ser efectivas en la mayoría de los pacientes; sin embargo, se han registrado casos donde los resultados son subóptimos o el paciente desarrolla resistencia^{3,4,5}.

La resistencia terapéutica relacionada con la hipoxia es el principal fenómeno que impide la curación del paciente oncológico y se debe principalmente a la complejidad de la enfermedad⁴. Adicionalmente, estas terapias pueden generar efectos adversos como infecciones, astenia y toxicidad a las células sanas respectivamente. En este contexto, surge la necesidad de explorar nuevas estrategias terapéuticas que permitan optimizar la eficacia de estos tratamientos. Una opción considerada es la terapia mediada por bacterias anaerobias genéticamente modificadas, ya que investigaciones previas sugieren el potencial biotecnológico de estos microorganismos como un tratamiento neoadyuvante o coadyuvante novedoso.

3. Justificación

La presente monografía se enfocó en realizar un análisis bibliográfico, sobre el uso potencial de bacterias anaerobias genéticamente transformadas como tratamiento neoadyuvante o coadyuvante para tumores sólidos cancerosos. La lucha contra el cáncer, dada su complejidad, demanda un enfoque integral para abordar la enfermedad de manera efectiva. Es crucial, en consecuencia, impulsar la investigación oncológica para desarrollar opciones de tratamiento innovadoras que restrinjan el crecimiento de las células cancerosas.

Dentro de ese marco, datos estadísticos revelan que, si bien las tasas de supervivencia han mejorado en muchos tipos de tumores sólidos, aún enfrentamos desafíos, especialmente en situaciones de resistencia a la quimioterapia, donde las células cancerosas muestran una capacidad creciente para eludir los efectos de los tratamientos convencionales. Estudios clínicos recientes han puesto de manifiesto la necesidad de abordar la heterogeneidad tumoral y los factores genéticos que influyen la respuesta al tratamiento.

Considerando lo anterior, se indagan alternativas que disminuyan las limitaciones que presentan las terapias convencionales, identificando dianas terapéuticas específicas (tumores) y pormenorizando diversos mecanismos de acción que se mostrarán de manera detallada en la presente revisión.

Este trabajo no solo mostrará cómo la terapia bacteriana posee numerosos mecanismos únicos para el tratamiento del cáncer, incluyendo la capacidad de dirigirse selectivamente a los tumores, la citotoxicidad natural, quimiotaxis, entre otros; sino que también

proporcionará una visión sobre la relevancia y perspectivas para su implementación clínica. Además, se abordarán los desafíos con un enfoque en mejorar la calidad de vida de los pacientes y contribuir significativamente al conocimiento científico y médico en esta área.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Realizar un análisis bibliográfico sobre el uso de bacterias anaerobias genéticamente modificadas para el tratamiento de tumores sólidos cancerosos.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar la importancia de la terapia oncolítica bacteriana como alternativa vanguardista en la supresión tumoral.
- Identificar mediante estudios experimentales la eficacia de esta terapia y sus posibles limitaciones
- Establecer la relación terapéutica entre distintas especies de bacterias anaerobias y tipos de tumores sólidos cancerosos.

5. Marco de referencia

5.1 Antecedentes

Para iniciar, en enero del 2012 el trabajo de Lee C³ hace una evaluación sobre la eficacia de las terapias para el cáncer utilizando bacterias, en la cual se explica el porqué del tropismo de algunos géneros de bacterias por las células tumorales y el mecanismo de acción que puede causar la lisis de estas células. Adicionalmente, se hace una extensa revisión sobre el papel que cumple el sistema inmunológico del huésped y cómo puede aprovecharse en los diferentes mecanismos oncolíticos que se han estudiado donde interactúan bacterias con el fin de buscar otras opciones terapéuticas para el cáncer que superen las limitaciones de las ya conocidas. Más tarde, la investigación de Yu B *et al*⁴ describió que las regiones hipóxicas de los tumores sólidos son un problema adicional puesto que están vinculadas a resistencia a los tratamientos; este escenario propicia a que se plantee una solución al utilizar bacterias anaerobias para atacar dichas regiones. De la misma manera, en el estudio se menciona que se ha demostrado que estas bacterias no solo realizan quimiotaxis para localizar el tumor, sino que también pueden usarse como vectores de tratamiento tumoral.

También en el 2012, Cronin M *et al*⁵ amplían las características distintivas de las células cancerosas, se describe la relación entre las bacterias anaerobias y los tumores, y se mencionan los protocolos útiles para modificar genomas bacterianos, como los plásmidos que contienen genes terapéuticos de interés.

Un ejemplo destacado que demuestra la capacidad terapéutica de las bacterias contra el cáncer se presenta en el trabajo de Gao Z *et al*⁶, donde se aborda la relevancia biomédica de la toxina CPE producida por *Clostridium perfringens*. Esta toxina se utiliza para tratar diversos tipos de cáncer en los cuales los receptores de claudina están sobreexpresados. El objetivo es mejorar tanto la permeabilidad celular como la administración de agentes quimioterapéuticos. Órganos afectados por tumores malignos como mama, ovario, páncreas, colón y próstata exhiben la expresión de esta proteína.

Aunque es importante tener en cuenta la relación de las bacterias con el cáncer, también es bueno entender en sí cómo se comporta esta enfermedad. Por eso, en el artículo de autoría de Sánchez C⁷, se enfatiza la importancia que ha tenido el cáncer a lo largo de los años siendo la mayor causa de mortalidad, haciendo mención de las características intrínsecas de las células tumorales como la independencia de señales de crecimiento, insensibilidad a estímulos que inhiben el crecimiento, invasividad y metástasis, evasión de apoptosis, potencial ilimitado de replicación, angiogénesis sostenida, reprogramación del metabolismo energético y evasión de la destrucción inmune. Esto ayuda en la investigación a ampliar la comprensión de esta enfermedad.

En el artículo de investigación de Ji P *et al*⁸ se construyó EcM-GDH (*Escherichia coli* MG1655); un microorganismo modificado genéticamente que produce de manera constante glucosa deshidrogenasa. Está diseñado para dirigirse de manera activa a las áreas tumorales y competir por los recursos nutricionales de glucosa. El organismo genéticamente modificado EcM-GDH muestra una capacidad significativa para privar de glucosa, bloqueando así el suministro de energía a las células y tejidos del tumor colorrectal. Este proceso conduce a la

regresión del tumor principal mediante la activación de vías de autofagia proapoptóticas, desencadenadas por p53. Por otro lado, Lee CH *et al*⁹ y Muñoz, MG¹⁰, indican que la bacteria *Salmonella spp* induce la vía de señalización autofágica en melanoma y carcinoma epidermoides nasosinusales a través de la desregulación de la vía AKT/mTOR, una de las rutas frecuentemente mutadas en varios tipos de cáncer que juega un papel importante no sólo en el crecimiento tumoral, sino también en la respuesta potencial de los tumores al tratamiento antitumoral. En otras palabras; este microorganismo controla el crecimiento tumoral mediante la inducción de la apoptosis. Nuevamente, en el artículo queda en evidencia el potencial del enfoque de bacterias como agentes oncolíticos.

Volviendo a mencionar la relación del microambiente tumoral con la colonización y supervivencia bacteriana en la investigación de Osswald *et al*¹¹ se hace énfasis en el enfoque prometedor del uso de vectores bacterianos para la expresión de genes terapéuticos directamente. En esta investigación, se obtiene un contexto más amplio de un sistema de modelo *in vitro* muy utilizado en la investigación preclínica del cáncer que son los agregados celulares esféricos tridimensionales (3D), llamados esferoides tumorales multicelulares (MCTS), que están formados por una amplia gama de líneas celulares tumorales cuando se cultivan en condiciones adecuadas, estos se utilizan cada vez más para el descubrimiento de fármacos y estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos; por lo tanto, el objetivo del estudio fue evaluar el potencial de las MCTS como sistema modelo *in vitro* para la investigación preclínica de estrategias terapéuticas para tratar el cáncer utilizando bacterias anaerobias como vectores de entrega de genes.

Cuando se aborda el tema de las terapias contra el cáncer, se suele pensar en quimioterapia, radioterapias, inmunoterapias e incluso en las más invasivas como el caso de las cirugías destinadas a extirpar el tejido tumoral. En un estudio realizado por Felgner S *et al*¹² en el año 2016, se exploran los diversos tipos de terapias contra el cáncer que se han sido empleados a lo largo de la historia, su evolución y, de manera destacada se abordan los avances en la inmunoterapia mediada por diferentes cepas bacterianas. Este trabajo compila información procedente de investigaciones centradas en la utilización de bacterias como agentes inductores de respuestas inmunológicas contra el cáncer; presentándose como una potencial terapia. La investigación ofrece una contextualización histórica de las terapias mencionadas, incluyendo una comparación entre los desafíos superados en el pasado y aquellos que se vislumbran en un futuro próximo.

En vista del crecimiento de las publicaciones que se tornaban en pro de la bacterioterapia para el cáncer, en el año 2017 en una publicación de la autoría de Nguyen V. H *et al*¹³, se presenta una recopilación de investigaciones acerca de la utilización de *Salmonella sp.* en la terapia contra el cáncer. Muestra un panorama general de terapias que se han usado y explica la superioridad que demuestra el uso de bacterias en ellas; adicionalmente, ejemplifica los mecanismos mediante los cuales se espera obtener especificidad para dicha bacterioterapia, pues es uno de los principales desafíos a los que se ve enfrentada toda posible terapia contra el cáncer.

A medida en que fue avanzando la investigación y el conocimiento sobre el cáncer se fue dando a conocer puntos claves de este como son las características principales, aquellas que diferencian un tumor cancerígeno del tejido normal. Además, se ha confirmado la relación

entre las mutaciones en diferentes genes con el desarrollo del cáncer. En un estudio realizado por Pérez *et al*¹⁴ se mencionan las características previamente indicadas y se hace una relación de estas con defectos moleculares dando ejemplos de algunas manifestaciones que se han estudiado y también en relación con determinados genes que podrían actuar como dianas en los tratamientos antitumorales.

En otra publicación de autoría de Felgner S *et al*¹⁵ se retoma la idea de estudiar pros y contras de la bacterioterapia con base en una revisión de la evolución de las terapias contra el cáncer. Se reflejan conclusiones similares a las que se han obtenido por otros autores, la principal es la capacidad que poseen ciertas bacterias de crecer en ambientes con poca accesibilidad al oxígeno, se menciona que dicha característica es una ventaja que tiene la bacterioterapia puesto que a medida que se desarrolla un tumor se va dificultando su capacidad de obtener oxígeno debido a la baja vascularización que presenta; esto, además, es un blanco para mejorar la especificidad de las terapias antitumorales dado que los tejidos normales tienen una circulación de oxígeno buena y constante. Por lo tanto, se habla de diferentes aspectos para tener en cuenta en la creciente posibilidad de generar terapias contra el cáncer utilizando bacterias que pueden ser de diferente género y especie.

5.2 Marco teórico

5.2.1 Generalidades del cáncer

El cáncer surge como resultado de alteraciones genéticas y epigenéticas que aumentan o disminuyen las actividades de las vías críticas que median en las actividades celulares normales. El deterioro de la capacidad de reparar las alteraciones genéticas puede contribuir a que las células acumulen estas anormalidades, lo que lleva a una transformación maligna.

La enfermedad no es simplemente un trastorno de las células transformadas. Estas células crecen en masas tumorales y atraen un suministro de sangre, e invaden los tejidos circundantes, donde encuentran un nicho apropiado para continuar su crecimiento originando una metástasis, esta última siendo la principal causa de muerte^{16,17}. Las influencias moleculares del entorno que rodea a las células cancerosas contribuyen de forma importante en la capacidad de las células genéticamente alteradas para producir tumores malignos. Estas influencias incluyen: moléculas liberadas por las células próximas al tumor como citocinas o factores de crecimiento que pueden estimular la proliferación celular, la hipoxia puede desencadenar en el microambiente tumoral respuestas adaptativas en las células cancerosas potenciando así su capacidad de supervivencia y las interacciones entre células cancerosas y las células del sistema inmunitario pueden influir en la progresión tumoral y en la respuesta al tratamiento¹⁷.

Según la OMS la palabra “Cáncer” es un término amplio utilizado para aludir a un conjunto de enfermedades que se pueden originar en casi cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando las células anormales crecen de forma descontrolada, sobrepasan sus límites habituales e invaden partes adyacentes del cuerpo y/o se propagan a otros órganos”¹⁸. El cáncer engloba una serie de enfermedades que presentan factores de riesgo diferentes, cuadros clínicos propios, evolución y pronósticos diversos; sin embargo, tienen una serie de características biológicas y moleculares que las distinguen de otros tipos de entidades nosológicas. Dichas características se presentan en la Figura 1.

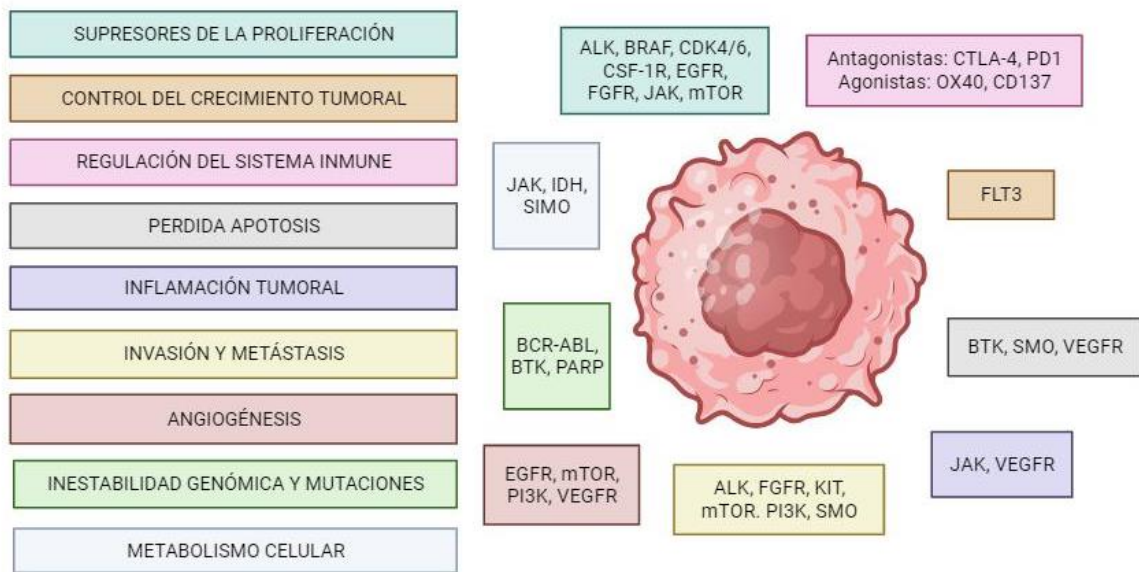


Figura 1: Características biológicas del Cáncer y alteraciones génicas principales. Modificado de: Historia del cáncer y el cáncer en la historia¹⁷

El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo. Según estadísticas proporcionadas por Globocan¹ en el 2020 se registraron un total de 19.292.789 casos a nivel mundial, destacándose Asia como el continente más afectado [Figura 2]. El cáncer de mama lidera la

incidencia global del cáncer [Figura 3] y en términos de mortalidad, el cáncer de pulmón prevalece [Figura 4].

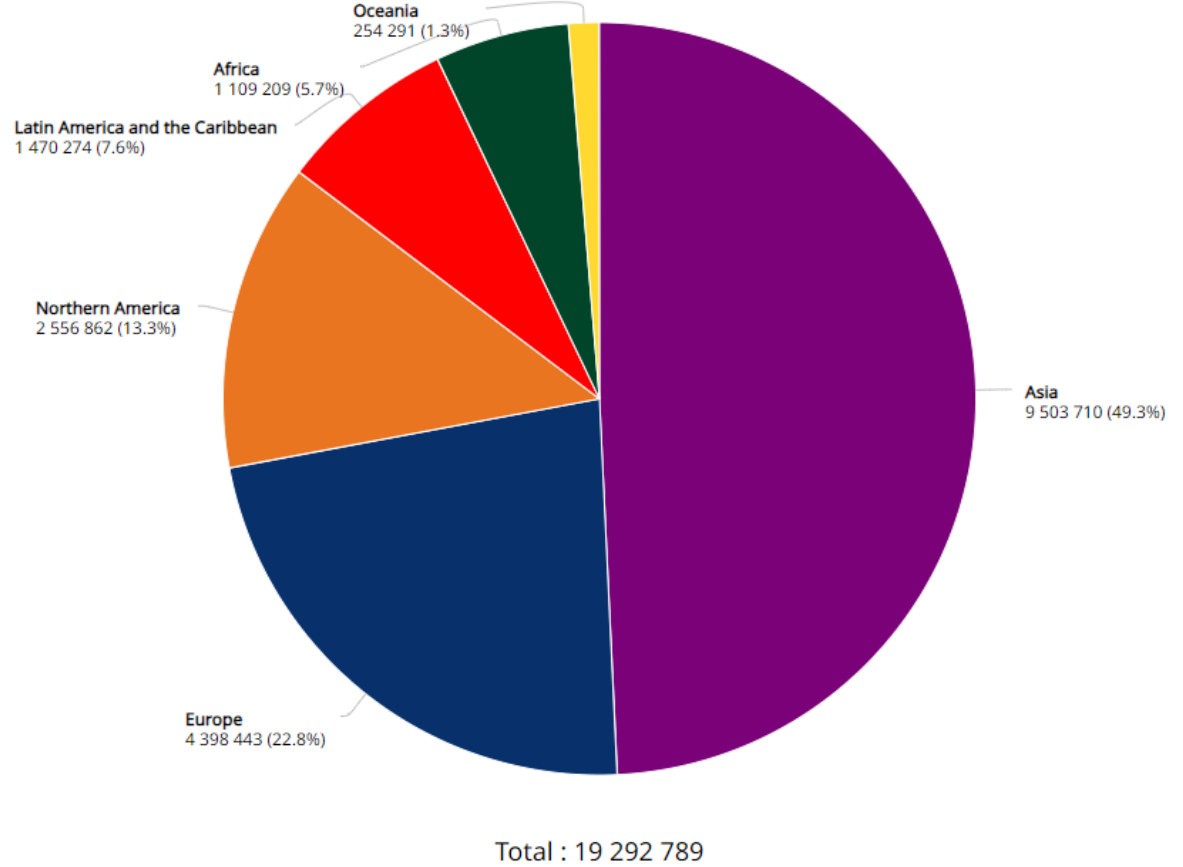


Figura 2: Número estimado de nuevos casos en 2020, todos los cánceres, ambos sexos, todas las edades.

Tomado de: Globocan¹

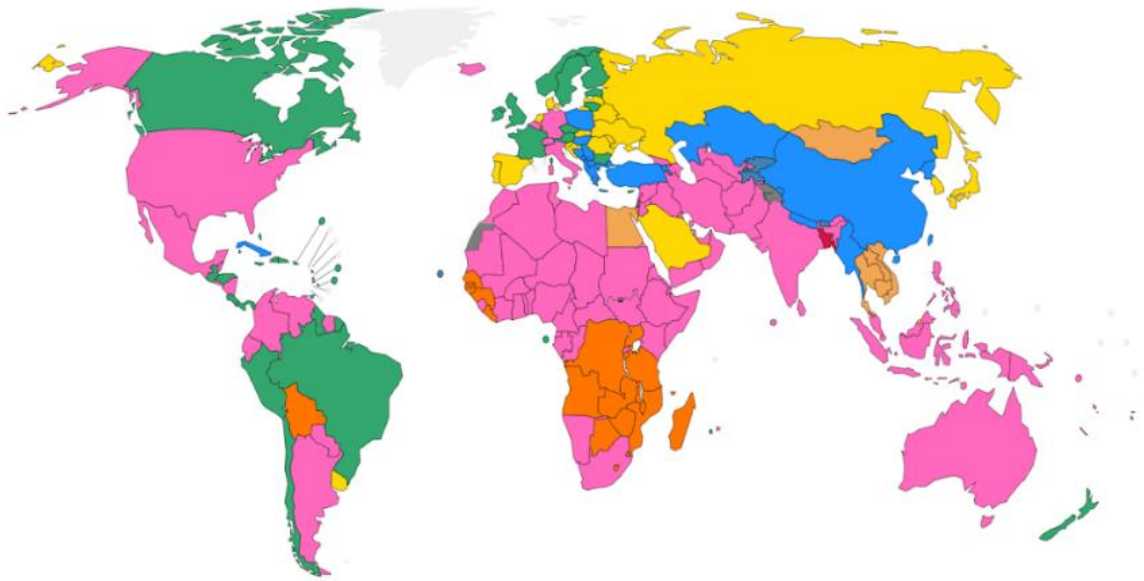


Figura 3: Cáncer principal por país, número estimado de nuevos casos en 2020, ambos sexos, todas las edades. Tomado de Globocan¹. Colores: mama (fucsia), próstata (verde), cuello uterino (naranja), pulmón (azul celeste), colorrectal (amarillo), hígado (naranja claro), estomago (azul oscuro), esófago (rojo).

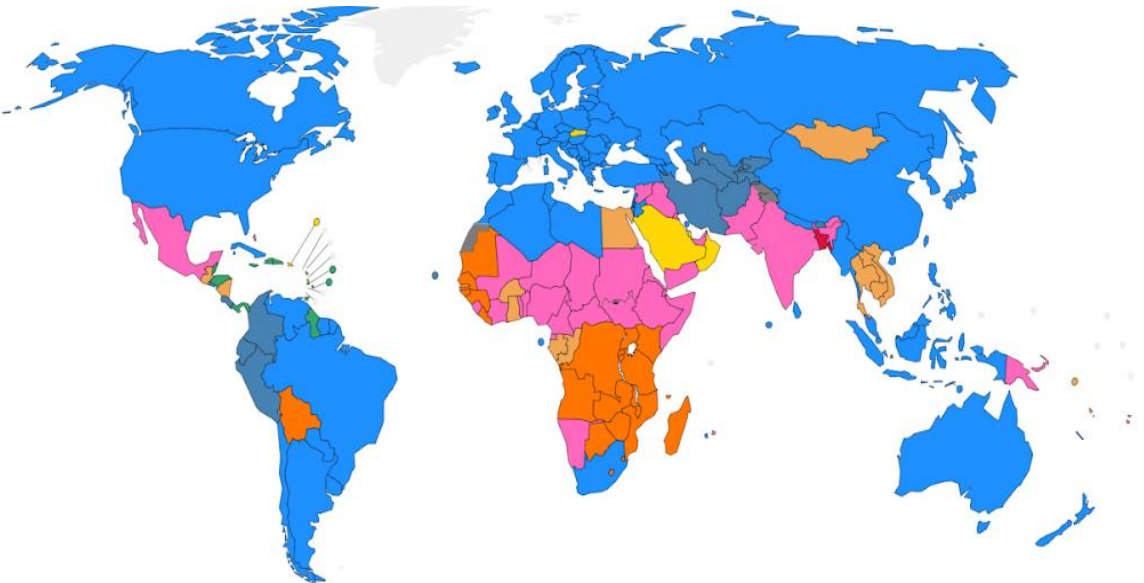


Figura 4: Cáncer principal por país, número estimado de muertes en 2020, ambos sexos, todas las edades. Tomado de Globocan¹. Colores: pulmón (azul celeste), mama (fucsia), cuello uterino (naranja), hígado (naranja claro), estómago (azul oscuro), próstata (verde), colorrectal (amarillo), esófago (rojo).

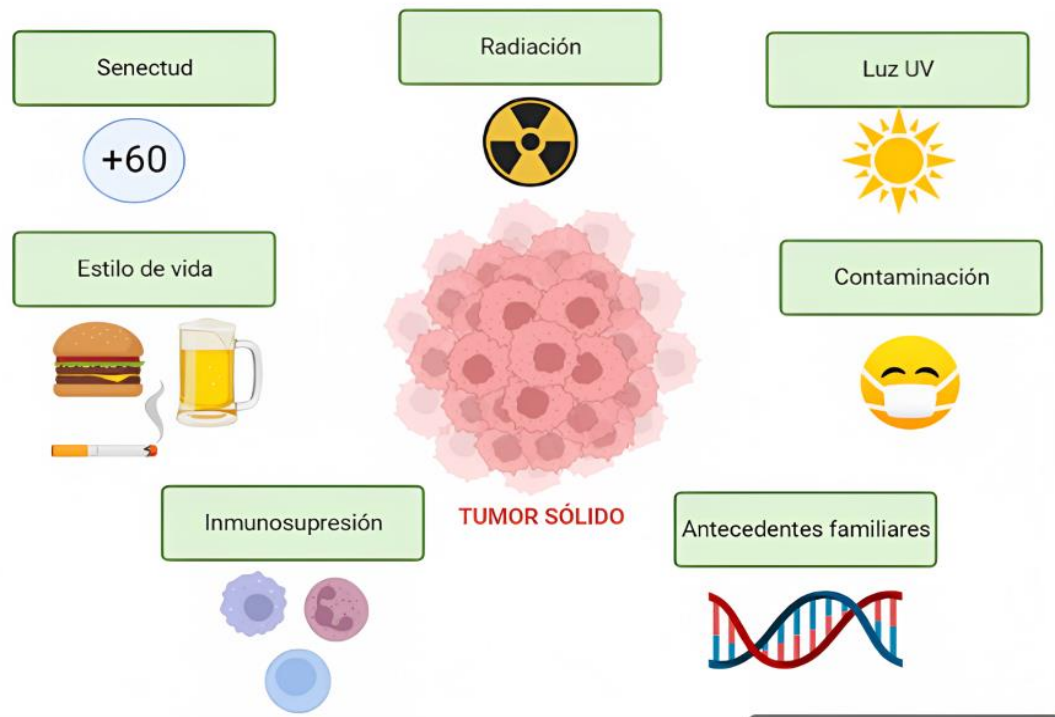


Figura 5: Factores de riesgo para desarrollar cáncer. Realización propia.

5.2.2 Fisiopatología

Las células tumorales se originan por un proceso llamado carcinogénesis [Figura 6]. La comprensión de este proceso se logró principalmente por el desarrollo de técnicas de estudio genético, por las cuáles se estableció que la transformación progresiva de células normales a derivados altamente malignos se origina en alteraciones en el material genético llamado mutaciones. Estas mutaciones, le confieren a una célula la capacidad de dividirse a una tasa mayor que su cohorte y generar una descendencia que conserva esta mutación (clones); posteriormente, las células hijas acumulan subsecuentes y diversas mutaciones que permiten generar distintos clones. Estos presentan mayores capacidades de supervivencia y crecimiento, ventajas proliferativas respecto de su contraparte normal que permite generar

un clon neoplásico persistente⁷. Normalmente, las células del sistema inmune son capaces de eliminar a estas células tumorales, en un proceso denominado inmunovigilancia tumoral, no obstante; algunos de estos clones pueden adquirir nuevas capacidades que les permiten evadir estos mecanismos de control y se desarrolla una neoplasia¹⁹.

El rol de las alteraciones genéticas en la carcinogénesis fue puesto en manifiesto al descubrir en el genoma humano genes homólogos a genes retrovirales. Los retrovirus son un tipo de virus que tienen ARN como material genético y gracias a la enzima transcriptasa reversa pueden integrarse a la célula huésped. Algunos retrovirus llevan consigo versiones mutadas de protooncogenes que cuando se integran en el genoma celular pueden contribuir al desarrollo del cáncer, un ejemplo es el oncogén V-SRC que se originó a partir del gen protooncogenes C-SRC. Sin embargo, es importante aclarar que no todos los protooncogenes provienen de genes retrovirales⁴⁴. Las mutaciones en los protooncogenes pueden surgir debido a diversos factores como productos químicos carcinógenos, radiación, errores en la replicación del ADN u otros procesos celulares; relacionados previamente con el desarrollo de tumores. En células humanas normales, estos genes se denominan protooncogenes y se relacionan con el crecimiento y proliferación de las células normales. Cuando experimentan mutaciones se les denominan oncogenes, y estas mutaciones siguen un patrón dominante. En otras palabras, la funcionalidad de la proteína codificada se ve alterada con la mutación de solo uno de los alelos, siendo suficiente para inducir cambios. Hasta el momento se han identificado más de 60 oncogenes que forman un conjunto heterogéneo de alteraciones dispuestas en más de 30.000 billones de células que residen en el ecosistema humano¹⁷. Las células tumorales pierden la interdependencia de las señales de transducción normales,

violando el estímulo a través de los receptores transmembrana, lo que facilita la proliferación, invasión y migración a otros órganos^{17, 20}. Es decir, en condiciones normales las células del cuerpo responden a señales, que reciben de otras células circundantes para regular su crecimiento, diferenciación y supervivencia. Los receptores transmembrana que están incrustados en la membrana celular, juegan un papel importante en la transducción de estas señales desde el entorno extracelular hacia el interior de la célula. Cuando una célula se vuelve cancerosa, experimenta cambios moleculares que alteran su capacidad de responder a estas señales reguladoras normales, la pérdida de estas señales significa que las células pueden volverse menos sensibles a las señales inhibitorias que normalmente limitarían su proliferación.

Por otra parte, y en paralelo se determinó la existencia de los genes supresores de tumor que intervienen en la inactivación de las alteraciones deletéreas. Estos intervienen en la evolución de la neoplasia si sufren una mutación que les inactiva, es decir, cuando hay una pérdida de función que conlleva un carácter recesivo, o absoluto cuando hay compromiso de los dos alelos. Para que el cáncer pueda progresar se ha establecido que deben producirse al menos 6 eventos críticos que afecten genes reguladores: mutaciones de los protooncogenes, inactivación de genes supresores de tumores, inestabilidad genómica, eludir la apoptosis, angiogénesis anormal, habilidad de invasión y metástasis.²⁰

Las mutaciones de los genes responsables de la carcinogénesis pueden ser heredadas o ser adquiridas *de novo* (o mutaciones somáticas) generalmente producto de la exposición a sustancias del ambiente (carcinógenos) o agentes biológicos como virus oncogénicos [Tabla

1].

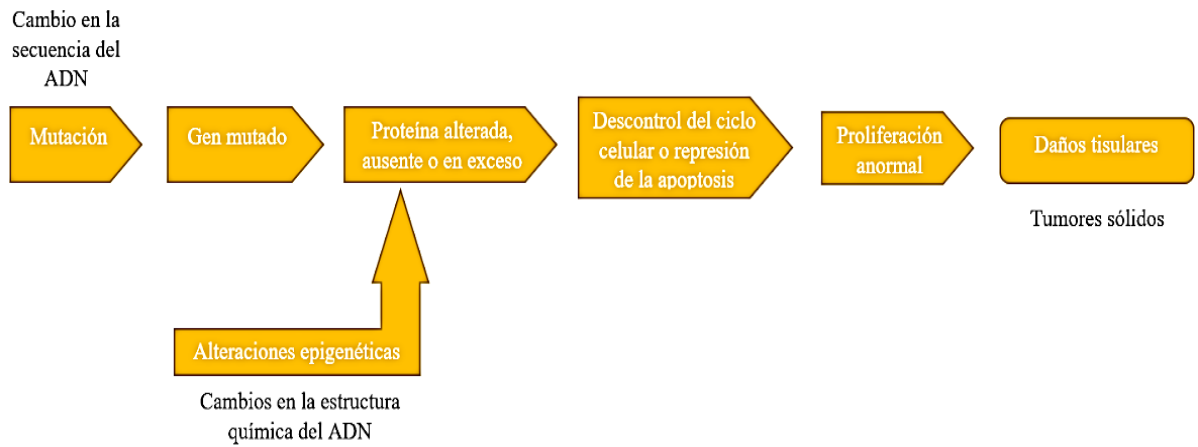


Figura 6: Proceso de carcinogénesis. Realización propia.

Virus	Cáncer asociado
Epstein Barr	Linfomas, carcinoma gástrico y carcinoma nasofaríngeo
Virus de Hepatitis B y C	Hígado
Virus de papiloma humano	Cuello uterino, vagina, pene, ano, orofaringe
Virus linfotrópico humano de células T tipo 1	Leucemias
Herpes virus	Sarcoma de Kaposi

Tabla 1: Virus oncogénicos. Realización propia.

5.2.3 Terapia basada en la programación de bacterias (chasis bacteriano)

Los primeros intentos modernos de utilizar bacterias con fines terapéuticos se realizaron hace más de 40 años. En ese momento, se descubrió que algunas especies bacterianas podían replicarse predominantemente en tumores sólidos.

El médico estadounidense William Coley (1862-1936) se convirtió en el pionero de la inmunoterapia contra el cáncer. Sus experimentos consistían en aplicar una solución bacteriana de *Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens* en pacientes afectados por sarcomas inoperables y observar el efecto del tratamiento. El tratamiento resultó muy eficaz. A lo largo de su carrera, aplicó su "toxina" a más de 1.000 pacientes con cáncer. Siempre que fue posible, la inyectó directamente en la masa tumoral primaria, o muy cerca de ella, y fue aumentando la dosis a lo largo de la terapia^{17, 20, 28}. Como efecto secundario habitual, observó episodios de fiebre. Según sus registros, un tratamiento prolongado y la aparición de fiebre se correlacionaban con el éxito de la terapia²⁰. En muchos casos se observó una regresión tumoral y en algunos pacientes se consiguió incluso la desaparición completa de la masa tumoral primaria y un estado libre de enfermedad^{20, 28}. Sin embargo, existieron casos de pacientes que desarrollaron una infección sistémica mortal; es por eso por lo cual, en los últimos años, se empezó a tener en consideración una manera de "reprogramar las bacterias genéticamente", lo cual ha experimentado un fuerte impulso puesto que se han buscado nuevos agentes terapéuticos que permitan el complemento o sustitución a los métodos de terapia usados convencionalmente. Las formas vivas, atenuadas o genéticamente modificadas de bacterias anaerobias pueden replicarse selectivamente dentro de los tumores

y suprimir su crecimiento. Debido a su especificidad hacia las células tumorales y su capacidad de adaptarse al microambiente tumoral, estas bacterias y sus productos actúan como vectores ideales para administrar cargas útiles terapéuticas a los tumores. Algunas especies bacterianas han demostrado replicarse y acumularse en mayor medida dentro de los tumores, aprovechando las condiciones únicas del entorno canceroso, como la hipoxia, pH ácido, metabolismo energético. Además, estas bacterias poseen ciertas propiedades favorables como la motilidad, la quimiotaxis y la capacidad de transportar y expresar simultáneamente múltiples proteínas terapéuticas, lo que hace que el tratamiento bacteriano sea una nueva estrategia prometedora para el futuro de la medicina, mejorando la eficacia de los tratamientos tradicionales. Una de las principales razones de la falta de eficacia de la radioterapia y la quimioterapia para muchos tumores sólidos es la presencia de zonas hipóxicas que son resistentes a estas intervenciones; los factores que contribuyen a esta resistencia incluyen la modulación de la respuesta a la quimioterapia, puesto que la hipoxia puede activar la vía de señalización celular regulada por el factor inducible por hipoxia (HIF-1) que a su vez estimula la expresión de genes relacionados con la resistencia a la quimioterapia y supervivencia celular; por otro lado al limitarse la difusión de oxígeno, los tejidos sanos y no sanos son generadores de nuevos vasos sanguíneos gracias a el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF en inglés) secretado bajo condiciones de hipoxia que induce la proliferación y organización de las células, además en la radioterapia se generan radicales libres de oxígeno que dañan el ADN de las células cancerosas, en un entorno hipóxico hay menos oxígeno disponible para participar en estas reacciones, lo que disminuye la eficacia de la radioterapia.

En consecuencia, esta aparente limitación puede aprovecharse para mejorar el tratamiento de los tumores, como la aplicación de bacterias anaerobias obligadas o facultativas. En diversos estudios se ha evidenciado que las bacterias genéticamente modificadas pueden actuar como agentes para administrar medicamentos y como vectores para la terapia génica siendo destructoras selectivas de tumores; las esporas de bacterias anaerobias, por ejemplo, resultan especialmente útiles en estas estrategias, ya que solo se activarán y multiplicarán en las áreas tumorales que carecen de oxígeno. A continuación, se detalla estos enfoques basados en bacterias.

Bacteria	Características	Modelo Tumoral	Referencia
<i>Salmonella Typhimurium</i>	-Gram negativa móvil -Anaerobia facultativa	Mama, próstata, cuello uterino, cerebro, páncreas, ovario, carcinoma, colón, melanoma	4, 9, 12, 13, 20, 22
<i>Bifidobacterium spp</i>	-Gram positivas -Anaerobias obligadas -No patógena -Probiótico	Vejiga	4, 5, 12

	-Altamente resistentes a la manipulación genética		
<i>Clostridium</i>	-Grampositiva -Anaerobios obligados -Formadores de esporas inmunológicamente inertes y que germinan en ausencia de oxígeno -Enterotoxinas	Glioma, leiomioma, ovario, mama, útero, páncreas	6, 7, 12
<i>Listeria monocytogenes</i>	-Anaerobia facultativa -Son fagocitadas por monocitos, estimulando el sistema inmune	Ovario, páncreas	7, 12, 15
<i>Escherichia coli</i>	-Anaerobia facultativa -Gram negativa -Facilidad de transformación genética	mama, carcinoma nasofaríngeo	5, 14, 21, 25, 32

	-Potencial probiótico		
<i>Mycobacterium bovis</i> *	-Vacuna BCG -Microaerófila -Alto poder antigénico -Modificante de la respuesta biológica	Vejiga	22
<i>Serratia marcescens</i> y <i>Streptococcus pyogenes</i> *	-Toxina de Coley -Anaerobios facultativos -Necrosis hemorrágica de los tumores	Sarcoma	17, 20, 28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-Bacilo Gram negativo móvil -Versátil (capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno y sobrevivir con bajos niveles de nutrientes)	Pulmón	21

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-Gram negativa -Encapsulada -Anaerobio facultativo	Carcinoma de cuello uterino	21
------------------------------	--	-----------------------------	----

Tabla 2: Bacterias más utilizadas en estudios para reducir la tasa de crecimiento tumoral. Realización propia.

*Color amarillo: Única bacteria aprobada en humanos con fines terapéuticos; se administra intravesicalmente a los pacientes con cáncer de vejiga superficial tras la resección del tumor.

*Color verde: Toxina de Coley, importante en la historia de la inmunoterapia. Estas bacterias pueden administrarse en el tumor por múltiples vías, como la inyección intratumoral, la inyección intravenosa o, en algunos casos, por vía oral como probióticos.

5.2.4 Bacterias como vectores de terapia génica

El principal problema con el uso de bacterias como agentes anticancerígenos es su toxicidad a la dosis requerida para la eficacia terapéutica y la reducción de la dosis da como resultado una eficacia disminuida y el obstáculo básico en la terapia génica del cáncer es la orientación específica de la terapia directamente a un tumor sólido. Un enfoque para superar estas limitaciones ha sido el uso de bacterias modificadas genéticamente para expresar un gen terapéutico específico [Figura 7].

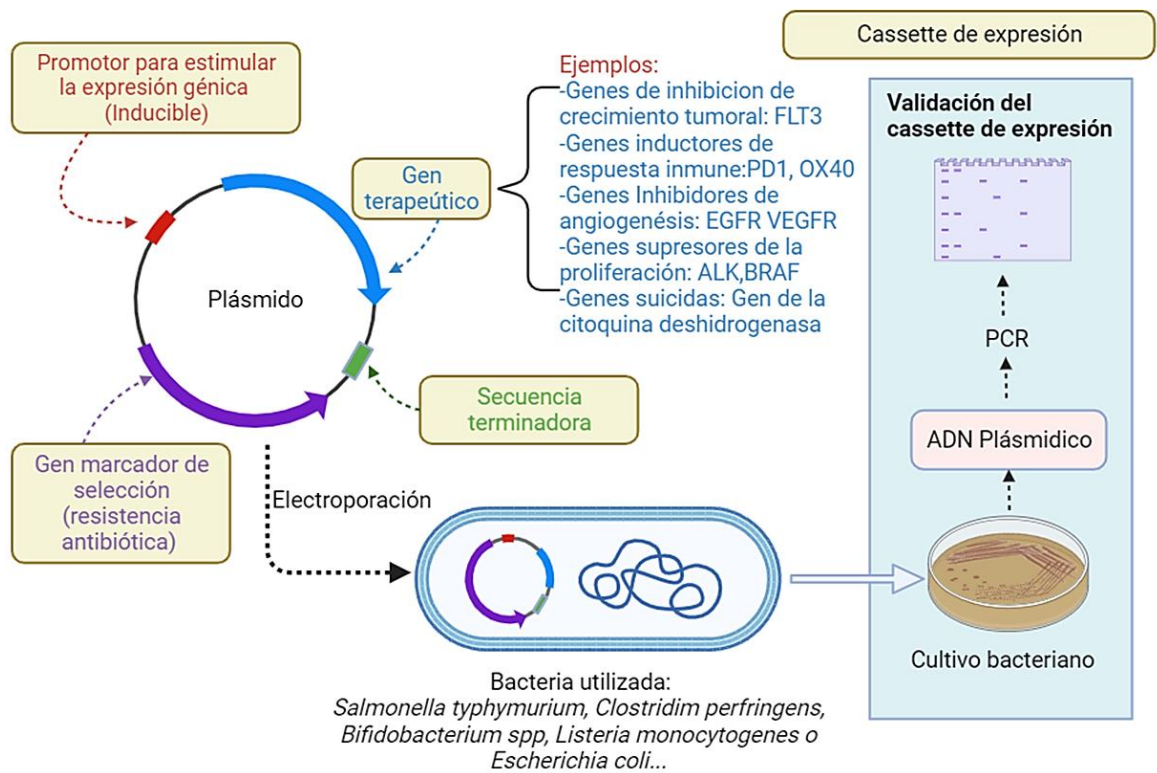


Figura 7: Modificación bacteriana para la terapia del cáncer mediante la técnica de ADN recombinante:

Realización propia.

En primer lugar, se debe obtener una secuencia de ADN que contenga el gen o genes de interés, así como también los elementos reguladores necesarios para su expresión en la bacteria huésped. Al seleccionar las enzimas de restricción, se debe tener en cuenta si las secuencias son palindrómicas (simétricas) para asegurar la correcta complementariedad de extremos. Una vez obtenida esta secuencia, se utilizan enzimas de restricción para realizar cortes específicos, generando fragmentos más pequeños. A continuación, se toma un plásmido vector que se utilizará como vehículo para transportar los fragmentos de ADN a la célula bacteriana. La elección del vector depende de factores como los elementos reguladores presentes, el tamaño del inserto y la eficiencia de replicación en la bacteria. El vector se corta con la misma enzima de restricción, de manera que se generan extremos complementarios

con los fragmentos de ADN cortados previamente. Este paso es crucial para asegurar la orientación correcta de la inserción.

Finalmente, se mezcla el vector y los fragmentos de ADN, y se utiliza una ligasa para unirlos de manera permanente. La ligasa une los extremos cohesivos generados por las enzimas de restricción, formando un plásmido recombinante completo. Una vez que se ha construido el plásmido recombinante, se introduce en una célula bacteriana y se replica junto con el cromosoma bacteriano.

Al producir la proteína de interés específicamente en el microambiente del tumor, estos vectores bacterianos pueden proporcionar una poderosa terapia adyuvante para varios tratamientos contra el cáncer. Por lo tanto, las bacterias sirven como vectores o vehículos para administrar preferentemente agentes anticancerígenos, péptidos citotóxicos, proteínas terapéuticas o enzimas convertidoras de proprofármacos a tumores sólidos⁴⁵.

Aunque este método es ampliamente utilizado y eficiente; pueden surgir inconvenientes. La elección inadecuada de enzimas de restricción puede llevar a extremos incompatibles, que da como resultado una ligación incorrecta o la pérdida de fragmentos.

Por otra parte, en la actualidad se han generado cepas atenuadas que se obtienen mediante pases *in vitro* o *in vivo* o por la eliminación de genes específicos utilizando técnicas moleculares^{4,17}. La primera técnica se basa en la presión selectiva cuando las bacterias se adaptan a un entorno particular dentro del huésped. Al pasar bacterias de un tumor a otro, ya sea en cultivos celulares o en ratones, pueden desarrollar un fenotipo adaptado al tumor que exhibe al mismo tiempo una alta especificidad tumoral.

5.2.5 Cargas útiles terapéuticas proporcionadas por bacterias diseñadas

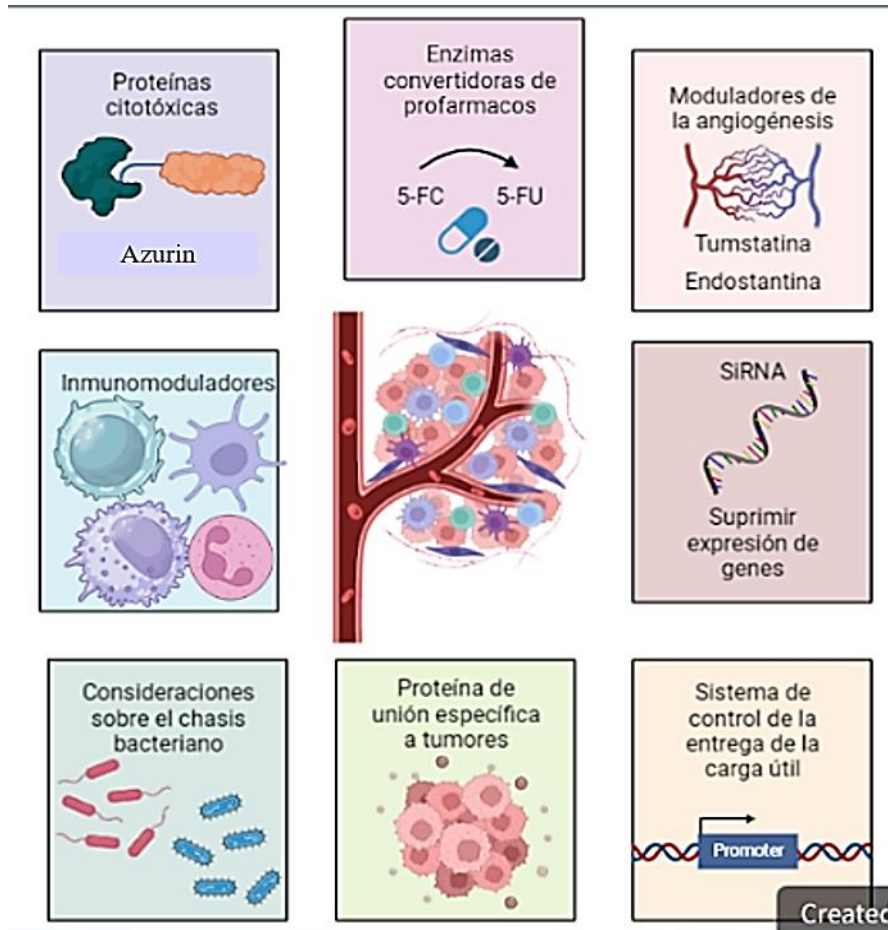


Figura 8: Componentes de bacterias vivas diseñadas genéticamente con fines terapéuticos. Modificado de:

Tweak to Treat: Reprogramming Bacteria for Cancer Treatment²²

5.2.5.1 Toxinas bacterianas para tratamiento del cáncer

Las toxinas bacterianas con actividad antitumoral han sido reconocidas como agentes anticancerígenos alternativos para el tratamiento de tumores sólidos avanzados. Las células cancerosas suelen tener un elevado número de antígenos tumorales específicos en la superficie celular y las toxinas bacterianas se unen a estos antígenos en la superficie celular

y posteriormente se activan. Las toxinas bacterianas que se han dirigido a células incluyen la toxina diftérica (DT), la enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE) y la exotoxina A de *Pseudomonas* (PE)²³.

La enterotoxina de *Clostridium perfringens* (CPE), una toxina bacteriana formadora de poros se ha utilizado eficazmente en la terapia contra el cáncer, sobre todo en el tratamiento del cáncer colorrectal, y numerosos estudios han demostrado que tiene ciertos efectos anticancerígenos²⁴. Esta propiedad biológica se ha evidenciado en el estudio de Gao Z, McClane BA⁶ donde la CPE puede desencadenar la lisis de las células epiteliales al unirse a la claudina-3 y la claudina-4 que están sobreexpresadas en diferentes tipos de cáncer. La CPE, tiene tres dominios estructurados, incluidos el dominio I C-terminal responsable de la unión al receptor, el dominio II que facilita la oligomerización y la inserción en la membrana, y el dominio III, que puede desempeñar un papel en cambios físicos durante la inserción de la toxina en las membranas, se une a los receptores de claudina. Posteriormente la toxina ensamblada forma un poro activo desencadenando la lisis celular. Se ha explorado un enfoque alternativo mediante el uso de CPE, correspondiente al dominio de unión al receptor I, para mejorar la permeabilidad celular y facilitar la administración de agentes quimioterapéuticos contra células cancerosas.

5.2.5.2 Bacterias como agentes de inmunoterapia

La inmunoterapia en el cáncer se refiere a un conjunto de tratamientos médicos que se basa en el uso de agentes que estimulan el sistema inmunológico del paciente para atacar y destruir

las células cancerosas. En los últimos años, se ha explorado cada vez más el potencial de las bacterias como agentes de inmunoterapia, y se han descubierto varias formas en que estas pueden ser utilizadas para mejorar la respuesta inmunológica del cuerpo frente a diferentes entidades clínicas.

Una de las formas en que las bacterias pueden ser utilizadas en la inmunoterapia del cáncer es mediante la administración directa de bacterias vivas en el tumor. Se ha demostrado que algunas bacterias pueden colonizar selectivamente los tumores y causar una respuesta inmunológica local que destruye las células cancerosas. Además, algunas bacterias pueden ser genéticamente modificadas para producir proteínas específicas que estimulan la respuesta inmunológica y la eliminación de las células tumorales. Otro enfoque es el uso de bacterias como vectores de terapia génica para la entrega de moléculas terapéuticas directamente a las células tumorales. Las bacterias pueden ser genéticamente modificadas para producir y secretar proteínas terapéuticas, tales como citocinas [Tabla 3] o anticuerpos, que pueden mejorar la respuesta inmunológica y la eliminación de las células malignas.

Además, las bacterias también pueden ser utilizadas en combinación con otros agentes de inmunoterapia, tales como inhibidores de puntos de control inmunológico (actúan bloqueando la interacción entre proteínas inhibitoras y estimuladoras en la superficie de las células T), para mejorar la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PD-1 o anti CTLA-4, bloquean las vías de señalización inhibitoras en las células T; la interacción de PD-1 en las células T con PD-L1 en las células tumorales puede inhibir la actividad antitumoral de las células T. Los inhibidores de PD-1 o PD-L1 bloquean esta interacción, liberando así células T para atacar células cancerosas.

Citocina	Función
IL-2	Mitosis LT
IL-4	Producción IgE
IL-12	Diferenciación a Th1
IL-15	Activación de LT citotóxico
IL-18	Activación de NK
IFN- γ	Síntesis de CMH clase II
CCL21	Controlar la quimiotaxis, adhesión, migración y proliferación en condiciones de inflamatorias
GM-CSF	Ayuda a la producción de células de línea mieloide
FLT3L	Aumenta el número de células inmunitarias
TNFSF14	Función proapoptótica

Tabla 3: Citocinas administradas por bacterias modificadas en estudios preclínicos. Realización propia.

5.2.5.3 Esporas bacterianas

Muchas bacterias anaerobias tienen la cualidad de formar esporas cuando se encuentran en condiciones adversas que les permita sobrevivir incluso en condiciones ricas de oxígeno, aunque no puedan crecer ni multiplicarse. Dentro de las bacterias anaerobias productoras de esporas se encuentran géneros como: *Anaerobacter spp.*, *Halobacterium spp.* o *Clostridium spp.*; siendo este último el más estudiado²⁹. Diversos estudios en modelos animales destacan el uso de las esporas de *Clostridium spp.* como vectores para la administración o expresión de péptidos citotóxicos, proteínas terapéuticas, genes supresores de tumores y agentes anticancerígenos. Asimismo, este género se ha investigado por la capacidad de sus esporas de sobrevivir, pero no crecer, en condiciones hipóxicas, lo que conlleva la muerte de las células tumorales que abarcan zonas hipóxicas y como hemos mencionado anteriormente son resistentes a los tratamientos habituales. Así, en varios estudios en ratones a los que se les inyectó intratumoralmente esporas de *C.histoliticum* se observó lisis de los tejidos tumorales y algo similar ocurrió en ratones inyectados por vía intravenosa con esporas de *C.sporogenes*, en los que la bacteria sólo se halló en los tumores, pero no en los tejidos normales²⁹.

5.2.5.4 Enzimas convertidoras de profármacos

El método predominante en el tratamiento contra el cáncer mediante bacterias se basa en la terapia enzimática-farmacológica. En este enfoque, se administra bacterias a través de la vía

sistémica con el propósito de liberar un gen/enzima específico capaz de transformar un profármaco administrado sistémicamente en su compuesto activo dentro del tejido tumoral. Para que esta estrategia sea efectiva, es imperativo cumplir con ciertos requisitos: hay ciertos requisitos: la enzima debe ser de origen no humano o expresarse en concentraciones mínimas en tejidos normales, además de poseer una alta actividad catalítica. El profármaco debe ser un buen sustrato óptimo para la enzima, sin activarse en tejidos sanos, y debe carecer de toxicidad. Además, el fármaco activado debe ser altamente difusible o ser absorbido activamente por células adyacentes para lograr un efecto de "eliminación de células transeúntes", mientras que idealmente no debe filtrarse a la circulación sistémica³¹.

En el estudio de Ho, C.L, et al en el 2018³², demostraron que *Escherichia coli* Nissle (EcN) deficiente en alanina para coexpresar *INP-HlpA* (proteína HlpA de *Streptococcus gallolyticus* con una etiqueta de INP) y *YebF-II* (mirosinasa de *Armoracia rusticana* con una etiqueta de secreción de YebF) usando promotores constitutivos; como resultado la mirosinasa secretada convirtió el glucosinolato dietético en sulforafano, una molécula orgánica con actividad anticancerígena.

La terapia del gen suicida con bacterias es una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer que se basa en el uso de bacterias modificadas genéticamente para expresar un gen "suicida" que mata selectivamente las células cancerosas.

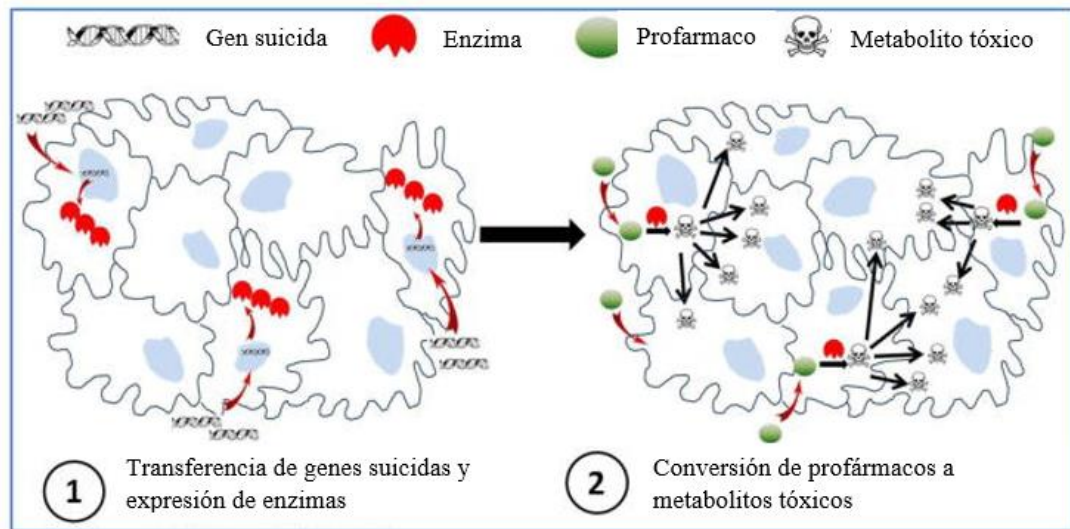


Figura 9: Representación esquemática del proceso de dos pasos en la terapia génica suicida³³.

En el paso 1, con la ayuda de un vector (bacteria), las células cancerosas son transducidas por genes suicidas que dan como resultado la expresión de una enzima. En el paso 2, se administra el profármaco que puede convertirse en su forma citotóxica por la enzima y matar no solo las células transducidas sino también las vecinas³³.

En esta terapia, se utiliza una bacteria que se ha modificado genéticamente para expresar una enzima llamada "citoquina deshidrogenasa". Esta enzima es capaz de convertir un profármaco inactivo llamado "5-fluorocitosina" en un compuesto citotóxico llamado "5-fluorouracilo", que es capaz de matar las células cancerosas.

El gen de la enzima citoquina deshidrogenasa se coloca dentro de la bacteria, que se dirige selectivamente a las células cancerosas a través de ciertos mecanismos de reconocimiento celular. Una vez que las bacterias alcanzan el tumor, liberan la enzima citoquina deshidrogenasa, que convierte la 5-fluorocitosina en 5-fluorouracilo, matando así las células cancerosas. A altas concentraciones de 5-FU, se informa que el nivel de inhibición del ARNm

es tan alto que puede ocasionar a que las células no pueden producir las proteínas esenciales para su crecimiento y supervivencia, lo que a veces se describe como “inanición de proteínas”. En otras palabras, las células cancerosas pueden volverse disfuncionales debido a la falta de proteínas importantes³³.

La terapia del gen suicida con bacterias ha mostrado efectividad en modelos animales, y ha sido objeto de varios ensayos clínicos en humanos para evaluar su seguridad y eficacia en diferentes tipos de tumores sólidos, incluyendo colorrectales, de mama, de cerebro, páncreas y piel.

En general, esta terapia representa una prometedora estrategia de tratamiento para el cáncer que combina la especificidad y selectividad de las bacterias para las células tumorales, junto con la capacidad de las enzimas suicidas para matar selectivamente las células cancerosas.

5.2.6 Ventajas y desventajas de la terapia

Ventajas	Desventajas
Vectores para la administración de genes informadores, genes terapéuticos o inhibidores de la actividad celular	Peligro inherente de la técnica, puesto que existe la posibilidad de inducir una respuesta tóxica inmunomediada en el hospedador tras la administración bacteriana.

Alta especificidad	Susceptibilidad individual
Potencial oncolítico natural de algunas especies bacterianas	Es complicado equilibrar la dosis bacteriana
Supervivencia en el ambiente hipóxico tumoral	Incapacidad para erradicar por completo los tumores por sí solos
Quimiotaxis	Falta de disponibilidad de herramientas genéticas compatibles y costoso para las clínicas, hospitales o centros de investigación
Motilidad (fácil penetración en los tejidos)	No existen protocolos de clonación bien establecidos
-	Información genómica incompleta y partes biológicas no caracterizadas

Tabla 4: Ventajas y desventajas de la terapia. Realización propia

6. Diseño metodológico

6.1 Tipo de investigación

Según el análisis y alcance de los resultados, la presente monografía es de tipo descriptiva, ya que la búsqueda de la información va a ser basada en trabajos realizados por otros investigadores que permitan dar respuesta a los ítems propuestos.

6.2 Universo

Artículos científicos de revisión en inglés y español y pruebas clínicas relacionados con el tema: bacterias genéticamente modificadas para el tratamiento del cáncer en un período comprendido del 2012-2023.

6.3 Revisión de la información

Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica detallada en las bases de datos que se muestran en la figura 11. Bases de datos disponibles en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; para obtener artículos relevantes para esta monografía. Los estudios se obtuvieron de acuerdo con una combinación de palabras (gene therapy bacteria and cancer),

(gene transformation bacteria “cáncer”) y operadores booleanos (AND, OR, NOT). Todos los estudios evaluados fueron en un período de tiempo entre los años 2012-2023.

 Dialnet	 SciELO	 redalyc.org	 PubMed
 ProQuest.	 DOAJ DIRECTORY OF OPEN ACCESS JOURNALS	 ScienceDirect	 EBSCOhost
 J-Gate	 nature International journal of science	 Springer Link	 U.S. National Library of Medicine ClinicalTrials.gov

Figura 10: Bases de datos consultadas. Realización propia

Además, se efectuó una búsqueda en los registros de ensayos clínicos (ClinicalTrials.gov, la Plataforma de Registro Internacional de Ensayos Clínicos de la OMS) donde se seleccionaron los ensayos clínicos que tienen como título del estudio (gene therapy bacteria / cáncer).

6.5 Selección de la información

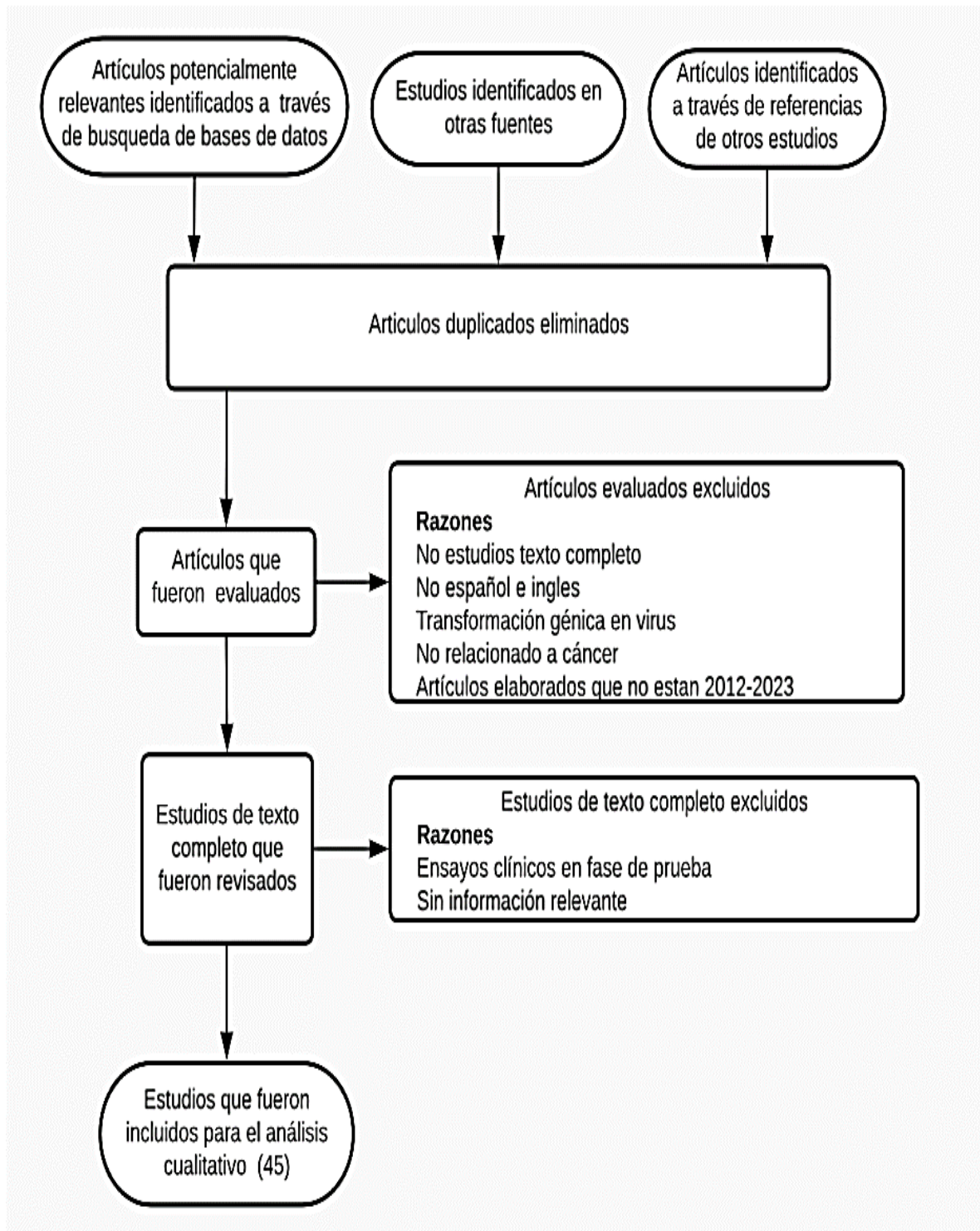


Figura 11: Diagrama de flujo del proceso de selección de estudios en esta monografía. Realización propia

6.6 Gestor de referencia

La organización y gestión de las referencias bibliográficas de artículos de revistas o libros obtenidos de una o varias fuentes de información se hizo mediante el programa Refworks.

7. Resultados

7.1 Análisis bibliométrico

Este análisis se realizó mediante la herramienta Scopus para evaluar la actividad científica respecto al tema propuesto y se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se ingresó en la barra de búsqueda bacteria AND as AND cáncer AND treatment y la base arrojó 175.652 documentos relacionados.

Se seleccionó la opción “analyze search results” donde se filtraba la información por autores más relevantes, instituciones, países, año, etc.

A continuación, se presenta el resultado de documentos por año (período de tiempo del 2012-2023) y documentos por países.

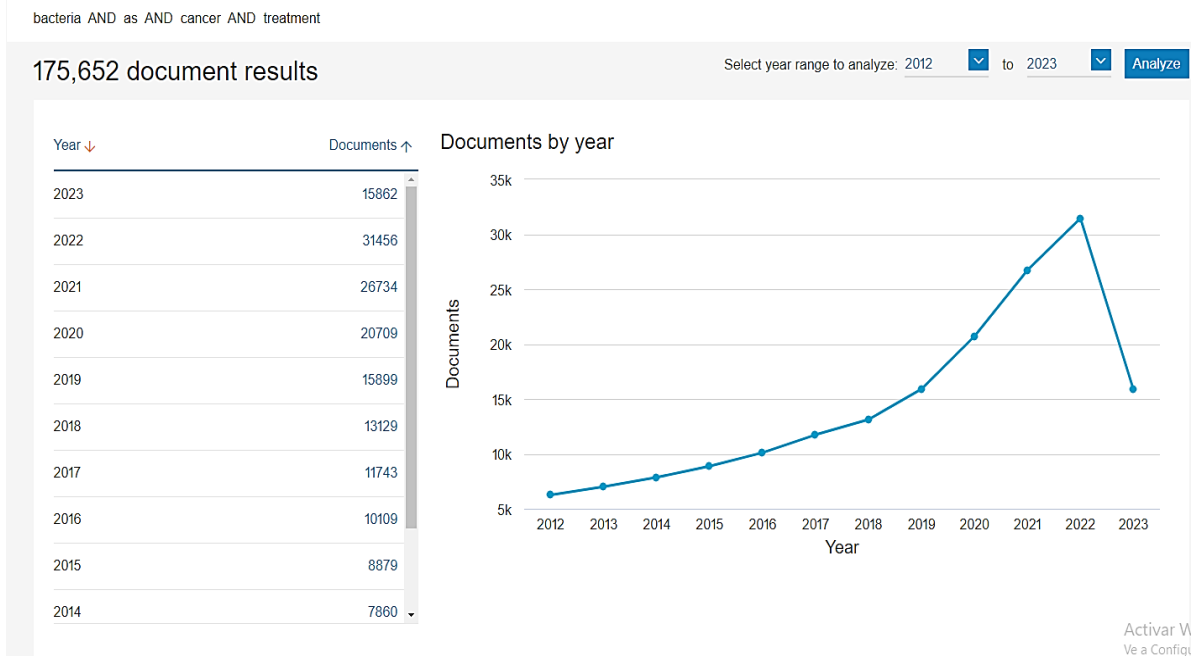


Figura 12: Representación esquemática de documentos por año encontrados en la base de datos Scopus que comprenden un periodo de tiempo entre 2012-2023. Tomado de Scopus³⁴.

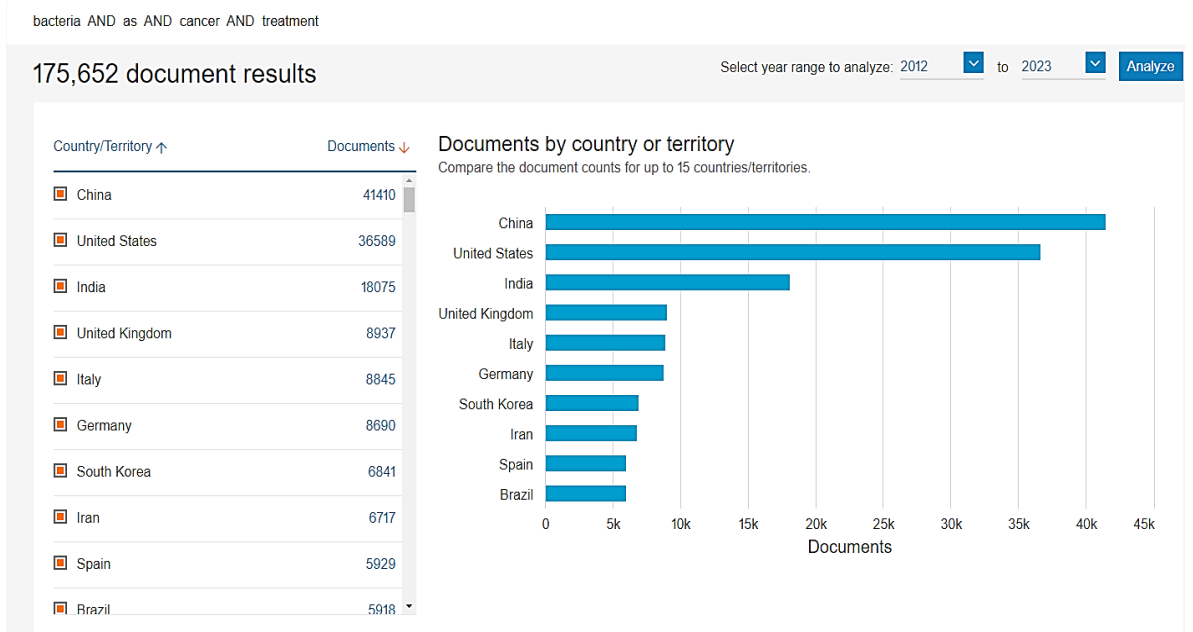


Figura 13: Representación esquemática de documentos por países encontrados en la base de datos Scopus. Tomado de Scopus³⁴.

7.2 Pruebas clínicas

Bacteria usada	Condiciones de la enfermedad	Resultados	Referencia
<i>Salmonella typhimurium</i> VNP 200009	Cáncer de mama y melanoma metastásico	Exhibe una colonización tumoral preferencial Los ensayos clínicos han demostrado que la <i>Salmonella</i> atenuada en condiciones de seguridad no es eficaz en el tratamiento de tumores.	35, 36
<i>Listeria monocytogenes</i> vacuna experimental ADXS11-001	Cáncer orofaríngeo	Con el objetivo de potenciar la respuesta inmunológica	37
Vacuna de bacterias mixtas MBV-tumores de	Melanoma, sarcoma tumor del estroma gastrointestinal,	Identificar la dosis que induce el efecto pirógeno deseado	38

expresan el Ag NY-ESO-1	cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células de transición, cáncer de próstata, carcinoma de ovario, cáncer de esófago, cáncer de mama		
<i>Clostridium novyi</i> esporas	Tumores malignos sólidos refractarios al tratamiento	Evaluar la actividad antitumoral preliminar de una respuesta general después de la administración de una única inyección	39
<i>Pseudomonas truncada</i>	Linfoma cutáneo de células T - LMB-2	Anticuerpo genéticamente modificado y la toxina producida por la bacteria	40

Tabla 5: Estudios reportados en Clinicaltrials. Realización propia, información tomada de: Clinicaltrials^{36, 37}.

7.3 Análisis de resultados

El número de publicaciones científicas anuales en el ámbito de la investigación biomédica ha experimentado un crecimiento exponencial desde el año 2012. Sin embargo, se ha observado un declive en la publicación de artículos y resultados de estudios clínicos durante el año 2023. Este fenómeno puede atribuirse a diversos factores, entre los cuales se destacan la complejidad inherente de la enfermedad y la terapia en consideración. Además, la falta de estandarización de los eventos adversos en los ensayos clínicos, la escasez de recursos tecnológicos y el limitado apoyo por parte de instituciones de investigación y compañías farmacéuticas podrían estar contribuyendo a esta disminución en la producción científica.

La falta de fundamentos científicos sólidos conlleva consecuencias significativas, como la imposibilidad de explorar enfoques terapéuticos más efectivos y comprender los mecanismos subyacentes de la enfermedad. La investigación desempeña un papel crucial en el desarrollo de innovaciones y en la mejora de la comprensión del comportamiento de las células tumorales, lo cual resulta fundamental para el avance y el progreso en el ámbito biomédico.

El país líder en investigación en el campo de la transformación genética bacteriana como posible tratamiento contra el cáncer es China, con una notable cantidad de más de 40.000 estudios realizados en esta área. Estados Unidos se encuentra en una posición cercana, con aproximadamente 36.000 estudios. China ha experimentado un crecimiento significativo en su inversión en investigación científica en los últimos años, lo que ha contribuido a su posición destacada en este campo. Este liderazgo de China en la investigación biomédica se atribuye a varios factores clave. En primer lugar, el país ha realizado inversiones

significativas en la mejora de su infraestructura científica, incluyendo la adquisición de equipos y tecnologías de última generación. Esto ha permitido a los investigadores chinos llevar a cabo investigaciones innovadoras. Además, China ha fomentado el desarrollo de talento humano altamente capacitado y competitivo. El país ha implementado programas de capacitación y becas para atraer y retener a científicos talentosos, lo que ha fortalecido su capacidad investigativa y su posición en la comunidad científica internacional.

Latinoamérica no ha representado participación en estos nuevos enfoques terapéuticos, a excepción de Brasil que está incluido en el top 10 de países con más estudios publicados y en el caso de Europa; Reino Unido, Italia, Alemania y España son los territorios con más publicaciones.

Finalmente, en cuanto a pruebas clínicas hay pocos estudios exitosos. Se encontró que bacterias como: *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *bacterias mixtas MBV*, *Clostridium novyi*, *Pseudomonas truncada* demostraron ser candidatas en provocar efectos inmunológicos y respuesta tumoral eficaz en los pacientes evaluados.

7.3.1 Eficacia, bioseguridad y consideraciones éticas

La eficacia del tratamiento depende de varios factores. En primer lugar, se considera la respuesta de las células tumorales, del sistema inmune y de los mecanismos celulares involucrados. Estos aspectos se evalúan mediante técnicas de imagenología como resonancias magnéticas, tomografías computarizadas o ecografías, por el sistema de

medición The Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST), que es el sistema de medición más utilizado en ensayos clínicos; se basa en la suma de los diámetros mayores de la lesión diana en un plano transversal, criterios internacionalmente aceptados para la evaluación de la respuesta al tratamiento en tumores sólidos puesto que define si el paciente con cáncer está respondiendo adecuadamente o no a la terapia⁴¹. La evaluación de la respuesta inmune al tratamiento en el cáncer puede realizarse mediante diferentes métodos y técnicas; por ejemplo, análisis de biomarcadores por citometría de flujo, perfilación genómica, inmunohistoquímica y ensayos de liberación de citoquinas³⁴.

La dosis administrada y duración, la administración coadyuvante con terapias convencionales, el blanco terapéutico, mecanismo de acción bacteriana en el ambiente tumoral, así como la resistencia o refractariedad al tratamiento convencional son otros factores relevantes para tener en cuenta en el resultado esperado. La medicina personalizada también desempeña un papel importante, permitiendo adaptar el tratamiento a las características individuales de cada paciente.

Uno de los principales factores que impulsan el uso de la administración de fármacos dirigidos contra células cancerosas está relacionado con la capacidad de las especies bacterianas anaerobias para prosperar en núcleos tumorales hipóxicos. La hipoxia es un rasgo distintivo de tumores sólidos que proliferan rápidamente, una característica atribuida a su expansión más allá del suministro de sangre disponible. La estructura de la vasculatura de los vasos sanguíneos es funcionalmente anormal en los tumores, lo que da como resultado un flujo sanguíneo irregular en todo el tejido, lo que conduce a la privación de oxígeno; esta condición obliga a las células tumorales a alterar su metabolismo. Se sabe que la región del

tumor hipóxico está asociada con una mayor expresión de *MDR1* (un gen resistente a múltiples fármacos) y genes de glicoproteína P, que son responsables del desarrollo de resistencia múltiple a varios fármacos contra el cáncer.

Por otro lado, la evaluación de la eficacia de esta terapia no se limita a las respuestas inmediatas al tratamiento, también es importante realizar un seguimiento a largo plazo de los pacientes tratados para evaluar la duración de la respuesta, la supervivencia a largo plazo y los posibles efectos secundarios a largo plazo.

Antes de probar la terapia en seres humanos, se llevan a cabo estudios en modelos animales que se asemejan a la enfermedad humana. Estos estudios evalúan la capacidad de las bacterias atenuadas para dirigirse a los tumores sólidos, la capacidad de entrega de genes terapéuticos o agentes farmacológicos, y los efectos antitumorales resultantes. Se miden parámetros como el tamaño del tumor, la tasa de crecimiento tumoral, la supervivencia de los animales y las respuestas inmunológicas inducidas. Una vez que se ha demostrado la eficacia en modelos animales, se procede a los ensayos clínicos en humanos. Estos ensayos se dividen en fases, desde la fase I hasta la fase III, y evalúan la seguridad y eficacia de la terapia en pacientes humanos. Se recopilan datos sobre la respuesta del tumor, la supervivencia, la calidad de vida y otros parámetros clínicos relevantes. Los ensayos clínicos también pueden incluir análisis de biomarcadores para evaluar los cambios moleculares y biológicos en los tumores y en el sistema inmunológico de los pacientes tratados. Además, se están realizando investigaciones para mejorar la seguridad y la eficacia de la terapia de modificación genética bacteriana en el cáncer. Se están explorando diferentes estrategias para garantizar que las bacterias modificadas sean seguras y no causen daño a los pacientes. Además, se están desarrollando

enfoques para mejorar la capacidad de las bacterias para colonizar y persistir en el tumor, así como para superar los desafíos del sistema inmunológico del paciente.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la terapia de modificación genética bacteriana en el cáncer todavía está en las etapas iniciales de investigación y desarrollo. Se necesitarán más estudios preclínicos y clínicos para comprender completamente su seguridad, eficacia y potencial a largo plazo.

También es importante mencionar las posibles implicaciones legales y cuál sería el papel de la bioética con respecto a esta terapia. En esta necesidad de analizar desde la bioética las investigaciones como la terapia génica, es importante considerar la seguridad biológica ya que es importante garantizar que las bacterias modificadas genéticamente no representen riesgos para la salud humana, por otro lado, se debe evaluar la posibilidad de transferencia de genes a otras bacterias y se debe evaluar la posibilidad de revertir los cambios genéticos introducidos en las bacterias en caso de que surjan efectos adversos inesperados. Considerar principios bioéticos para las investigaciones de terapia génica, puede promover el establecimiento de normas mínimas para la realización de estas, por medio de un proceso de deliberación dinámico cuyas soluciones siempre queden abiertas a una revisión, con base en los avances científicos. El papel de la bioética, en este sentido, es desarrollar un espacio de deliberación interdisciplinaria que colabore en la creación de un carácter ético de las sociedades; y en la forja del carácter justo y prudente del ámbito de la investigación biotecnológica⁴².

La perspectiva sobre la transformación genética bacteriana como posible tratamiento para el cáncer en Latinoamérica puede variar según la región y el contexto específico. En general, la

comunidad científica y médica en Latinoamérica muestra un interés creciente en las terapias génicas y enfoques innovadores para el tratamiento del cáncer, incluyendo la ingeniería genética bacteriana, pero, es importante destacar, que la adopción de nuevas terapias en el ámbito médico requiere un riguroso proceso de evaluación y aprobación regulatoria. En este continente, la visión puede estar influenciada por factores como la infraestructura científica y tecnológica disponible, la inversión en investigación y desarrollo, la disponibilidad de recursos financieros y la regulación de terapias génicas, pero como bien se sabe la escasez de herramientas moleculares inciden de manera adversa en el proceso de validación de una terapia. La normativa que se aplicaría a la transformación genética bacteriana como tratamiento para el cáncer en Latinoamérica puede variar según el país específico, debido a que cada nación tiene sus propias leyes y regulaciones en materia de terapias génicas y salud. Sin embargo, a nivel regional, existen marcos normativos y directrices que podrían ser considerados. En Colombia la resolución número 2950 de 2019⁴³ describe los requisitos y procedimientos para la evaluación farmacológica y farmacéutica de los medicamentos de origen biológico.

Finalmente, una de las perspectivas a futuro más interesantes en este campo es el uso de bacterias para liberar agentes terapéuticos directamente en el tumor. Estas bacterias pueden ser programadas genéticamente para producir y liberar moléculas específicas, como enzimas, toxinas o medicamentos, dentro del entorno tumoral. Esto permite una entrega precisa y localizada de terapias al tumor, minimizando los efectos secundarios en los tejidos sanos circundantes. Otra perspectiva prometedora, es el uso de bacterias modificadas para estimular la respuesta inmune contra el cáncer. Algunas bacterias pueden ser diseñadas para producir

proteínas que activan el sistema inmunológico, lo que a su vez desencadena una respuesta inmune más robusta contra las células cancerosas. Esto podría mejorar la eficacia de la inmunoterapia, que es un enfoque terapéutico emergente en el tratamiento del cáncer.

Sin duda alguna, es necesario considerar de qué manera se comunica esta terapia a la sociedad y cómo se abordarían las preocupaciones, mitos y temores potenciales asociados con la manipulación genética y el uso de bacterias vivas en el tratamiento del cáncer para generar aceptación pública, impactando así en la calidad de vida, sin tantos efectos secundarios, con una duración del tratamiento menos intensiva y con implicaciones a largo plazo favorables. Evidentemente, eso representará cambios en el panorama del tratamiento del cáncer y en la medicina.

8. Conclusiones

Hasta el momento, entre todas las opciones disponibles, la terapia contra el cáncer mediada por bacterias anaerobias y la inmunoterapia exhiben resultados alentadores debido a que se ha evidenciado que las bacterias tienen una capacidad relevante y apropiada en la erradicación de tumores establecidos que se encuentran en modelos animales. Sin embargo, dado que el cáncer es una enfermedad multifactorial, ninguna terapia única es completamente adecuada para su tratamiento. En este sentido, se sugiere que estas terapias sean coadyuvantes o neoadyuvantes de las terapias convencionales para así obtener mejor respuesta terapéutica y minimizar los efectos secundarios.

En consecuencia, es probable que la combinación de tecnología de ADN recombinante junto con inmunoterapia aplicada a dichos microorganismos funcione como base para las estrategias terapéuticas multimodales contra el cáncer. No obstante, es importante destacar que la escasez para monitorizar los eventos posteriores a la administración del vector a los pacientes representa un obstáculo para la progresión clínica a menos que las terapias contra el cáncer basadas en bacterias puedan recibir un impulso significativo que se tomará en consideración para propósitos científicos concretos, sobre todo en lo que se refiere a los campos de la investigación biológica, biotecnológica y biomédica.

En perspectiva futura, las posibilidades de mejora en la eficacia del tratamiento del cáncer están intrínsecamente vinculadas a la continua investigación y desarrollo de enfoques terapéuticos más precisos y personalizados. La colaboración entre disciplinas médicas y avances tecnológicos podrían allanar el camino hacia una nueva era en la lucha contra el cáncer.

9. Bibliografía

1. World Health Organization. Global Cancer Observatory [Internet]. France; 2020 [25 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>
2. Ministerio de Salud y Protección Social. Cáncer [Internet]. Colombia [25 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PENT/Paginas/Prevenciondel-cancer.aspx#:~:text=El%20c%C3%A1ncer%20es%20considerado%20un,Colombia%20por%20causa%20del%20c%C3%A1ncer.>

3. Lee C. Engineering bacteria toward tumor targeting for cancer treatment: current state and perspectives. *Applied Microbiology & Biotechnology* 2012;93(2):517-523.
4. Yu B, Yang M, et al. Explicit hypoxia targeting with tumor suppression by creating an "obligate" anaerobic *Salmonella Typhimurium* strain. *Sci Rep.* 2012;2:436. doi: 10.1038/srep00436. Epub 2012 Jun 1. PMID: 22666539; PMCID: PMC3365283.
5. Cronin M, Stanton RM, Francis KP, Tangney M. Bacterial vectors for imaging and cancer gene therapy: a review. *Cancer Gene Ther* 2012;19(11):731-740.
6. Gao Z, McClane BA. Use of *Clostridium perfringens* Enterotoxin and the Enterotoxin Receptor-Binding Domain (C-CPE) for Cancer Treatment: Opportunities and Challenges. *Journal of Toxicology* 2012 Jan 01,;2012:981626-9.
7. Sánchez C, Médico Veterinario C, Biomédicas. Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: fisiopatología del cáncer knowing and understanding the cancer cell: physiopathology of cancer.
8. Ji P, An B, Jie Z, Wang L, Qiu S, Ge C, et al. Genetically engineered probiotics as catalytic glucose depriver for tumor starvation therapy. *Materials today bio* 2023 Feb 01,;18:100515.
9. Lee CH, et al. *Salmonella* induce autophagy in melanoma by the downregulation of AKT/mTOR pathway. *Gene Ther.* 2014 Mar;21(3):309-16. doi: 10.1038/gt.2013.86. Epub 2014 Jan 23. PMID: 24451116.

10. Muñoz, MG. Estudio de la ruta de señalización celular de PI3K-AK-mTOR en los carcinomas epidermoides nasosinusales. Universidad de Oviedo. Instituto Universitario de Oncología.2018
11. Osswald A, Sun Z, Grimm V, Ampem G, Riegel K, Westendorf AM, et al. Three-dimensional tumor spheroids for in vitro analysis of bacteria as gene delivery vectors in tumor therapy. *Microb Cell Fact* 2015;14(1).
12. Felgner S, Dino Kocijancic, Michael Frahm, Siegfried Weiss. "Bacteria in Cancer Therapy: Renaissance of an Old Concept", *International Journal of Microbiology*, vol. 2016, Article ID 8451728, 14 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8451728>
13. Nguyen, V. H., & Min, J.-J. *Salmonella*-Mediated Cancer Therapy: Roles and Potential. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2016; 51(2), 118–126. doi:10.1007/s13139-016-0415-z
14. Pérez-Cabeza De Vaca R, Cárdenas-Cárdenas E, Mondragón-Terán P, Argentina A, Solís E, Mondragón-Terán P. Biología molecular del cáncer y las nuevas herramientas en oncología. *Rev Esp Méd Quir* 2017;22:171.
15. Felgner S, Pawar V, Kocijancic D, Erhardt M, Weiss S. Tumour-targeting bacteria-based cancer therapies for increased specificity and improved outcome. *Microbial Biotechnology* 2017 09;10(5):1074-1078.
16. Guerra González A, Silva E, Montero S, Rodríguez DJ, Mansilla R, Nieto Villar JM. Metástasis: un hito para el conocimiento, un reto para la ciencia. *Rev Cubana Med* 2020;59(1).

17. López MM, Cardona AF. Historia del cáncer y el cáncer en la historia. *Medicina* (Bogotá, Colombia: 1981) 2021 Feb 11,;42(4):528-562.
18. Organización Mundial de la Salud. Cáncer [Internet] [25 de marzo 2023]. Disponible en: https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab_1
19. León Joel, Pareja Arturo. Inmunología del cáncer I: bases moleculares y celulares de la respuesta inmune antitumoral. *Horiz. Med.* [Internet]. 2018 Jul [citado 2023 Oct 03] ; 18(3): 80-89. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-558X2018000300011&lng=es. <http://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2018.v18n3.11>
20. Patyar S, Joshi R, Byrav DS, Prakash A, Medhi B, Das BK. Bacteria in cancer therapy: a novel experimental strategy. *J Biomed Sci.* 2010 Mar 23;17(1):21. doi: 10.1186/1423-0127-17-21. PMID: 20331869; PMCID: PMC2854109.
21. Song, S., Vuai, M.S. & Zhong, M. The role of bacteria in cancer therapy – enemies in the past, but allies at present. *Infect Agents Cancer* 13, 9 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13027-018-0180-y>
22. Sieow BF, Wun KS, Yong WP, Hwang IY, Chang MW. Tweak to Treat: Reprogramming Bacteria for Cancer Treatment. *Trends in Cancer* 2021 - 05;7(5):447.
23. Weerakkody, L.R., & Witharana C. The role of bacterial toxins and spores in cancer therapy. *Life Sci.* 2019 Oct 15;235:116839.
24. Trivanović, D., Pavelić, K., & Peršurić Ž. Fighting Cancer with Bacteria and Their Toxins. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 30;22(23):12980.

25. Yaghoubi, N., Soltani, A., Ghazvini, K., Hassanian, S. M., & Hashemy, S. I. (2019). PD-1/PD-L1 blockade as a novel treatment for colorectal cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 312-318.
26. Fujimoto, D., Uehara, K., Sato, Y., & Haruta, H. (2019). ICI combination therapy for advanced NSCLC: a review. *Journal of Clinical Medicine*, 8(2), 191.
27. Wang, Y., Deng, W., Li, N., Neri, S., Sharma, A., Jiang, W., ... & Zhang, N. (2019). Combining immunotherapy and radiotherapy for cancer treatment: current challenges and future directions. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 185.
28. Orange M, Reuter U, Hobohm U. Coley's Lessons Remembered: Augmenting Mistletoe Therapy. *Integr Cancer Ther*. 2016 Dec;15(4):502-511. doi: 10.1177/1534735416649916. Epub 2016 May 20. PMID: 27207233; PMCID: PMC5739169.
29. Rodríguez, B., Ruiz, E., Romero, L., & Cutuli M. Esporos bacterianos para el tratamiento del cáncer. RCCV. Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. UCM.2012
30. Méndez, C. Toxinas microbianas: aspectos generales y uso potencial como agentes antitumorales. Universidad de la Laguna. Facultad de Ciencias. 2018
31. Penet, MF., Chen, Z., Li, C., Winnard, PT. Jr., Bhujwalla, ZM. Prodrug enzymes and their applications in image-guided therapy of cancer: tracking prodrug enzymes to minimize collateral damage. *Drug Deliv Transl Res*. PMID: 23646292; PMCID: PMC3640600.2012.

32. Ho, C.L. , Tan, H.Q. , Chua, K.J. , Kang, A. , Lim, K.H. , Ling, K.L. , *et al* (2018) Engineered commensal microbes for diet-mediated colorectal-cancer chemoprevention. *Nat Biomed Eng* 2: 27–37.
33. Karjoo, Z., Chen, X., Hatefi, A. Progress and problems with the use of suicide genes for targeted cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 Apr 1;99(Pt A):113-128. doi: 10.1016/j.addr.2015.05.009. PMID: 26004498; PMCID: PMC4758904.
34. Elsevier. Scopus [Internet] [25 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.scopus.com/>
35. Coutermarsh-Ott, S. L., Broadway, K. M., Scharf, B. E., & Allen, I. C. (2017). Effect of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* VNP20009 and VNP20009 with restored chemotaxis on 4T1 mouse mammary carcinoma progression. *Oncotarget*, 8(20), 33601–33613. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16830>
36. National Library of Medicine. Clinicaltrials. [Internet] United States [25 de marzo 2023]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00004988>
37. National Library of Medicine. Clinicaltrials. [Internet] United States [25 de marzo 2023]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02002182>
38. National Library of Medicine. Clinicaltrials. [Internet] United States [25 de marzo 2023]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00623831?tab=table>
39. National Library of Medicine. Clinicaltrials. [Internet] United States [25 de marzo 2023]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT01924689?tab=table>
40. National Library of Medicine. Clinicaltrials. [Internet] United States [25 de marzo 2023]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT00080535?tab=table>

41. Villarreal JJ, Flores López A, Morán Martínez J, Arroyo SM, Betancourt Martínez ND, Villarreal JJ. Criterios de Evaluación en Tumores Sólidos 1.1 (RECIST 1.1) en pacientes con Cáncer Primario y/o Metastásico o Enfermedad Metastásica Recurrente Response Evaluation criteria in Solid Tumors 1.1 (RECIST 1.1) in patients with primary and/or Metastatic Cancer or recurrent Metastatic disease.
42. Olivo-Yepetz Álvaro, Linares-Márquez Pascual, Delgado-Enciso Iván, Morales-Romero Zoylo. La terapia génica en México y España, una aproximación bioética desde la investigación científica. *Rev. Bioética y Derecho* [Internet]. 2021 [citado 2023 Oct 04] ; (53): 117-138. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1886-58872021000300007&lng=es. Epub 21-Nov 2022. <https://dx.doi.org/10.1344/rbd2021.53.34049>.
43. Ministerio de salud y protección social. Resolución número 2950 del 2019. [Internet] Colombia, 2019 [25 de marzo 2023]. Disponible en: https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%20No.%202950%20de%202019.pdf
44. Santos E. Centro de Investigación del Cáncer. Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer CIC-IBMCC(USAL-CSIC). Universidad de Salamanca. [Internet]. España;2017
45. Rodríguez González, Begoña, et al. "Esporos bacterianos para el tratamiento del cáncer." *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, vol. 6, no. 2, July 2012,

pp. 82+. *Gale Academic OneFile*,
link.gale.com/apps/doc/A343754567/AONE?u=googlescholar&sid=bookmark-AONE&xid=75c1536d.