


---

This is the **published version** of the bachelor thesis:

Tejadas Florentino, Lucía. *Disseny d'un teranòstic bacteria basat en Escherichia coli per al carcinoma serós d'alt grau*. Treball de Final de Grau (Universitat Autònoma de Barcelona), 2026 (Microbiologia)

---

This version is available at <https://ddd.uab.cat/record/331792>

under the terms of the  license.


---

This is the **published version** of the bachelor thesis:

Tejadas Florentino, Lucía. *Disseny d'un teranòstic bacteria basat en Escherichia coli per al carcinoma serós d'alt grau*. Treball de Final de Grau (Universitat Autònoma de Barcelona), 2026 (Microbiologia)

---

This version is available at <https://ddd.uab.cat/record/331792>

under the terms of the  license.



Treball de Fi de Grau

# **Disseny d'un teranòstic bacterià basat en *Escherichia coli* per al carcinoma serós d'alt grau**

**Autora:** Lucía Tejadas Florentino

**Grau:** Microbiologia

**Facultat:** Biociències

**Tutora:** Esther Julián Gómez

**Tipologia:** Projecte de Recerca

**Data de lliurament:** 25/05/2026

El càncer d'ovari epitelial, especialment el carcinoma serós d'alt grau (HGSC), és un dels càncers ginecològics amb major mortalitat, principalment a causa de la detecció tardana i l'aparició de resistències a la quimioteràpia. L'ús de bacteris com a agents antitumorals és una estratègia explorada des del segle passat, i les eines de biologia sintètica actuals permeten ampliar-ne el potencial terapèutic.

Aquest treball proposa el disseny d'una soca bacteriana no patogènica capaç de localitzar específicament un subtipus tumoral, permetre'n la detecció no invasiva i modular el microambient tumoral. Per assolir-ho, es planteja una soca més segura que l'original i amb el mòdul de detecció incorporat al cromosoma per garantir estabilitat genètica. Els altres dos mòduls (localització i immunomodulació) es troben en plasmidis, fet que permet adaptar aquesta plataforma teranòstica a diferents patologies modificant únicament els nanoanticossos responsables de la localització i de la modulació immunològica.

En conjunt, aquesta proposta podria contribuir al desenvolupament d'estratègies més específiques, i amb menys efectes secundaris, per al tractament del HGSC, amb potencial d'emprar-se per altres càncers.

**Paraules clau:** Càncer d'ovari; teranòstic; xassís bacterià; *E. coli* Nissle 1917

# Índex

---

<b>1. Introducció</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Antecedents</b> .....	<b>4</b>
<b>3. Hipòtesi i objectius</b> .....	<b>6</b>
<b>3.1 Hipòtesi</b> .....	<b>6</b>
<b>3.2 Objectius</b> .....	<b>6</b>
<b>4. Metodologia</b> .....	<b>7</b>
<b>4.1 Generació d'una soca d'<i>E. coli</i> Nissle 1917 amb delecció de la illa <i>pks</i></b> .....	<b>7</b>
<b>4.2 Disseny i construcció dels mòduls funcionals</b> .....	<b>8</b>
4.2.1 Mòdul de localització tumoral.....	9
4.2.2 Mòdul de detecció .....	11
4.2.3 Mòdul d'immunomodulació .....	13
<b>4.3 Avaluació de la funcionalitat</b> .....	<b>16</b>
4.3.1 Avaluació bacteriana.....	16
4.3.2 Avaluació en models 2D .....	17
4.3.3 Avaluació en models 3D .....	19
<b>5. Pla de treball i cronograma previst</b> .....	<b>21</b>
<b>6. Impacte esperat dels resultats</b> .....	<b>21</b>
<b>7. Implicacions ètiques i de bioseguretat</b> .....	<b>22</b>
<b>8. Pressupost amb justificació de les partides</b> .....	<b>23</b>
<b>9. Bibliografia</b> .....	<b>24</b>

# 1. Introducció

---

El carcinoma serós d'alt grau (HGSC de l'anglès *High Grade Serous Carcinoma*) és la forma més comuna i mortal de càncer d'ovari epitelial.<sup>1</sup> La seva elevada mortalitat es deu principalment al diagnòstic tardà i l'aparició de resistències a la quimioteràpia.<sup>2</sup> Aquest tumor es caracteritza per mutacions al gen supressor de tumors *TP53* (>95%) i per un microambient immunològicament supressor amb infiltració de cèl·lules T reguladores i macròfags M2, entre altres tipus cel·lulars que afavoreixen l'evasió immune i la progressió tumoral.<sup>3,4</sup> Malgrat que la seva incidència global és de l'1,6% (dades de 2022), la taxa de supervivència en cinc anys en estadis avançats es manté entre 30-40%.<sup>5,6</sup> Aquesta realitat evidencia la necessitat de desenvolupar noves eines diagnòstiques i terapèutiques per abordar aquesta patologia.

En aquest context, els teranòstics, plataformes que integren diagnòstic i teràpia, han trobat en els bacteris modificats un vehicle prometedor. La seva capacitat natural per colonitzar tumors, combinada amb les possibilitats que ofereix l'enginyeria genètica per incorporar funcions específiques i controlar-ne l'expressió, els converteixen en candidats idonis per a teràpies dirigides. Tanmateix, fins ara cap aproximació bacteriana ha combinat el direccionament específic a HGSC, l'entrega controlada d'efectors i la monitorització no invasiva en una mateixa plataforma teranòstica.<sup>7</sup>

## 2. Antecedents

---

*Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) és un probiòtic GRAS (*Generally Recognized As Safe*) amb capacitat demostrada per colonitzar microambients tumorals hipòxics, com els del HGSC<sup>8</sup>, i eliminar-se de teixits sans en pocs dies.<sup>9</sup> A més, pot ser administrat de forma oral i creuar el tracte gastrointestinal fins colonitzar metàstasis hepàtiques.<sup>10</sup>

És un bacteri àmpliament emprat com a xassís terapèutic. En ser una subespècie d'*E. coli*, permet aprofitar les tecnologies d'enginyeria genètica desenvolupades per a *E. coli* K12.<sup>11</sup> En tindre el genoma completament seqüenciat, facilita la traçabilitat i l'edició precisa. Açò és especialment rellevant atès que EcN conté una illa de patogenicitat (*pks*) amb colibactina, una genotoxina que pot danyar el DNA i produir mutacions en les cèl·lules del colon.<sup>10</sup>

EcN presenta dos plasmidis críptics no transferibles, pMUT1 i pMUT2. Aquests són plasmidis endògens sense funció coneguda que no aporten cap fenotip específic al bacteri, no són essencials i la seva replicació no suposa una càrrega metabòlica significativa.<sup>12</sup> pMUT1, amb un origen de replicació tipus ColE1, i pMUT2 amb un origen ColE2 i un sistema toxina-antitoxina.<sup>13</sup> Aquests plasmidis s'han emprat en

biotecnologia com a vectors per expressar proteïnes en EcN *in vivo* sense un mètode de manteniment dependent de selecció.<sup>14</sup>

Per al direccionament específic es necessiten dianes accessibles i sobreexpressades en el tumor, MUC16 (CA125) i HE4 compleixen aquests criteris. Són glicoproteïnes presents de forma soluble i en la membrana de les cèl·lules tumorals de HGSC.<sup>15-17</sup> Aquests biomarcadors es troben en més del 90% dels HGSC i s'han desenvolupat mètodes de detecció que els combinen, obtenint millors resultats que per separat.<sup>18,19</sup>

S'han descrit fragments variables de cadena senzilla (scFvs) específics per la regió de membrana de MUC16<sup>16</sup>, però aquests fragments presenten limitacions d'estabilitat i expressió en superfície bacteriana. En canvi, els nanoanticossos (*nanobodies* en anglès, Nb), els fragments d'anticossos funcionals més petits que hi existeixen, ofereixen avantatges significatius per l'expressió i ancoratge en bacteris.<sup>20</sup>

Per a la detecció no invasiva del tumor, cal visualitzar la localització bacteriana. Les vesícules de gas (VG) ho permeten. S'ha aconseguit expressar VG en *E. coli* mitjançant plasmidis, fent possible la detecció de colònies bacterianes en la zona tumoral per ultrasò (US).<sup>21</sup>

Les proteïnes de la família STAT (de l'anglès *Signal Transducer and Activator of Transcription*) són factors de transcripció involucrats en molts processos biològics. Aquests factors es troben inactius al citosol i, en activar-se, poden translocar dins el nucli, on regulen l'expressió gènica. STAT3, té un paper clau en la proliferació cel·lular, supervivència, angiogènesi i modulació de la resposta immune. La seva desregulació s'ha relacionat amb processos oncològics.<sup>22</sup> En HGSC la sobreexpressió de STAT3 està associada a la progressió tumoral i la metastasi.<sup>23</sup> Diversos estudis han demostrat el potencial terapèutic de modular aquesta via en tumors ovàrics.<sup>24</sup>

Una de les principals vies d'activació de STAT3 en el microambient tumoral és la senyalització mediada per la interleucina (IL)-6.<sup>25</sup> La IL-6 és una glicoproteïna que participa en diversos processos fisiològics i patològics, i s'ha relacionat amb diversos càncers, entre ells el càncer d'ovari epitelial, incloent el HGSC.<sup>26</sup> En aquest context, contribueix a la generació d'un microambient tumoral immunosupressor, afavorint la proliferació cel·lular, la resistència a la quimioteràpia i la fugida immunològica.<sup>4</sup> En general, nivells elevats d'IL-6 en el càncer d'ovari epitelial s'han associat amb pitjor pronòstic.<sup>27</sup>

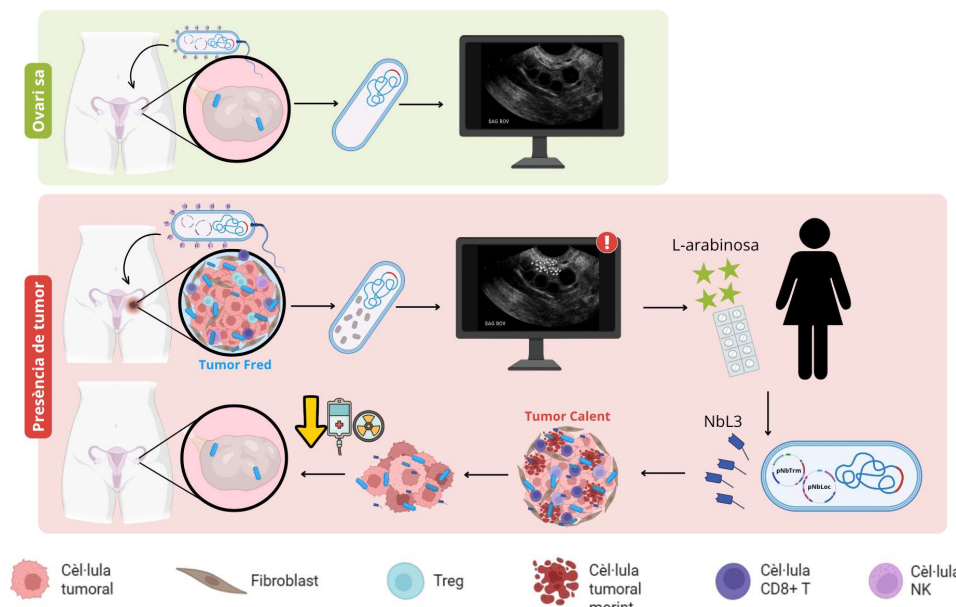
Diverses teràpies s'han dirigit a inhibir aquesta molècula o el seu receptor, principalment amb anticossos monoclonals, que han demostrat eficàcia preclínica i clínica en diversos tumors.<sup>25</sup> Tot i que la expressió tumoral d'IL-6R no és universal en tots els casos de HGSC<sup>28</sup>, la IL-6 pot senyalitzar tant per via clàssica (a través d'IL-6R

de membrana) com per trans-senyalització, en unir-se a IL-6R soluble i activar gp130 en cèl·lules que no expressen IL-6R.<sup>29</sup> Per tant, la via IL-6/STAT3 continua constituint una potencial diana terapèutica en HGSC.

### 3. Hipòtesi i objectius

#### 3.1 Hipòtesi

La utilització d'un sistema teranòstic bacterià permetria la detecció no invasiva del carcinoma serós d'ovari d'alt grau (HGSC). A més, l'expressió local i controlada d'un modulador de l'eix immunosupressor IL-6/STAT3 podria afavorir la reprogramació del microambient tumoral cap a un estat més immunoreactiu, contribuint potencialment a la reducció de la càrrega tumoral.



**Figura 1.** Esquema general de l'objectiu del projecte. A dalt es representa el funcionament del sistema en cas d'ovari sa; baix en presència de tumor. Imatge d'ecografia extreta de Sabouni *et al.* (2022). Figura realitzada amb Biorender i Canva.

#### 3.2 Objectius

L'objectiu principal d'aquest projecte és explorar la viabilitat d'una plataforma teranòstica bacteriana dirigida al HGSC amb funcions diagnòstiques i immunomoduladores. Per assolir aquest objectiu, es plantegen els següents objectius específics:

1. Generar una soca d'EcN amb delecció de la illa de patogenicitat *pks* (productora de colibactina) per millorar el perfil de seguretat del sistema.
2. Dissenyar i construir 3 mòduls funcionals per integrar en EcN:
  - a. Mòdul de localització: expressió de nanoanticossos específics per HE4 i MUC16 ancorats a la superfície bacteriana.

- b. Mòdul de detecció: producció de vesícules de gas per la seva visualització mitjançant US.
  - c. Mòdul d'immunomodulació: expressió d'un nanoanticòs soluble dirigit a la modulació de la senyalització de la IL-6.
3. Avaluar la funcionalitat dels 3 mòduls, tant de manera independent com combinada, i analitzar-ne l'efecte en models 2D i 3D de HGSC.

## 4. Metodologia

---

Els mètodes s'han dissenyat d'acord amb els objectius plantejats, estructurant-se en tres blocs principals: (i) generació d'una soca segura mitjançant la delecció de la illa *pks*, (ii) desenvolupament del mòdul teranòstic, i (iii) validació funcional del sistema en models in vitro.

Un cop desenvolupat cada mòdul es congelaran vials amb els plasmidis i les soques obtingudes per conservar-les. Els encebadors emprats al llarg dels diferents procediments estan recollits a la Taula 1.

### 4.1 Generació d'una soca d'*E. coli* Nissle 1917 amb delecció de la illa *pks*

S'utilitzarà la soca probiòtica *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) (CAT#: LBSX-0522-GF116, Creative Biolabs). La delecció de la illa de patogenicitat *pks* es realitzarà mitjançant recombinació homòloga, emprant el sistema lambda red, Kalantari *et al.* (2023).<sup>30</sup>

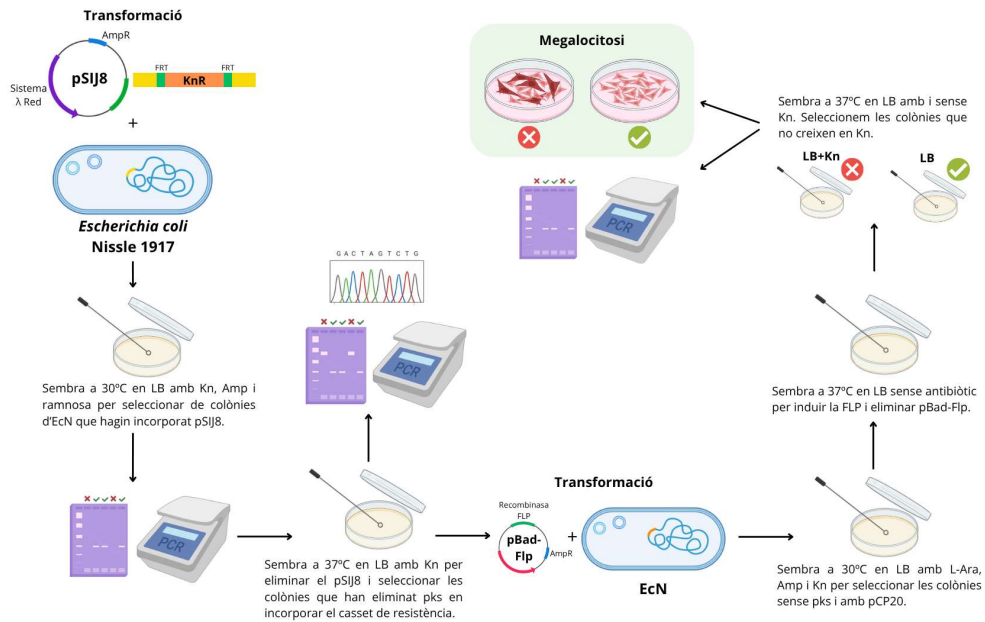
El clúster de la illa *pks* conté 19 gens (*clbA-clbS*; GenBank: CP058217.1). Per a la seva eliminació s'emprarà el plasmidi pKD4 (#45605, Addgene) com a motlle per amplificar per PCR un casset de resistència a kanamicina (Kn) flanquejat per llocs FRT (*flippase recognition target*). Els encebadors contindrien regions d'homologia amb el locus *clb*, generant així el fragment  $\Delta pks$ .

Aquest fragment contindria el gen de resistència a Kn, flanquejat per llocs FRT, permetent la selecció de les colònies recombinants i la posterior eliminació del marcador de resistència. El fragment  $\Delta pks$  es transformaria en cèl·lules d'EcN, transformades prèviament amb el plasmidi pSIJ8 (#68122, Addgene), el qual expressa la maquinària necessària per al funcionament del sistema  $\lambda$  Red sota un promotor induïble amb ramnosa i té un origen de replicació (OriV) termosensible.

A la figura 2 es pot observar el flux de treball que es seguirà per la substitució de *pks* i la posterior eliminació de la resistència a Kn mitjançant el plasmidi pBad-Flp

(#122969, Addgene) amb OriV termosensible, gen de resistència a ampicil·lina i expressió de la recombinasa flp sota un promotor induïble per arabinosa.

Per confirmar la pèrdua de l'activitat genotòxica associada a la colibactina, es realitzarà un assaig de megalocitosi en cèl·lules HeLa (Cat.No.T8969, Applied Biological Materials Inc.), García *et al.* (2016) i Bossuet-Greif *et al.* (2017).<sup>31,32</sup>



**Figura 2.** Esquema general dels passos a seguir per la selecció de la illa de patogenicitat *pks* i la posterior confirmació de la delecció. Figura realitzada amb Biorender i Canva.

## 4.2 Disseny i construcció dels mòduls funcionals

Un cop obtinguda la soca EcN  $\Delta pks$ , eliminarem els dos plasmidis críptics pMUT1 (GenBank: CP058218.1) i pMUT2 (GenBank: CP058219.1) presents en EcN, per després introduir els nostres plasmidis modificats. Evitarem així la pèrdua dels plasmidis modificats per exclusió amb els naturals, i assegurarem la seva permanència en ser derivats dels plasmidis críptics que es mantenen de forma natural en EcN i no afecten negativament a l'hoste.

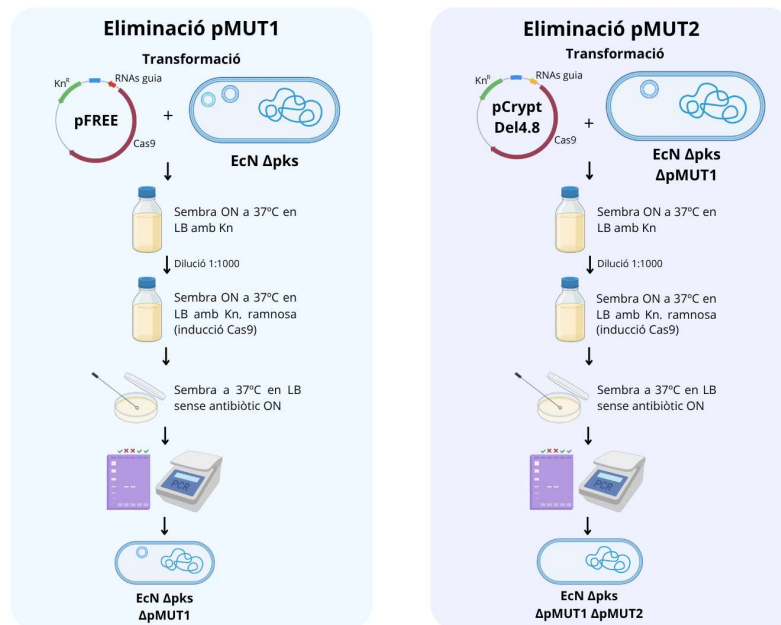
Per eliminar els dos plasmidis críptics, emprarem el sistema CRISPR/Cas9 que ha demostrat ser més ràpid per eliminar-los que el sistema tradicional d'exclusió plasmídica. Seguirem la metodologia de Kan *et al.* (2021), que varen descriure que el més eficient és emprar un plasmidi diferent per eliminar cada un dels críptics, pFREE per al pMUT1 i pCryptDel4.8 per al pMUT2.<sup>14</sup>

Primer s'introduirà el plasmidi pFREE (#92050, Addgene) en EcN electrocompetents per eliminar pMUT1. Aquest plasmidi conté la proteïna Cas9 i 4 RNAs guia dirigits a dos llocs a dos orígens de replicació, Cole1 (origen de replicació de pMUT1) i pSC101, per tallar i curar els plasmidis amb aquests orígens. A més, pFREE conté un origen de

replicació derivat del ColE1, per tant, es cura a sí mateix durant el procés de curació de pMUT1 (Figura 3).

Posteriorment, s'introduirà el plasmidi pCryptDel4.8 (#141293, Addgene) en EcN ΔpMUT1, per eliminar pMUT2. Aquest plasmidi conté la proteïna Cas9 i 4 RNAs guia dirigits a l'origen de replicació ColE1, la relaxasa i la proteïna RelB a pMUT2. pCryptDel4.8 deriva de pFREE, per tant, també es cura a sí mateix durant el procés de curació de pMUT2. El procés serà el mateix que per a pMUT1 (Figura 3).

Finalment es seleccionarà una EcN sense *pks* ni plasmidis críptics (EcN Δ*pks* ΔpMUT1 ΔpMUT2, EcNc) per a la resta de modificacions.



**Figura 3.** Esquema dels passos a seguir per la curació dels plasmidis críptics presents a EcN. Figura realitzada amb Biorender i Canva.

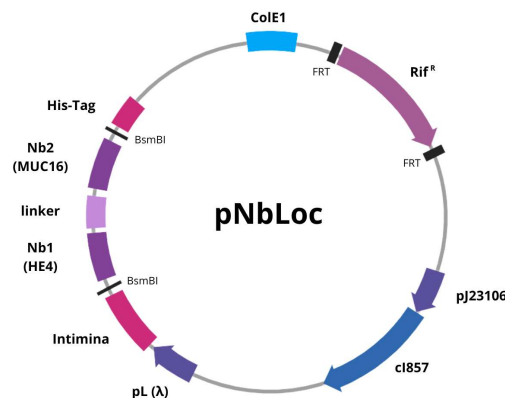
#### 4.2.1 Mòdul de localització tumoral

Per al direccionament específic cap a cèl·lules de HGSC, es dissenyarà un mòdul basat en l'expressió superficial de Nb dirigits contra els marcadors tumorals HE4 i MUC16, ambdós sobreexpressats en aquest subtipus tumoral.<sup>15,16</sup>

Per generar les llibreries es contractarà el servei *VHH library for Nanobody Discovery* (Charles River Laboratories, <https://www.criver.com/products-services/discovery-services/antibody-discovery-services/phage-display/vhh-library-nanobody-discovery?region=3696>). De cada llibreria, per MUC16 i HE4, es seleccionaran els 10 clons amb millor afinitat. Les seqüències es sintetitzaran per G-block (IDT).

Els Nb s'incorporaran al plasmidi pNbLoc per a l'expressió en superfície (Figura 4). Aquest plasmidi es dissenyarà *in silico*. L'esquelet es basarà en el del plasmidi pMUT1, garantint així la seva estabilitat en la EcN modificada.

El casset d'expressió estarà integrat pel promotor pL del fag  $\lambda$ , controlat pel repressor termosensible cI857<sup>33</sup>; seguit d'una proteïna de fusió composta per el fragment N-terminal de la intimina d'EHEC (*Escherichia coli* enterohemorràgica) (residus 1-654) per permetre l'ancoratge a la membrana<sup>34</sup>; un fragment amb dianes de *BsmBI* per permetre assemblatge *Golden Gate* de 2 Nb en tàndem, un per HE4 i altre per MUC16, units per un connector amb 4 Glicines i 2 Serines repetit 9 vegades<sup>35</sup>, i una etiqueta de detecció His a l'extrem C-terminal.<sup>36</sup> El repressor cI857 estarà codificat al plasmidi, i la seva expressió controlada sota un promotor constitutiu mitjà (J23106).<sup>37</sup> A més, el plasmidi inclourà un gen de resistència a rifampicina flanquejat per seqüències FRT que, posteriorment, permetran eliminar la resistència com hem explicat al punt 4.1 amb el plasmidi pBad-Flp. La construcció i optimització de l'ús de codó serà realitzada per el servei extern de síntesi GeneArt (Thermo Fisher).



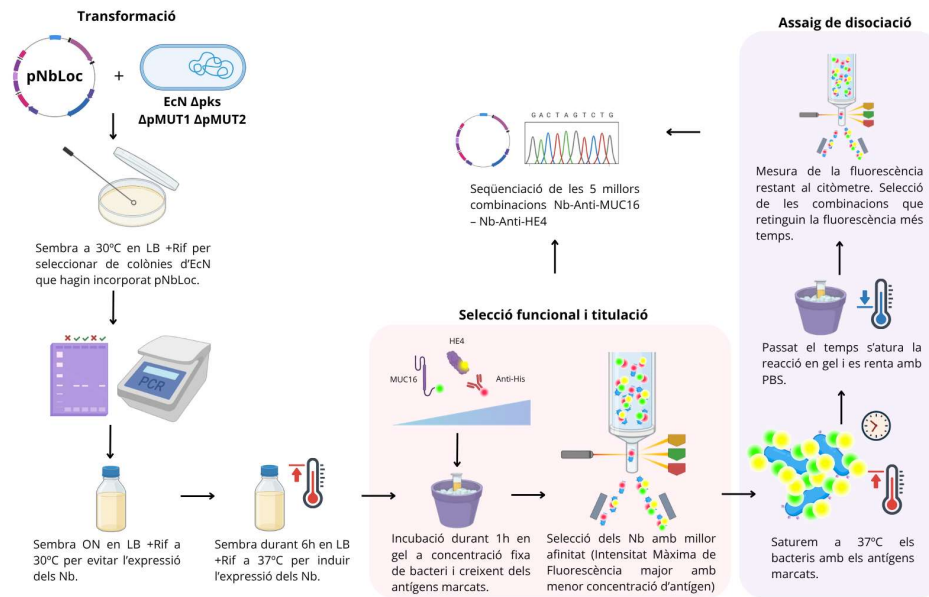
**Figura 4.** Esquema de l'estructura del plasmidi pNbLoc. El casset de resistència a rifampicina s'eliminarà posteriorment. Figura realitzada amb Biorender i Canva.

Mitjançant PCR per extensió i solapament (OE-PCR), s'uniran els dominis anti-HE4 i anti-MUC16 a través d'un connector flexible format per quatre repeticions de glicina-serina ((G4S2)<sub>9</sub>).<sup>35</sup> En una primera etapa, es realitzaran dues PCR independents on s'introduirà la seqüència del connector en els encebadors *reverse* (RV)-anti-HE4 i *forward* (FW)-anti-MUC16 per permetre el solapament posterior. En la segona etapa de la OE-PCR, els encebadors flanquejants contindran dianes de restricció per *BsmBI* als FW de Anti-HE4 i RV de anti-MUC16. Els fragments resultants i el vector receptor seran digerits amb *BsmBI* per la seva lligació.

Un cop introduïts els Nbs units al vector, aquest es transformarà en la EcN sense pks ni plasmidis críptics (EcNc) (Figura 5). La posterior selecció funcional i titulació es realitzarà mitjançant citometria de flux (*Fluorescens-Activated Cell Sorting*, FACS), Xu *et al.* (2015).<sup>38</sup> MUC16 estarà marcat amb FITC-A (Thermo Fisher), HE4 conjugat amb PE-eFluor 610 (Thermo Fisher) i els anticossos Anti-His amb Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher). Les combinacions que tinguessin una Intensitat Mitjana de Fluorescència (MFI) màxima amb menys concentració d'antigen, serien les de millor afinitat.

A continuació es farà un assaig de dissociació on saturarem els bacteris amb els antígens fluorescents durant 1h en gel (Figura 5). Es seleccionaran les combinacions que retenguin la fluorescència durant més temps, ja que seran les més estables i amb millor taxa de dissociació.

Es seleccionaran les cinc millors combinacions en base als resultats de selecció funcional, titulació i assaig de dissociació, es seqüenciaran pel mètode de Sanger i es repetirà el procés per inserir-les al plasmidi.



**Figura 5.** Esquema del flux de treball a seguir per la selecció funcional, titulació i assaig de dissociació dels Nb de la llibreria comercial. Figura realitzada amb Biorender i Canva.

Finalment, es faran diversos assajos per avaluar el temps i temperatura requerits per la inducció del mòdul.

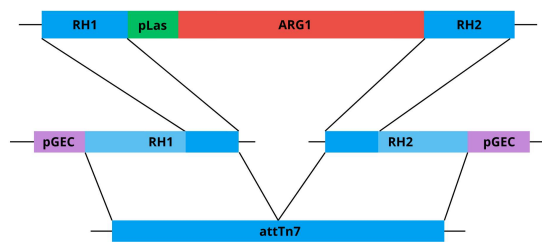
#### 4.2.2 Mòdul de detecció

La detecció bacteriana es basarà en l'expressió de vesícules de gas (VG), que actuaran com a agents de contrast per a la visualització del bacteri mitjançant ultrasò (US). Per implementar el sistema, integrarem al genoma de l'EcNc l'operó sintètic ARG1 (*Acoustic Reporter Gene 1*)<sup>39</sup> sota un promotor induïble per *quòrum sensing* (*LasR/LasI*).<sup>40</sup> La integració cromosòmica es durà a terme al lloc attTn7 present al cromosoma de EcN (*glmS*)<sup>41</sup> seguint el protocol de Seco i Fernández (2021) mitjançant el vector de conjugació pGEC, que demanarem al seu laboratori sota un acord de transferència de material (MTA) (Figura 6).<sup>42</sup>

Primer, l'operó ARG1 s'amplificarà a partir del plasmidi pET28a\_T5-ARG1 (#106476, Addgene) mitjançant PCR de llarg abast per la longitud de l'operó. Els encebadors incorporaran braços d'homologia amb pLasI (BBa\_J64010, iGEM) i part de la regió del cromosoma on s'integrarà el fragment (terminador transcripcional de *glmS*,

*locus\_tag*: HW372\_23840). El promotor l'encarregarem com a G-Block (IDT) i incorporarà els braços d'homologia per l'operó (RV) i el cromosoma (FW). Mitjançant assemblatge de Gibson unirem el promotor pLas a l'operó.

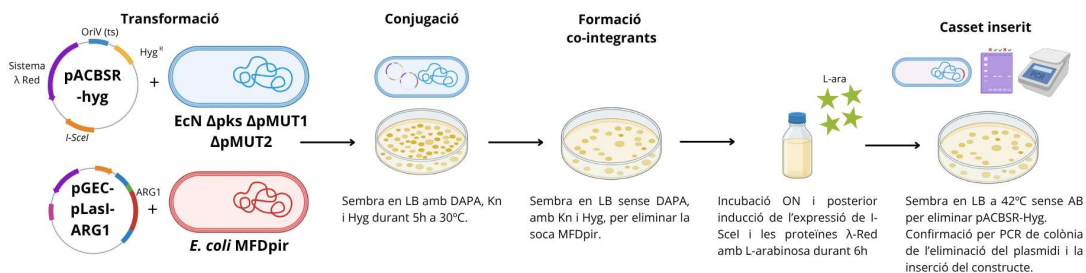
Seguidament s'encarregaran com a gBlock (IDT) dues regions d'homologia (RH) amb el fragment pLas-ARG1 i el cromosoma, de 500pb cadascuna. Els extrems dret de la RH1 i esquerre de la RH2 inclouran seqüències de solapament amb els extrems del pGEC linealitzat (Figura 6). El pGEC linealitzat, les RH i el fragment promotor-operó es barrejaran per generar un constructe mitjançant assemblatge de Gibson. El constructe es comprovarà mitjançant seqüenciació de Sanger.



**Figura 6.** Esquema gràfic sobre l'estructura de l'operó ARG1 i l'homologia amb el plasmidi pGEC i la secció del cromosoma on s'insereix (attTn7). Figura realitzada amb Canva.

El pACBSR-hyg (#87830, Addgene) es transformarà en EcNc per permetre la resolució dels co-integrants en permetre l'expressió de les proteïnes del sistema λ-Red i l'endonucleasa *I-SceI*. El pGEC-pLas1-ARG1 es transformarà en *E. coli* MFDpir (CRBIP19.334, Collection of Institut Pasteur) auxòtrofa per a l'àcid diaminopimèlic (DAPA). Es co-cultivaran MFDpir (donadora) amb EcNc-pACBSR (receptora), aleshores, després de la conjugació, es produirà un primer esdeveniment de recombinació gràcies a les regions d'homologia. Els transconjugants es seleccionaran al torn que eliminarem la soca MFDpir (Figura 7).

Per la resolució de l'esdeveniment de recombinació que es formarà per les RH, s'induirà l'expressió de l'endonucleasa *I-SceI* i les proteïnes λ-Red amb L-arabinosa que produiran un tall al voltant del casset d'inserció integrat, juntament amb el plasmidi, al cromosoma, esdevenint un segon esdeveniment de recombinació.

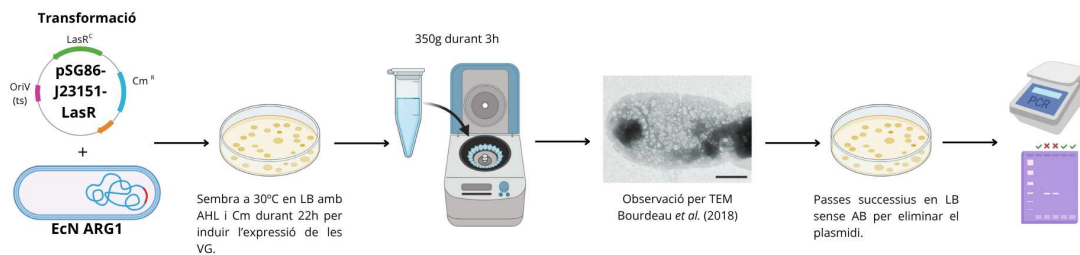


**Figura 7.** Esquema general del procediment per inserir l'operó ARG1. Figura realitzada amb Biorender i Canva.

Finalment, quedarà el casset d'inserció integrat al cromosoma. pACBSR-Hyg s'eliminarà i es faran PCRs de colònia per comprovar la correcta inserció de l'operó amb el promotor i l'eliminació de pACBSR-Hyg (Figura 7).

El plasmidi pSG86-J23151-LasR (#102456, Addgene) es transformarà en els bacteris amb el promotor-fragment correctament inserit (Figura 8). Aquest vector expressa constitutivament LasR, el que permetrà comprovar la correcta expressió del promotor inserit, mitjançant l'addició externa de l'autoinductor 3OC12-HSL (AHL). En centrifugar, els bacteris quedaran a la superfície del sobrenedant per l'expressió de les VG, facilitant el seu aïllament. Les VG es comprovaran per TEM, Bourdeau *et al.* (2018).<sup>39</sup>

Posteriorment es sembraran els bacteris seleccionats en medi LB sense antibiòtic i es faran passes successius per eliminar el pSG86-J23151-LasR. Finalment es farà PCR de colònia per assegurar l'eliminació del plasmidi (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema general sobre el procediment per comprovar el funcionament de les vesícules de gas (VG). Figura realitzada amb Biorender i Canva.

Per permetre la inducció de les VG per densitat poblacional, un cop comprovada la eliminació del pSG86-J23151-LasR, afegirem LasR-LasI seguint el mateix mètode que per al fragment promotor-operó (Figura 7).

Els gens s'amplificaran des dels plasmidis pSG86-J23151-LasR i pLux76-LasI (#73444, Addgene) mitjançant PCR. La regió d'homologia al cromosoma serà el tRNA *argW*, flanquejant la illa genòmica GEI-III (AJ586889).<sup>43</sup>

Un cop comprovada la correcta inserció, es farà créixer el cultiu fins una densitat poblacional que permeti l'expressió de les VG. I com hem mencionat anteriorment, centrifugarem i observarem per microscòpia les VG.

Un cop construïda la soca, es faran assajos per avaluar el temps requerit per la inducció natural.

### 4.2.3 Mòdul d'immunomodulació

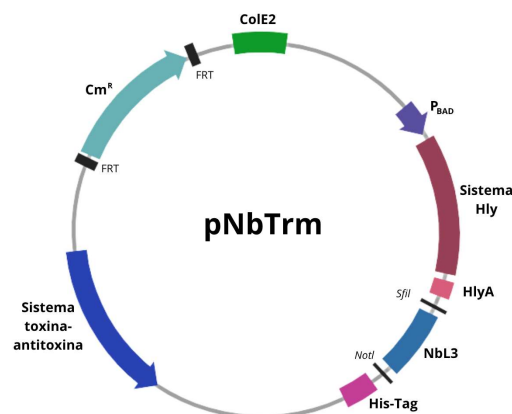
La funció immunomoduladora serà duta a terme per Nbs anti-IL-6 que el bacteri expulsarà al medi extracel·lular. Aquests Nbs estaran codificats, juntament amb el

sistema de secreció tipus I Hly d'*E. coli* a un plasmidi dissenyat *in silico* (pNbTrm, figura 9) i construït per GenArt (ThermoFisher).

L'esquelet del plasmidi serà el pMUT2 d'EcN. Contindrà la seqüència per a la síntesi del sistema Hly, el senyal C-ter d'HlyA seguida d'un *Multiclonning Site* flanquejat per dianes de *SfiI* i *NotI* on inserirem la seqüència del Nb, i una etiqueta His.<sup>44</sup> L'expressió del sistema de secreció i els Nb estarà controlada sota un promotor induïble per L-arabinosa (P<sub>BAD</sub>).<sup>45</sup> El plasmidi WT inclou de forma natural un sistema Toxina-antitoxina que permet la seva permanència, però, afegirem un cassat de resistència a cloramfenicol (Cm) flanquejat per FRT per facilitar la selecció dels clons amb el plasmidi.

Anteriorment Ruano-Gallego *et al.* (2019)<sup>44</sup> demostraren que els Nb secretats pel sistema Hly són plenament funcionals, tot i no passar per periplasma on es formen normalment els ponts de sulfur. Per tant, només haurem de validar la unió de l'antigen al Nb.

El Nb que emprarem serà el NbL3, recentment descrit per Wang *et al.* (2024)<sup>46</sup>, a qui sol·licitarem la seqüència sota un MTA.

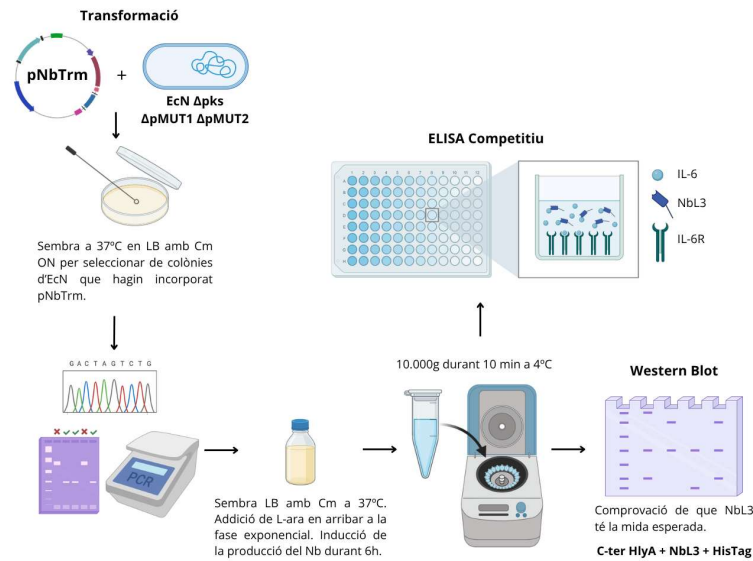


**Figura 9.** Esquema de l'estructura del plasmidi pNbTrm. El cassat de resistència a cloramfenicol s'eliminarà posteriorment. Figura realitzada amb Biorender i Canva.

Primer s'amplificarà la seqüència d'NbL3 per PCR afegint als encebadors dianes per a *SfiI* (FW) i *NotI* (RV). Seguidament, plasmidi i producte de PCR es digeriran amb els enzims, es barrejaran i es farà una lligació convencional.

A continuació, el plasmidi pNbTrm-NbL3 es transformarà en EcNc, posteriorment es farà PCR de colònia i seqüenciació de Sanger per seleccionar els bacteris amb el vector i comprovar la presència de l'insert al plasmidi (Figura 10).

S'induirà l'expressió d'NbL3 en els bacteris seleccionats i després de la centrifugació trobarem al sobrenedant els l'NbL3 amb la seqüència HlyA que permet la seva secreció i amb l'etiqueta His. Es farà un Western Blot del sobrenedant per assegurar la presència del Nb i que té la mida esperada (C-ter-HlyA+Nb).



**Figura 10.** Esquema del procediment general a seguir per la incorporació del mòdul d'immunomodulació i comprovació del funcionament del Nbl3. Figura realitzada amb Biorender i Canva.

Realitzarem ELISA competitiu on unirem el IL-6R a la placa; afegirem barreges de una quantitat fixa de IL-6 amb concentracions creixents de sobrenedant dels bacteris (que contindrà el Nbl3) (Figura 10).<sup>38</sup> Aquest ELISA ens permetrà avaluar si la unió del Nbl3 a la IL-6 impedeix que interaccioni amb el receptor i calcular la concentració necessària de Nbl3 per inhibir el 50% de la unió IL-6/IL-6R (IC<sub>50</sub>). Tanmateix es realitzarà un ELISA per enfrontar IL-6R al Nbl3 i assegurar-nos que no s'uneixen.

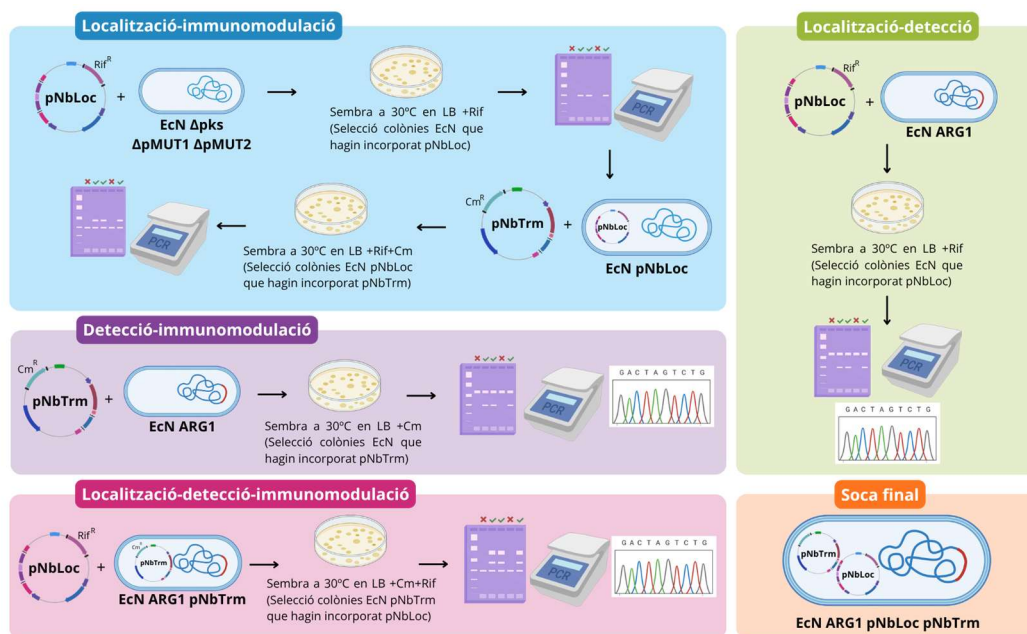
Finalment, es faran assajos per comprovar el temps i quantitat necessària de L-arabinosa per induir l'expressió.

Nom	Seqüència	Referència
<b>Δpks_FW</b>	ATATCTATTGCTCCTTGATAGTTACACAACATTTATTACACGCTTGAGCGAT	Kalantari <i>et al.</i> (2023) <sup>30</sup>
<b>Δpks_RV</b>	TTATCGACGGCTCAGAAGTGTCTAGATTATCCGTGGCGATCTGACATGGGAATTAGCCA	
<b>pAmpR_FW</b>	ATGGTTACGAATTAGTCACT	Addgene
<b>pAmpR_RV</b>	ATAATACCGCGCCACATAGC	
<b>KO_pks_FW</b>	ATATCTATTGCTCCTTGATAGTTACACAACATTTATTACACGCTTGAGCGAT	Kalantari <i>et al.</i> (2023) <sup>30</sup>
<b>KO_pks_RV</b>	CCGCA TTGCATCAGCCATGAT	Kalantari <i>et al.</i> (2023) <sup>30</sup>
<b>ΔKnR_FW</b>	ACGGAATATGAAAATCAATA	CP058217.1
<b>ΔKnR_RV</b>	GCCCCGAAAAATCATCAGTG	
<b>pMUT1_FW</b>	AACTGTGAAGCGATGAACCC	Blum-Oehler <i>et al.</i> (2003) <sup>13</sup>
<b>pMUT1_RV</b>	GGACTGTTCAAGAGGCTATC	
<b>pMUT2_FW</b>	GACCAAGCGATAACCGGATG	
<b>pMUT2_RV</b>	GTGAGATGATGGCCACGATT	
<b>ARG1_FW</b>	AAATTTGCATAAATCTTCACACACAGGAAACCCAGTCTGAG	Addgene
<b>ARG1_RV</b>	ATGACGGTTTGTACATGGAGTTGGCAGGATGTTTATTACAAAAACCCCTCAAGACCC	
<b>pACBSR-hyg_FW</b>	ATGAAAAAGCCTGAACCTACC	
<b>pACBSR-hyg_RV</b>	TATTCCTTTGCCCTCGGACGA	
<b>pSG86-J23151-LasR_FW</b>	ATGGAGAAAAATCACTGG	
<b>pSG86-J23151-LasR_RV</b>	TTACGCCCCGCCCTGCCACT	
<b>LasR_FW</b>	ATGGCCTTGACGGTTTTCTT	
<b>LasR_RV</b>	ATGATTGTTTCAAGATTGGCCGTTAGAGAGTAATAAGACCCA	
<b>LasI_FW</b>	TTAGAGAGTAATAAGACCCAATGATTGTTTCAAGATTGGCCG	
<b>LasI_RV</b>	TTAGGAAACGGCCAGGCGTT	

**Taula 1.** Primers de les PCRs realitzades durant el desenvolupament dels mòduls. El primers que depenen de les seqüències dels Nb i del plasmidi pGEC no es troben a la taula perquè les seqüències s'obtidran posteriorment.

## 4.3 Avaluació de la funcionalitat

Un cop desenvolupats els diferents mòduls i provats per separat, els ajuntarem primer per parelles i finalment els 3 conjuntament (Figura 11). Es seleccionaran quatre soques, les tres parelles i la soca final per avaluar en models 2D i 3D de HGSC.



**Figura 11.** Esquema del procediment general a seguir per al desenvolupament de les soques intermèdies amb 2 mòduls i la soca final amb els 3 mòduls. Figura realitzada amb Biorender i Canva.

### 4.3.1 Avaluació bacteriana

A l'avaluació bacteriana mirarem principalment l'estabilitat plasmídica i l'efecte dels mòduls sobre el creixement bacterià. També farem comprovacions del temps, temperatures i concentracions requerides per la inducció dels mòduls per si la coexistència dels diferents mòduls afecta l'expressió.

#### *Estabilitat plasmídica*

Per avaluar la pèrdua dels plasmidis, farem de 3 a 7 passes en medi sense antibiòtics i després sembrarem en plaques d'LB amb i sense antibiòtics. Mitjançant PCR es comprovarà la presència o absència dels plasmidis. El percentatge de colònies resistents ens servirà per mesurar l'estabilitat plasmídica, Chen *et al.* (2017).<sup>47</sup>

Un cop comprovada la permanència dels plasmidis, les soques es transformaran amb pBAD-Flp i s'eliminarà el cassat de resistència com hem descrit a l'apartat 4.1. Per PCR es comprovarà la correcta eliminació d'ambdós cassats (Rif a pNbLoc i Cm a pNbTrm).

#### *Corba de creixement*

L'assaig de creixement ens permetrà avaluar les corbes de creixement de les diferents soques comparant-les amb la EcN (sense *pks* però amb els plasmidis), Kalantari *et al.*

(2023).<sup>30</sup> La comparació de creixement es durà a terme en condicions que permeten la inducció dels diferents sistemes: presència de 3OC12-HSL per la producció de VG, 37°C per induir l'expressió dels Nb a la superfície bacteriana i L-arabinosa per la producció i secreció de NbL3. També es farà un segon assaig per comparar el creixement en condicions de no inducció, el que permetrà avaluar si l'expressió basal dels sistemes afecta el creixement.

### 4.3.2 Avaluació en models 2D

Comprovada l'expressió dels mòduls, s'avaluarà l'efecte en cultius de cèl·lules tumorals. S'empraran diferents línies tumorals representatives del HGSC i dos línies control, una de càncer ovàric endometroide i altra de teixit sa normal de les trompes de Fal·lopi, ja que s'ha vist que el càncer d'ovari epitelial generalment deriva d'aquest teixit.<sup>48</sup>

<i>Línia</i>	<i>Origen</i>	<i>Proveïdor</i>	<i>Característiques</i>
<b>OVCAR-3</b>	Ascites maligna <sup>49</sup>	HTB-161, ATCC	Adenocarcinoma ovàric validat com a model per a l'estudi de HGSC. <sup>50</sup> Sobreexpressa MUC16 i HE4. <sup>51,52</sup> Resistent a cisplatí i adriamicina. <sup>49</sup>
<b>Caov-3</b>	Tumor primari <sup>53</sup>	HTB-75, ATCC	Adenocarcinoma ovàric validat per a l'estudi de HGSC. <sup>54</sup> Sensible a cisplatí. <sup>55</sup>
<b>KURAMOCHI</b>	Adenocarcinoma serós d'alt grau d'origen metastàtic (ascites) <sup>56</sup>	JCRB0098, JCRB Cell Bank	Validat genòmicament com a HGSC. <sup>54</sup> Mutació no sinònima de TP53. Sensible a cisplatí. <sup>57</sup>
<b>OVS4HO</b>	Adenocarcinoma serós papil·lar d'origen metastàtic abdominal <sup>56</sup>	JCRB1046, JCRB Cell Bank	Validat genòmicament com a HGSC. <sup>54</sup> Mutació sense sentit de TP53. Moderadament resistent a cisplatí. <sup>57</sup>
<b>A2780</b>	Adenocarcinoma endometroide ovàric <sup>58</sup>	Cat.No.T8089, Applied Biological Materials Inc.	Erròniament emprada com a model de HGSC però no presenta les característiques genòmiques del HGSC. Sense mutacions en TP53. <sup>54</sup> Sensible a cisplatí. <sup>59</sup>
<b>hTERT-FNE1</b>	Epiteli columnar simple de les Trompes de Fal·lopi <sup>60</sup>	CRL-3555, ATCC	Cèl·lules epitelials immortalitzades procedents de teixit normal de la trompa de Fal·lopi. Cariotip estable i fenotip no tumoral. <sup>60</sup>

**Taula 2.** Línies cel·lulars humanes per als experiments 2D i 3D.

Es cultivaran les línies cel·lulars per separat en medi Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma) amb 10% FBS a 37°C amb 5% CO<sub>2</sub> fins a un 70-80% de confluència.

El temps d'inducció dels mòduls bacterians dependrà dels resultats anteriors.

#### *Invasió*

Les diferents soques construïdes no han d'internalitzar-se dins les cèl·lules ja que la soca parental és no invasiva i no afegim cap mòdul que permeti la seva internalització. Per assegurar-nos, es farà un assaig de protecció amb gentamicina, Cooper *et al.* (2021).<sup>49</sup>

A l'hora de cultivar les soques per infectar les cèl·lules eucariotes, es mantindran en condicions que permetin la inducció dels mòduls. En centrifugar les soques amb VG, no descartarem el sobrenedant, ja que per la presència de les VG els bacteris es trobaran flotant al sobrenedant.

### *Adhesió*

Per avaluar l'adhesió del bacteri a les cèl·lules tumorals, farem créixer els bacteris en condicions que permetin la inducció dels mòduls fins a una OD<sub>600</sub> de 1, centrifugarem i resuspendrem per obtenir una concentració de 5x10<sup>7</sup> CFUs/mL. Infectarem les cèl·lules eucariotes, sembrades en plaques de 24 pous amb MOI 1, 10 i 50. Per una banda tindrem cèl·lules eucariotes crescudes en la placa directament i per altra cèl·lules crescudes sobre un cobreobjectes estèril per poder observar l'adhesió per microscòpia d'immunofluorescència, Salema *et al.* (2016).<sup>50</sup>

Les cèl·lules crescudes directament a la placa, es rentaran després de 3h d'infecció a 37°C per eliminar els bacteris no units. Després es lisaran les cèl·lules amb Solució Salina Balancejada de Hank (HBSS, Sigma) amb 0'2% d'SDS i 0'1% de DNAsa. Es sembraran dilucions seriades per determinar les CFUs de bacteris units.

Les cèl·lules per microscòpia s'infectaran durant 1'5h a 37°C i després es rentaran. Els cobreobjectes es fixaran amb paraformaldehid, es bloquejaran i s'incubaran durant 1h a temperatura ambient amb PBS+10% solució de sèrum de cabra amb els anticossos primaris: rabbit-anti-E. coli (ab137967, Abcam), mouse-anti-MUC16 (ab272333, Abcam) i mouse-anti-HE4 (5B2D9, Thermo Fisher). A continuació es rentaran molt bé els cobreobjectes i s'incubaran amb PBS+10% solució de sèrum de cabra amb els anticossos secundaris: Goat Anti-Rabbit IgG conjugat amb Alexa Fluor 488 (ab150077, Abcam) per veure de verd les EcN, Goat Anti-Mouse IgG Alexa Fluor 647 (ab150115, Abcam) per veure de vermell MUC16 i HE4 a la membrana de les cèl·lules eucariotes, i DAPI (62248, Thermo Fisher) per marcar el material nuclear. Es rentaran de nou i es posaran els cobreobjectes sobre un portaobjectes després d'aplicar un antidecolorant (Medio de montaje antidecoloración ProLong™ Gold, P36930, Thermo Fisher). Finalment les cèl·lules es miraran amb microscopi confocal al servei de microscòpia.

### *Prolifерació tumoral i bloqueig de IL-6*

La proliferació tumoral i l'efecte dels Nb anti-IL-6 s'avaluaran a partir del mateix cultiu. Es farà un cultiu en transwell (Corning™, 10567522, Fisher Scientific), Zheng *et al.* (2018).<sup>51</sup> Cultivarem les cèl·lules tumorals en la cambra inferior i els bacteris a la superior a diferents concentracions durant 4h en condicions que permetin la inducció

dels mòduls. Els bacteris s'incubaran prèviament en condicions que permetin la inducció dels mòduls fins a una DO<sub>600</sub> de 1.

Passades les 4h la cambra superior amb els bacteris es llevarà en part de les rèpliques i les cèl·lules tumorals s'utilitzaran per fer un Western blot i avaluar l'efecte del Nb-anti-IL-6 sobre la fosforilació d'STAT3 (pSTAT3), Afshari *et al.* (2023).<sup>52</sup> Les cèl·lules eucariotes es lisaran, centrifugaran i el sobrenedant s'afegirà per duplicat a dos gels SDS-PAGE. Cada gel es correrà i les mostres es passaran a una membrana de PVDF. Després de bloquejar les membranes amb BSA, s'incubaran ON a 4°C amb els anticossos primaris contra STAT3 (MA1-13042, Invitrogen), p-STAT3 (740067M, Invitrogen), Bcl2 (13-8800, Invitrogen) i  $\beta$ -actina (MA5-15739, Invitrogen). Després les membranes s'incubaran amb anticossos secundaris Anti-Mouse-IgG conjugats amb HRP (31430, Invitrogen) durant 1h en fosc. Finalment s'emprarà quimioluminescència augmentada (ECL) per detectar les molècules (SuperSignal, 34579, Thermo Fisher), el senyal es digitalitzarà mitjançant ChemiDoc (Bio-Rad) i els resultats s'analitzaran amb el *software* Image Lab (Bio-Rad).

Tant Bcl-2 com  $\beta$ -actina actuaran com a controls. La  $\beta$ -actina actua com a control de càrrega, ja que s'expressa de forma constant en les cèl·lules, permetent així normalitzar els resultats.<sup>53</sup> Bcl-2 és un indicador de la resposta pro-apoptòtica derivada del bloqueig de la via pSTAT3.<sup>54</sup>

La resta de rèpliques es mantindran en co-cultiu durant 24h, s'optimitzarà la concentració cel·lular inicial. Sobre aquests cultius, passat el temps es llevarà la cambra superior i es farà un assaig de *wound healing*, Hatta *et al.* (2023).<sup>55</sup> La infecció es mantindrà més temps ja que els bacteris no entren en contacte directe amb les cèl·lules tumorals; d'aquesta forma avaluarem si el Nb-anti-IL-6 secretat afecta la proliferació tumoral.

### **4.3.3 Avaluació en models 3D**

Per la formació dels esferoïdes de les diferents línies cel·lulars seguirem la tècnica de la gota penjant, Raghavan *et al.* (2015).<sup>56</sup>

#### *Colonització i penetració bacteriana*

Un cop desenvolupats els esferoïdes, es passaran a plaques de 96 pous d'adherència baixa (174927, Thermo Fisher) i es cultivaran amb DMEM+10% FBS, Yang *et al.* (2025).<sup>57</sup> Els bacteris no es tenyiran prèviament i es mantindran en condicions que no indueixin els mòduls abans de la infecció. Un cop infectades les cèl·lules s'induirà el mòdul de localització per permetre l'adhesió del bacteri a les cèl·lules tumorals, i després de 3h s'induirà l'expressió del Nb anti-IL-6 afegint L-arabinosa al medi.

Passades 12h des de l'inici de la infecció els esferoides es rentaran, es fixaran amb paraformaldehid i es prepararan per fer talls amb criòstat. Els talls es marcaran com hem descrit anteriorment en l'avaluació de l'adhesió i s'observaran al microscopi confocal.

Una part dels esferoides infectats es rentaran, trencaran i resuspendran en PBS per sembrar-los i avaluar les CFU dels bacteris intraesferoidals.

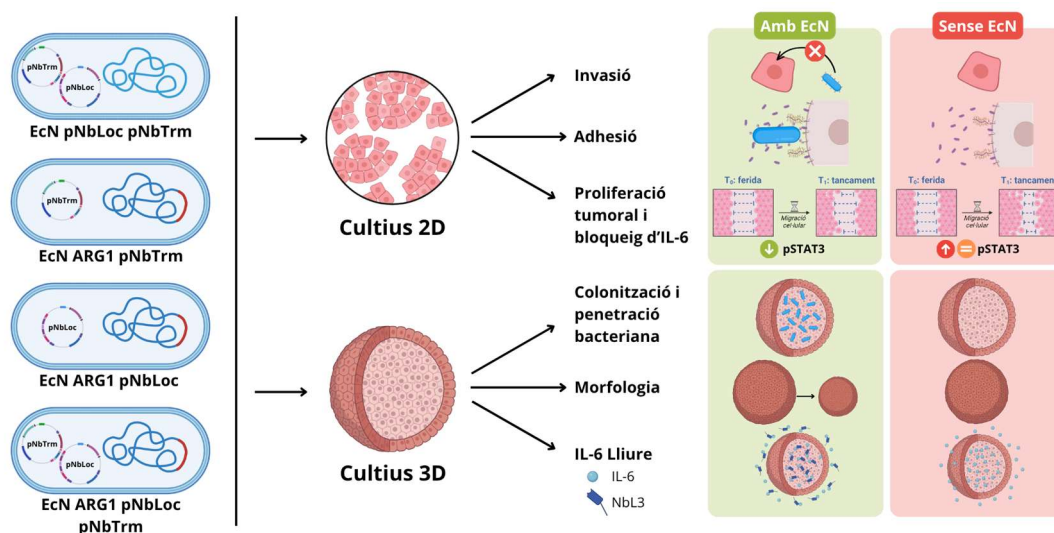
Finalment, visualitzarem els esferoides mitjançant ultrasò, Ito *et al.* (2025).<sup>58</sup> Mantindrem l'esferoide en un tanc amb aigua, DMEM i HEPES-NaOH a 37°C. Aquest ajust permet assegurar la visualització de les VG, en un entorn similar al cos.

### Morfologia

Es farà una observació morfològica dels esferoides mitjançant microscòpia de contrast de fases, Zanoni *et al.* (2016).<sup>59</sup> Aquest mètode ens permet monitoritzar els canvis volumètrics i superficials dels esferoides d'una forma objectiva i reproduïble mitjançant programari d'accés obert per analitzar i prendre les imatges.

### IL-6 lliure

Per una banda, extraurem els sobrenedants dels cultius per mesurar la IL-6 lliure al medi. Per altra, lisarem els esferoides després de diversos rentats per eliminar els possibles restes de medi amb IL-6 que quedaren. Després de lisar els esferoides, els sonicarem amb cura de no trencar els bacteris per no alliberar el Nb-anti-IL-6 que no hagi estat secretat durant el temps de co-cultiu. A continuació, centrifugarem per eliminar les restes cel·lulars i el sobrenedant el tornarem a centrifugar per eliminar les restes bacterianes. En el darrer sobrenedant mesurarem la quantitat de IL-6 lliure dins l'esferoide. La mesura de la quantitat de IL-6 lliure dins i fora de l'esferoide es faria mitjançant ELISA (555220, BD OptEIA™), Pawar *et al.* (2023).<sup>60</sup>



**Figura 12.** Resum de l'avaluació de la funcionalitat en models 2D i 3D. Figura realitzada amb Biorender i Canva.



estadis no supera el 40%.<sup>1,61</sup> Aquest treball ajuda a definir un marc conceptual útil per a futurs estudis preclínic en teràpies bacterianes.

L'impacte social també és notable. L'HGSC representa el 70% de tots els càncers d'ovari i és responsable d'una part important de la mortalitat associada a aquesta malaltia.<sup>1</sup> A més, aproximadament el 70% de les pacients desenvolupen quimioresistència després de la primera línia de tractament, fet que limita molt les opcions terapèutiques.<sup>62</sup> Una eina capaç de detectar presència tumoral i actuar localment podria millorar el pronòstic i reduir la necessitat de tractaments sistèmics repetits i dels seus efectes adversos, impactant positivament en la qualitat de vida de les pacients.<sup>63,64</sup>

Finalment, des d'una perspectiva econòmica, el tractament del càncer d'ovari avançat pot superar els 100.000€ per pacient, i les recaigudes poden incrementar aquesta despesa.<sup>65</sup> Les plataformes bacterianes, en canvi, tenen un cost de producció i adaptació potencialment inferior al d'altres teràpies emergents, com les nanopartícules o les teràpies cel·lulars. A més, la modularitat del sistema facilita la seva reutilització en altres tumors, fet que podria reduir costos de desenvolupament i afavorir la transferència tecnològica.

## **7. Implicacions ètiques i de bioseguretat**

---

Aquest projecte presenta implicacions ètiques relacionades amb la modificació genètica d'*E. coli* Nissle 1917 amb finalitats teranòstiques i l'ús de línies cel·lulars humanes. La manipulació genètica de bacteris planteja qüestions de doble ús, ja que aquestes eines podrien aplicar-se inadecuadament fora de l'àmbit terapèutic. Tot i que les línies cel·lulars no provenen directament de pacients, el seu origen humà implica el compromís d'utilitzar-les exclusivament amb finalitats de recerca biomèdica. A més, per la natura del càncer, només s'empraran línies cel·lulars derivades de dones.

En quant a les implicacions de bioseguretat, el teranòstic bacterià neix d'un bacteri probiòtic, *E. coli* Nissle 1917, modificat genèticament. El bacteri ha estat àmpliament utilitzat en investigacions clíniques i fins i tot s'ha comercialitzat.<sup>11</sup> A més, al projecte millorem el perfil de seguretat en eliminar la illa de patogenicitat *pks*. Les modificacions que es proposen no haurien de causar malaltia ni efectes adversos en el medi ambient, i els plasmidis emprats, tot i comptar amb cassets de resistència, no son mobilitzables i ni transferibles.<sup>14</sup> Aleshores estaria classificat com a organisme modificat genèticament (OMG) tipus I segons la Llei 9/2003.<sup>66</sup>

Es treballarà en un laboratori autoritzat pel Ministeri Espanyol d'Agricultura per les activitats a realitzar amb microorganismes modificats genèticament i línies cel·lulars

BSL-2. Tenim les instal·lacions i equipament adequats, així com procediment i protocols estandarditzats per la correcta manipulació dels agents biològics i maximitzar la protecció tant per la mostra com l'investigador.

Tots els experiments relacionats amb la manipulació de línies cel·lulars i microorganismes (BSL-1 i BSL-2) es duran a terme per personal entrenat autoritzat.

## 8. Pressupost amb justificació de les partides

El projecte es realitzarà a la Unitat de Microbiologia del Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Es compta amb les instal·lacions i equipament necessaris per realitzar el projecte. Es contractaran els serveis de microscòpia i citometria de flux.

En la següent taula es recull el resum de les despeses.

Motiu		Cost (€)
<b>Despeses d'execució</b>		<b>123000</b>
Cultius cel·lulars	Es pressuposta l'import de les 7 línies cel·lulars que s'empraran, medis de cultiu, FBS, antibiòtics, criopreservació i manteniment.	20000
Cultius bacteriològics	Inclou el preu de la soca inicial WT, l'E. coli MFDpir i els components del medi de cultiu on es sembraran.	8000
Reactius immunològics	Inclou els kits d'ELISA, anticossos necessaris, DAPI, reactius d'immunofluorescència i Western blot.	30000
Reactius de biologia molecular	Reactius necessaris per realitzar les PCRs, plasmidis, enzims assemblatge Gibson, seqüenciació Sanger...	25000
Contractació de serveis	Es necessitaran els serveis de GenArt (Thermo Fisher), G-block (IDT), microscòpia i citometria de flux.	20000
Fungible	Es pressuposten els materials que s'empraran com guants, puntes de pipeta, bates, mascaretes, plaques petri, tubs Falcon, flascons pels cultius, plaques d'ELISA...	12000
Fungibles de funcionament	Despeses requerides per al bon funcionament dels incubadors (calibració, bombones de CO2), el canvi de filtres HEPA de les cabines de seguretat biològica...	8000
<b>Inventariable</b>		<b>20000</b>
Sistema ChemiDoc	Pressupost per comprar l'equip.	20000
<b>Despeses de viatges</b>		<b>8000</b>
Congressos	Pressupost per l'assistència a congressos.	8000
<b>Despeses de publicació</b>		<b>8000</b>
Articles	Pressupost per la publicació d'articles científics.	8000
<b>Despeses de personal</b>		<b>245000</b>
Titulat superior (2)	Sou durant els 3 anys de durada del projecte. Aquest projecte suposaria la realització de dos tesis doctorals.	180000
Tècnic de laboratori a temps parcial	Durant els 3 anys de durada del projecte.	65000
<b>TOTAL</b>		<b>404000</b>

## 9. Bibliografia

---

- (1) Kim, J.; Park, E. Y.; Kim, O.; Schilder, J. M.; Coffey, D. M.; Cho, C.-H.; Bast, R. C.; Kim, J.; Park, E. Y.; Kim, O.; Schilder, J. M.; Coffey, D. M.; Cho, C.-H.; Bast, R. C. Cell Origins of High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Cancers* **2018**, *10* (11). <https://doi.org/10.3390/cancers10110433>.
- (2) Shi, Y.; Zhu, S.; Shan, J.; Xu, Y. Disease-Free Survival of 15 Years after Primary Surgery in a Patient with Advanced High-Grade Serous Ovarian Cancer: A Case Report and Literature Review. *Front. Oncol.* **2025**, *15*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2025.1468196>.
- (3) Blanc-Durand, F.; Pautier, P.; Michels, J.; Leary, A. Targeting the Immune Microenvironment in Ovarian Cancer Therapy—Mission Impossible? *ESMO Open* **2024**, *9* (3). <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2024.102936>.
- (4) Amer, H.; Flanagan, K. L.; Kampan, N. C.; Itsiopoulos, C.; Scott, C. L.; Kartikasari, A. E. R.; Plebanski, M. Interleukin-6 Is a Crucial Factor in Shaping the Inflammatory Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer and Determining Its Hot or Cold Nature with Diagnostic and Prognostic Utilities. *Cancers* **2025**, *17* (10). <https://doi.org/10.3390/cancers17101691>.
- (5) Yang, L.; Wang, S.; Zhang, Q.; Pan, Y.; Lv, Y.; Chen, X.; Zuo, Y.; Hao, D. Clinical Significance of the Immune Microenvironment in Ovarian Cancer Patients. *Mol Omics* **2018**, *14* (5), 341–351. <https://doi.org/10.1039/c8mo00128f>.
- (6) Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2024**, *74* (3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>.
- (7) Azizian, K.; Pustokhina, I.; Ghanavati, R.; Hamblin, M. R.; Amini, A.; Kouhsari, E. The Potential Use of Theranostic Bacteria in Cancer. *Journal of Cellular Physiology* **2021**, *236* (6), 4184–4194. <https://doi.org/10.1002/jcp.30152>.
- (8) More, M. H.; Varankar, S. S.; Naik, R. R.; Dhake, R. D.; Ray, P.; Bankar, R. M.; Mali, A. M.; Subbalakshmi, A. R.; Chakraborty, P.; Jolly, M. K.; Bapat, S. A. A Multistep Tumor Growth Model of High-Grade Serous Ovarian Carcinoma Identifies Hypoxia-Associated Signatures. *Cells Tissues Organs* **2024**, *273* (2), 79–95. <https://doi.org/10.1159/000526432>.
- (9) He, L.; Yang, H.; Liu, F.; Chen, Y.; Tang, S.; Ji, W.; Tang, J.; Liu, Z.; Sun, Y.; Hu, S.; Zhang, Y.; Liu, X.; Huang, W.; Ding, X.; Xia, L. Escherichia Coli Nissle 1917 Engineered to Express Tum-5 Can Restrain Murine Melanoma Growth. *Oncotarget* **2017**, *8* (49), 85772–85782. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20486>.
- (10) Liu, Q.; Gai, Y.; Chen, Y.; Lan, X.; Jiang, D.; Liu, Q.; Gai, Y.; Chen, Y.; Lan, X.; Jiang, D. Escherichiacoli Nissle 1917 as a Novel Microrobot for Tumor-Targeted Imaging and Therapy. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081226>.
- (11) Yu, M.; Hu, S.; Tang, B.; Yang, H.; Sun, D. Engineering *Escherichia Coli* Nissle 1917 as a Microbial Chassis for Therapeutic and Industrial Applications. *Biotechnology Advances* **2023**, *67*, 108202. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108202>.
- (12) Sonnenborn, U.; Schulze, J. The Non-Pathogenic *Escherichia Coli* Strain Nissle 1917 – Features of a Versatile Probiotic. *Microbial Ecology in Health and Disease* **2009**, *21* (3–4), 122–158. <https://doi.org/10.3109/08910600903444267>.
- (13) Blum-Oehler, G.; Oswald, S.; Eiteljörge, K.; Sonnenborn, U.; Schulze, J.; Kruis, W.; Hacker, J. Development of Strain-Specific PCR Reactions for the Detection of the Probiotic *Escherichia Coli* Strain Nissle 1917 in Fecal Samples. *Research in Microbiology* **2003**, *154* (1), 59–66. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(02\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(02)00007-4).
- (14) Kan, A.; Gelfat, I.; Emani, S.; Praveschotinunt, P.; Joshi, N. S. Plasmid Vectors for in Vivo Selection-Free Use with the Probiotic *E. Coli* Nissle 1917. *ACS Synth. Biol.* **2021**, *10* (1), 94–106. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00466>.
- (15) Bates, M.; Mohamed, B. M.; Lewis, F.; O’Toole, S.; O’Leary, J. J. Biomarkers in High Grade Serous Ovarian Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2024**, *1879* (6), 189224. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2024.189224>.

- (16) Yeku, O. O.; Rao, T. D.; Laster, I.; Kononenko, A.; Purdon, T. J.; Wang, P.; Cui, Z.; Liu, H.; Brentjens, R. J.; Spriggs, D. Bispecific T-Cell Engaging Antibodies Against MUC16 Demonstrate Efficacy Against Ovarian Cancer in Monotherapy and in Combination With PD-1 and VEGF Inhibition. *Front Immunol* **2021**, *12*, 663379. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.663379>.
- (17) Guo, Y.-X.; Neoh, K. H.; Chang, X.-H.; Sun, Y.; Cheng, H.-Y.; Ye, X.; Ma, R.-Q.; Han, R. P. S.; Cui, H. Diagnostic Value of HE4+ Circulating Tumor Cells in Patients with Suspicious Ovarian Cancer. *Oncotarget* **2018**, *9*(7), 7522–7533. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23943>.
- (18) Dochez, V.; Caillon, H.; Vaucel, E.; Dimet, J.; Winer, N.; Ducarme, G. Biomarkers and Algorithms for Diagnosis of Ovarian Cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a Review. *J Ovarian Res* **2019**, *12*(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0503-7>.
- (19) Govindarajan, M.; Wohlmuth, C.; Waas, M.; Bernardini, M. Q.; Kislinger, T. High-Throughput Approaches for Precision Medicine in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *J Hematol Oncol* **2020**, *13*(1), 134. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00971-6>.
- (20) Asaadi, Y.; Jouneghani, F. F.; Janani, S.; Rahbarizadeh, F. A Comprehensive Comparison between Camelid Nanobodies and Single Chain Variable Fragments. *Biomark Res* **2021**, *9*(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00332-6>.
- (21) Yang, Y.; Wang, Y.; Zeng, F.; Chen, Y.; Chen, Z.; Yan, F. Ultrasound-Visible Engineered Bacteria for Tumor Chemo-Immunotherapy. *CR Med* **2024**, *5*(5). <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2024.101512>.
- (22) Zou, S.; Tong, Q.; Liu, B.; Huang, W.; Tian, Y.; Fu, X. Targeting STAT3 in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer* **2020**, *19*(1), 145. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01258-7>.
- (23) Saini, U.; Suarez, A. A.; Naidu, S.; Wallbillich, J. J.; Bixel, K.; Wanner, R. A.; Bice, J.; Kladney, R. D.; Lester, J.; Karlan, B. Y.; Goodfellow, P. J.; Cohn, D. E.; Selvendiran, K. STAT3/PIAS3 Levels Serve as “Early Signature” Genes in the Development of High-Grade Serous Carcinoma from the Fallopian Tube. *Cancer Res* **2018**, *78*(7), 1739–1750. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1671>.
- (24) Molenda, S.; Sikorska, A.; Florczak, A.; Lorenc, P.; Dams-Kozłowska, H. Oligonucleotide-Based Therapeutics for STAT3 Targeting in Cancer—Drug Carriers Matter. *Cancers* **2023**, *15*(23). <https://doi.org/10.3390/cancers15235647>.
- (25) Johnson, D. E.; O’Keefe, R. A.; Grandis, J. R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 Signalling Axis in Cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **2018**, *15*(4), 234–248. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.8>.
- (26) De Marco, M.; Falco, A.; Festa, M.; Raffone, A.; Sandullo, L.; Rosati, A.; Reppucci, F.; Cammarota, A. L.; Esposito, F.; Matassa, D. S.; Pascale, M.; Salzano, F.; Martinelli, R.; Remondelli, P.; Capunzo, M.; Mollo, A.; Zullo, F.; Travaglino, A.; Guida, M.; Marzullo, L. Different Mechanisms Underlie IL-6 Release in Chemosensitive and Chemoresistant Ovarian Carcinoma Cells. *Am J Cancer Res* **2020**, *10*(8), 2596–2602.
- (27) Wang, Y.; Zong, X.; Mitra, S.; Mitra, A. K.; Matei, D.; Nephew, K. P. IL-6 Mediates Platinum-Induced Enrichment of Ovarian Cancer Stem Cells. *JCI Insight* **2018**, *3*(23). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.122360>.
- (28) Maagdenberg, A. M.; Vledder, A.; Pajjens, S. T.; Plat, A.; Fojier, F.; Nijman, H. W.; de Bruyn, M. IL-6R Expression Is an Independent Prognostic Factor in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *BJC Rep* **2025**, *3*(1), 49. <https://doi.org/10.1038/s44276-025-00139-0>.
- (29) Amer, H.; Kampan, N. C.; Itsiopoulos, C.; Flanagan, K. L.; Scott, C. L.; Kartikasari, A. E. R.; Plebanski, M. Interleukin-6 Modulation in Ovarian Cancer Necessitates a Targeted Strategy: From the Approved to Emerging Therapies. *Cancers (Basel)* **2024**, *16*(24), 4187. <https://doi.org/10.3390/cancers16244187>.
- (30) Kalantari, A.; James, M. J.; Renaud, L. A.; Perreault, M.; Monahan, C. E.; McDonald, M. N.; Hava, D. L.; Isabella, V. M. Robust Performance of a Live Bacterial Therapeutic Chassis Lacking the Colibactin Gene Cluster. *PLoS One* **2023**, *18*(2), e0280499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280499>.
- (31) García, A.; Mannion, A.; Feng, Y.; Madden, C. M.; Bakthavatchalu, V.; Shen, Z.; Ge, Z.; Fox, J. G. Cytotoxic *Escherichia Coli* Strains Encoding Colibactin Colonize Laboratory Mice. *Microbes and Infection* **2016**, *18*(12), 777–786. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.07.005>.

- (32) Bossuet-Greif, N.; Belloy, M.; Boury, M.; Oswald, E.; Nougayrede, J.-P. Protocol for HeLa Cells Infection with *Escherichia Coli* Strains Producing Colibactin and Quantification of the Induced DNA-Damage. *Bio-protocol* **2017**, *7*(16). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2520>.
- (33) Valdez-Cruz, N. A.; Caspeta, L.; Pérez, N. O.; Ramírez, O. T.; Trujillo-Roldán, M. A. Production of Recombinant Proteins in *E. Coli* by the Heat Inducible Expression System Based on the Phage Lambda pL and/or pR Promoters. *Microb Cell Fact* **2010**, *9*(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-18>.
- (34) Salema, V.; Fernández, L. Á. *Escherichia Coli* Surface Display for the Selection of Nanobodies. *Microbial Biotechnology* **2017**, *10*(6), 1468–1484. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12819>.
- (35) van Rosmalen, M.; Krom, M.; Merx, M. Tuning the Flexibility of Glycine-Serine Linkers To Allow Rational Design of Multidomain Proteins. *Biochemistry* **2017**, *56*(50), 6565–6574. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00902>.
- (36) Wilken, H.-C.; Rogge, S.; Götze, O.; Werfel, T.; Zwirner, J. Specific Detection by Flow Cytometry of Histidine-Tagged Ligands Bound to Their Receptors Using a Tag-Specific Monoclonal Antibody. *Journal of Immunological Methods* **1999**, *226*(1), 139–145. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00064-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00064-2).
- (37) *Promoters/Catalog/Anderson* - [parts.igem.org](https://parts.igem.org). <https://parts.igem.org/Promoters/Catalog/Anderson> (accessed 2026-05-02).
- (38) Xu, L.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Zhao, J.; Liu, M.; Guo, M.; Jiang, Y.; Cao, H.; Li, Q.; Ren, G.; Li, D. Bi-Specific Antibodies with High Antigen-Binding Affinity Identified by Flow Cytometry. *International Immunopharmacology* **2015**, *24*(2), 463–473. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.12.011>.
- (39) Bourdeau, R. W.; Lee-Gosselin, A.; Lakshmanan, A.; Farhadi, A.; Kumar, S. R.; Nety, S. P.; Shapiro, M. G. Acoustic Reporter Genes for Noninvasive Imaging of Microorganisms in Mammalian Hosts. *Nature* **2018**, *553*(7686), 86–90. <https://doi.org/10.1038/nature25021>.
- (40) De Baets, J.; Parmentier, I.; De Paepe, B.; De Mey, M. Expanding the Quorum Sensing Toolbox: Promoter Libraries and Hybrid Promoter for Dynamic Genetic Circuits. *New Biotechnology* **2025**, *90*, 97–113. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2025.09.004>.
- (41) Gringauz, E.; Orle, K. A.; Waddell, C. S.; Craig, N. L. Recognition of *Escherichia Coli* attTn7 by Transposon Tn7: Lack of Specific Sequence Requirements at the Point of Tn7 Insertion. *J Bacteriol* **1988**, *170*(6), 2832–2840. <https://doi.org/10.1128/jb.170.6.2832-2840.1988>.
- (42) Seco, E. M.; Fernández, L. Á. Efficient Markerless Integration of Genes in the Chromosome of Probiotic *E. Coli* Nissle 1917 by Bacterial Conjugation. *Microbial Biotechnology* **2022**, *15*(5), 1374–1391. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13967>.
- (43) Grozdanov, L.; Raasch, C.; Schulze, J.; Sonnenborn, U.; Gottschalk, G.; Hacker, J.; Dobrindt, U. Analysis of the Genome Structure of the Nonpathogenic Probiotic *Escherichia Coli* Strain Nissle 1917. *J Bacteriol* **2004**, *186*(16), 5432–5441. <https://doi.org/10.1128/JB.186.16.5432-5441.2004>.
- (44) Ruano-Gallego, D.; Fraile, S.; Gutierrez, C.; Fernández, L. Á. Screening and Purification of Nanobodies from *E. Coli* Culture Supernatants Using the Hemolysin Secretion System. *Microb Cell Fact* **2019**, *18*(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1094-0>.
- (45) Loessner, H.; Endmann, A.; Leschner, S.; Westphal, K.; Rohde, M.; Miloud, T.; Hämmerling, G.; Neuhaus, K.; Weiss, S. Remote Control of Tumour-Targeted *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium by the Use of L-Arabinose as Inducer of Bacterial Gene Expression in Vivo. *Cellular Microbiology* **2007**, *9*(6), 1529–1537. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00890.x>.
- (46) Wang, L.; Dong, J.; Wu, C.; Yan, C.; Bi, C.; Xu, C.; Wu, Y.; Zheng, W.; Ma, X. Development of a Synthetic Library of Humanized Nanobodies for Targeted IL-6 Inhibition. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2024**, *12*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1440150>.
- (47) Chen, S.; Larsson, M.; Robinson, R. C.; Chen, S. L. Direct and Convenient Measurement of Plasmid Stability in Lab and Clinical Isolates of *E. Coli*. *Sci Rep* **2017**, *7*(1), 4788. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05219-x>.
- (48) Shih, I.-M.; Wang, Y.; Wang, T.-L. The Origin of Ovarian Cancer Species and Precancerous Landscape. *Am J Pathol* **2021**, *191*(1), 26–39. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.09.006>.

- (49) Cooper, K. G.; Chong, A.; Kari, L.; Jeffrey, B.; Starr, T.; Martens, C.; McClurg, M.; Posada, V. R.; Laughlin, R. C.; Whitfield-Cargile, C.; Garry Adams, L.; Bryan, L. K.; Little, S. V.; Krath, M.; Lawhon, S. D.; Steele-Mortimer, O. Regulatory Protein HilD Stimulates Salmonella Typhimurium Invasiveness by Promoting Smooth Swimming via the Methyl-Accepting Chemotaxis Protein McpC. *Nat Commun* **2021**, *12* (1), 348. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20558-6>.
- (50) Salema, V.; Mañas, C.; Cerdán, L.; Piñero-Lambea, C.; Marín, E.; Roovers, R. C.; Van Bergen en Henegouwen, P. M. P.; Fernández, L. Á. High Affinity Nanobodies against Human Epidermal Growth Factor Receptor Selected on Cells by E. Coli Display. *MAbs* **2016**, *8* (7), 1286–1301. <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1216742>.
- (51) Zheng, D.-W.; Chen, Y.; Li, Z.-H.; Xu, L.; Li, C.-X.; Li, B.; Fan, J.-X.; Cheng, S.-X.; Zhang, X.-Z. Optically-Controlled Bacterial Metabolite for Cancer Therapy. *Nat Commun* **2018**, *9*, 1680. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03233-9>.
- (52) Afshari, H.; Noori, S.; Zarghi, A. Curcumin Potentiates the Anti-Inflammatory Effects of Tehranolide by Modulating the STAT3/NF-κB Signaling Pathway in Breast and Ovarian Cancer Cell Lines. *Inflammopharmacol* **2023**, *31* (5), 2541–2555. <https://doi.org/10.1007/s10787-023-01281-2>.
- (53) *Beta Actin and GAPDH: Loading Controls in Western Blot | R&D Systems*. <https://www.rndsystems.com/resources/blog/beta-actin-and-gapdh-the-importance-of-loading-controls> (accessed 2026-04-26).
- (54) Saini, U.; Naidu, S.; ElNaggar, A. C.; Bid, H. K.; Wallbillich, J. J.; Bixel, K.; Bolyard, C.; Suarez, A. A.; Kaur, B.; Kuppusamy, P.; Hays, J.; Goodfellow, P. J.; Cohn, D. E.; Selvendiran, K. Elevated STAT3 Expression in Ovarian Cancer Ascites Promotes Invasion and Metastasis: A Potential Therapeutic Target. *Oncogene* **2017**, *36* (2), 168–181. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.197>.
- (55) Hatta, M. N. A.; Mohamad Hanif, E. A.; Chin, S.-F.; Low, T. Y.; Neoh, H. Parvimonas Micra Infection Enhances Proliferation, Wound Healing, and Inflammation of a Colorectal Cancer Cell Line. *Biosci Rep* **2023**, *43* (6), BSR20230609. <https://doi.org/10.1042/BSR20230609>.
- (56) Raghavan, S.; Ward, M. R.; Rowley, K. R.; Wold, R. M.; Takayama, S.; Buckanovich, R. J.; Mehta, G. Formation of Stable Small Cell Number Three-Dimensional Ovarian Cancer Spheroids Using Hanging Drop Arrays for Preclinical Drug Sensitivity Assays. *Gynecol Oncol* **2015**, *138* (1), 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.04.014>.
- (57) Yang, X.; Ning, K.; Feng, L.; Chen, Y.; Xie, Y.; Wang, M.; Yu, L. 3D Cell Spheroid Inoculated with Bacteria: An *in Vitro* Model for Assessing Antimicrobial Efficacy. *Journal of Biotechnology* **2025**, *407*, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2025.08.008>.
- (58) Ito, K.; Iijima, Y.; Misumi, T.; Hayase, G.; Tamura, K.; Ikushima, K.; Yoshino, D. Biochemical State in Tissue Can Be Detected through Ultrasound Signal. *npj Biomed. Innov.* **2025**, *2* (1), 18. <https://doi.org/10.1038/s44385-025-00026-w>.
- (59) Zanoni, M.; Piccinini, F.; Arienti, C.; Zamagni, A.; Santi, S.; Polico, R.; Bevilacqua, A.; Tesei, A. 3D Tumor Spheroid Models for *in Vitro* Therapeutic Screening: A Systematic Approach to Enhance the Biological Relevance of Data Obtained. *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 19103. <https://doi.org/10.1038/srep19103>.
- (60) Pawar, N. R.; Buzza, M. S.; Duru, N.; Strong, A. A.; Antalis, T. M. Matriptase Drives Dissemination of Ovarian Cancer Spheroids by a PAR-2/PI3K/Akt/MMP9 Signaling Axis. *J Cell Biol* **2023**, *222* (11), e202209114. <https://doi.org/10.1083/jcb.202209114>.
- (61) Las\_Cifras\_del\_Cancer\_en\_Espanya\_2026.Pdf. [https://seom.org/images/Las\\_Cifras\\_del\\_Cancer\\_en\\_Espanya\\_2026.pdf](https://seom.org/images/Las_Cifras_del_Cancer_en_Espanya_2026.pdf) (accessed 2026-05-18).
- (62) Li, H.; Sheng, J.-J.; Zheng, S.-A.; Liu, P.-W.; Wu, N.; Zeng, W.-J.; Li, Y.-H.; Wang, J. Platinum-Resistant Ovarian Cancer: From Mechanisms to Treatment Strategies. *Genes & Diseases* **2026**, *13* (2), 101801. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2025.101801>.
- (63) Zoń, A.; Bednarek, I. Cisplatin in Ovarian Cancer Treatment—Known Limitations in Therapy Force New Solutions. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, *24* (8). <https://doi.org/10.3390/ijms24087585>.
- (64) O'Malley, D. M.; Krivak, T. C.; Kabil, N.; Munley, J.; Moore, K. N. PARP Inhibitors in Ovarian Cancer: A Review. *Targ Oncol* **2023**, *18* (4), 471–503. <https://doi.org/10.1007/s11523-023-00970-w>.

- (65) Delgado-Ortega, L.; González-Domínguez, A.; Borrás, J. M.; Oliva-Moreno, J.; González-Haba, E.; Menjón, S.; Pérez, P.; Vicente, D.; Cordero, L.; Jiménez, M.; Simón, S.; Hidalgo-Vega, Á.; Moya-Alarcón, C. The Economic Burden of Disease of Epithelial Ovarian Cancer in Spain: The OvarCost Study. *Eur J Health Econ* **2019**, *20* (1), 135–147. <https://doi.org/10.1007/s10198-018-0986-y>.
- (66) Guía de Utilización Confinada Versión 19 Enero 2024.Pdf. <https://www.miteco.gob.es/content/dam/miteco/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/omg/gu%C3%ADas-y-formularios/Gu%C3%ADa%20de%20utilizaci%C3%B3n%20confinada%20versi%C3%B3n%2019%20enero%202024.pdf> (accessed 2026-05-07).