

**Universidad ORT Uruguay**

**Facultad de Ingeniería**

---

**Caracterización del microbioma de pacientes  
oncológicos respondedores como posible predictor de la  
respuesta a la inmunoterapia**

---

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

**Florencia Peñalba - 232935**

**Tutora: Nadia Riera**

**2023**

## **Declaración de autoría**

Yo, Florencia Belén Peñalba, declaro que el trabajo que se presenta en esa obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el proyecto final de la carrera Ingeniería en Biotecnología;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.

A handwritten signature in black ink, reading 'Florencia Peñalba', written in a cursive style. The signature is centered on the page.

Florencia Peñalba

13 de marzo de 2023

## Agradecimientos

---

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a mi tutora, la doctora Nadia Riera, por su dedicación y apoyo constante durante este trabajo. Por haber siempre respetado mis sugerencias e ideas. Gracias por tu paciencia, confianza y por haberme guiado durante este tiempo.

A mis padres y a mi hermana, por siempre impulsarme a seguir mis sueños, lograr mi mejor versión y enseñarme a nunca darme por vencida. Gracias por su apoyo incondicional y por haber estado presente en cada paso de este largo camino, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

A mis abuelos, por siempre impulsarme a seguir mis sueños, por el apoyo incondicional y sus sabios consejos.

A Euge, mi referencia, mi guía, mi cable a tierra, gracias por transmitirme tranquilidad en los momentos más críticos, por siempre apoyarme y ayudarme. A Jp, por haber sido con Euge el mejor grupo de facultad, por las horas interminables de estudio y trabajo juntos.

A mis amigas, Agus, Maia y Agus por su amistad, por todos estos años juntas y por haber sido parte de todo esto. Gracias por ayudarme a atravesar los momentos más desafiantes.

A mi sub21 (Jose, Agus, Guchi, Magui, Tami y Mica) por siempre impulsarme a seguir, por estar en cada paso y cada logro. Gracias por todas esas prácticas terapéuticas, por sostenerme y contenerme todo este tiempo.

A mis amigos de facultad, por compartir tantos momentos divertidos y a la vez estresantes juntos.

A todo el equipo de LGM, por haberme ayudado cuando lo necesitaba, brindarme sus conocimientos y consejos.

Finalmente, gracias a todas aquellas personas que fueron parte de este proceso.

## Resumen

---

La inmunoterapia ha revolucionado la medicina, específicamente, las terapias que utilizan como blanco los puntos de control inmunológicos (PD-1/PDL-1 y CTLA4) se han convertido en una de los tratamientos más innovadores y prometedores para combatir el cáncer avanzado. El éxito de los inhibidores de los puntos de control inmunitarios (ICIs, por sus siglas en inglés) ha aumentado significativamente las opciones terapéuticas. A pesar de ello, una parte de los pacientes no responde de manera efectiva o experimenta efectos adversos. Se ha identificado recientemente un papel del microbioma intestinal en la respuesta a la inmunoterapia. Uno de los mecanismos subyacentes responsables de la respuesta podría ser la composición del microbioma intestinal. El microbioma intestinal está altamente influenciado tanto por la alimentación como por la región geográfica. Los estudios loco-regionales son fundamentales para identificar patrones relevantes en el desarrollo de nuevas herramientas clínicas. No obstante, se conoce poco acerca de los mecanismos que rigen el microbioma en relación a la respuesta a la inmunoterapia. En este trabajo buscamos caracterizar el microbioma de pacientes respondedores a la inmunoterapia y estudiar la posible relación de aislamientos microbianos contra patógenos intestinales hospitalarios. El microbioma intestinal de pacientes oncológicos respondedores (n=8) se estudió mediante técnicas dependientes de cultivo en condiciones anaeróbicas. Se realizó una caracterización taxonómica de la microbiota de los pacientes mediante secuenciación completa del gen de ARN ribosomal 16s por Oxford Nanopore. Se lograron identificar más de 500 aislamientos bacterianos tras el análisis de las muestras de 8 pacientes. Los resultados incluyen bacterias de los géneros *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia* y *Lactobacillus*. De los aislamientos en placa se aislaron e identificaron diferentes especies con capacidad inhibitoria *in vitro*, entre ellas: *Enterococcus hirae*, *Catenibacterium* y *Clostridium perfringens*. Se utilizó el método de antibiograma disco-placa para evaluar la actividad antimicrobiana contra una bacteria multirresistente, *Klebsiella pneumoniae*. Se seleccionaron cuatro bacterias que presentaron inhibición en placa y fueron testeadas en medio líquido, donde se corroboró su actividad antimicrobiana. A su vez, se predijeron posibles metabolitos implicados en la inhibición, incluyendo; rantipéptidos, lantipéptidos, trepenos, entre otros. El rol del microbioma intestinal en mediar una respuesta exitosa o por el contrario generar toxicidad puede mejorar el pronóstico de pacientes oncológicos avanzados. Estos resultados pueden impulsar el desarrollo de biomarcadores como

nuevas herramientas de predicción de respuesta, así como de potenciales probióticos como intervenciones complementarias.

Palabras clave: **microbiota, puntos de control inmunitario, secuenciación, metabolitos**

## **Abreviaturas:**

°C - Grados Celsius

ADN - ácido desoxirribonucleico

APC - células presentadoras de antígenos

BHI - infusión de corazón y cerebro

CCR - cáncer colorrectal

CD - células dendríticas

CD80 - molécula expresada por múltiples células

CD86 - molécula expresada por múltiples células

CTLA-4 - antígeno citotóxico de linfocito T (del inglés Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4)

EE - enfermedad estable

GF - ratones gnotobióticos

GIT – tracto gastrointestinal (del inglés gastrointestinal tract)

ICI - inhibidores de puntos control inmunitario

Ig - Inmunoglobulina

LB - caldo de lisogenia (del inglés lisogenia broth)

MDSC - células supresoras derivadas de mieloides (del inglés myeloid-derived suppressor cells)

MHC - complejo de histocompatibilidad

mL - Mililitro

NCLSC - cáncer de células no pequeñas de pulmón (del inglés non cell lung small cancer)

NK - células asesinas naturales

NP – péptidos naturales

NRPS - péptidos no ribosomales (del inglés nonribosomal peptide)

ORR - tasa de respuesta objetiva (del inglés objective response rate)

OS - supervivencia promedio (del inglés overall survival)

PAMPS - patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés pathogen-associated molecular patterns)

PD-1 - proteína de muerte celular programada 1

PDL-1 - ligando de proteína de muerte celular programada 1

PE - progresión de la enfermedad

PFS - progresión libre (del inglés progression free-survival)

PKS - policetido sintasa

RC - respuesta completa

RiPP - moléculas de síntesis ribosomal y péptidos modificados

RP - respuesta parcial

SCIFF - péptido de seis cisteínas (del inglés six-cysteine peptide)

SDS - Dodecilsulfato sódico (del inglés Sodium dodecyl sulfate)

SDS-PAGE - Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (del inglés sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis)

TMB - carga mutacional tumoral (del inglés tumor mutational burden)

YCFA - Ácidos grasos de casitona de levadura (del inglés yeast casitone fatty acids)

µg - Microgramo

µL - Microlitro

## Índice

---

1. Introducción.....	14
1.1. Cáncer.....	14
1.2. Sistema Inmune y su relación con el cáncer .....	15
1.3. Inmunoterapia.....	18
1.4. Microbiota intestinal .....	22
1.4.2. Composición y diversidad .....	25
1.4.3. Inmunomodulación .....	26
1.4.3.1. Trasplante de materia fecal. ....	27
1.4.4. Efecto del uso de antibióticos sobre la microbiota .....	28
1.4.5. Biomarcadores de la microbiota intestinal .....	29
1.4.6. Estrategias para estudiar la microbiota intestinal .....	29
1.4.6.1. Secuenciación del ARNr 16S.....	30
1.4.6.2. Metagenómica Shotgun .....	30
1.5. Actividad Antimicrobiana.....	31
1.6. Justificación del Proyecto.....	32
2. Objetivo .....	33
2.1. Objetivo General: .....	33
2.2. Objetivos Específicos .....	33
3. Metodología.....	34
3.1. Primera Parte: Caracterización del microbioma de pacientes respondedores.....	34
3.1.1. Procesamiento de muestras .....	34
3.1.2. Aislamiento de cepas bacterianas a partir de muestras de materia fecal provenientes de pacientes oncológicos respondedores.....	34
3.1.3. Aislamiento sin tratamiento .....	34
3.1.4. Aislamiento con pre-tratamiento con EtOH .....	35

3.1.5. Medios y condiciones de cultivo .....	35
3.1.6. Almacenamiento y conservación de cepas .....	36
3.1.7. Generación de Librerías.....	37
3.1.8. Análisis Filogenético .....	39
3.2. Segunda Parte:.....	40
Caracterización de interacciones inhibitorias o promotoras de crecimiento entre bacterias previamente aisladas del microbioma de pacientes oncológicos y patógenos humanos aislados del intestino.....	40
3.2.1. Microorganismos utilizados en este estudio .....	40
3.2.2. Crecimientos de bacterias inhibidoras .....	41
3.2.3. Generación de sobrenadantes líquidos.....	41
3.2.4. Ensayo de Inhibición: antibiograma disco-placa.....	42
3.2.5. Ensayo de inhibición en medio líquido .....	43
3.2.6. Análisis de la generación de metabolitos.....	44
4. Resultados y Discusión.....	45
4.1. Características y motivo clínico de la población estudiada.....	45
4.2. Selección de pacientes.....	46
4.5. Determinación de la capacidad inhibitoria de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias presentes en la microbiota intestinal. ....	67
4.6. Comparación del cambio de turbidez de un cultivo líquido de <i>K.pneumoniae</i> con y sin sobrenadantes.....	71
4.7. Identificación de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) a partir de gutSMASH. ....	72
4.8. Identificación de péptidos y metabolitos especializados/secundarios con antiSMASH. ....	74
5. Conclusiones:.....	77
6. Referencias Bibliográficas.....	79
7. Anexo.....	90

## Índice de figuras

---

<b>Figura 1.</b> Células principales de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo y sus funciones en respuesta a una célula tumoral (13).....	16
<b>Figura 2.</b> Efectos inhibidores de CTL-4 sobre las actividades antitumorales de las células T. (29).....	20
<b>Figura 3.</b> Efectos inhibidores de las interacciones PD-1/PD-L1 sobre las actividades antitumorales de las células T (29). .....	20
<b>Figura 4.</b> Procedimiento general de la preparación de las muestras de heces sin tratamiento. ....	37
<b>Figura 5.</b> Procedimiento para la generación de sobrenadantes a partir de las bacterias aisladas. ....	42
<b>Figura 6.</b> Ensayo de inhibición. Método de antibiograma en placa.....	43
<b>Figura 7.</b> Swimmer Plot del tratamiento de todos los pacientes. Gráfico elaborado en Rstudio, en el eje vertical los pacientes y en el eje horizontal el tiempo transcurrido desde el diagnóstico en meses. La toma de muestra está señalada con una figura roja. ....	46
<b>Figura 8.</b> Conjunto de subflujos que forman Porefile.....	51
<b>Figura 9.</b> Diagrama de árbol radial de muestras de seis pacientes aisladas en medio BHI suplementado con mucina. El anillo interior indica filos representativos y el anillo exterior representa familias. Las abundancias de phyla son proporcionales al ancho y las abundancias de familias son proporcionales al diámetro (valores en escala de raíz cuadrada). Los colores de las barras corresponden a los barcodes y el largo corresponde al número de reads. ....	53
<b>Figura 10.</b> Árbol Filogenético a nivel de género de bacterias identificadas en medio BHI con mucina.....	55
<b>Figura 11.</b> Diagrama de árbol radial de muestras de seis pacientes aisladas en medio YCFA. El anillo interior indica filos representativos y el anillo exterior representa familias. Las abundancias de phyla son proporcionales al ancho y las abundancias de familias son proporcionales al diámetro (valores en escala de raíz cuadrada). Los colores de las barras corresponden a los barcodes y el largo corresponde al número de reads. ....	55
<b>Figura 12.</b> Árbol Filogenético a nivel de género de bacterias identificadas en medio YCFA 57	
<b>Figura 13.</b> Diagrama de árbol radial de muestras de tres pacientes aisladas en medio BHI suplementado con mucina. El anillo interior indica filos representativos y el anillo exterior representa familias. Las abundancias de phyla son proporcionales al ancho y las abundancias	

de familias son proporcionales al diámetro (valores en escala de raíz cuadrada). Los colores de las barras corresponden a los barcodes y el largo corresponde al número de reads. ....	58
<b>Figura 14.</b> Árbol Filogenético a nivel de género de muestras crecidas en medio LB. ....	58
<b>Figura 15.</b> Clasificación taxonómica a nivel de género de bacterias aisladas con pre-tratamiento con Etanol. ....	61
<b>Figura 16.</b> Clasificación taxonómica nivel de género de bacterias aisladas sin pre-tratamiento con etanol. ....	62
<b>Figura 17.</b> Diagrama de árbol radial de muestras de tres pacientes aisladas pre-tratados con Etanol. El anillo interior indica filos representativos. Las abundancias de phyla son proporcionales al ancho (valores en escala de raíz cuadrada). Los colores de las barras corresponden a los barcodes y el largo corresponde al número de reads. ....	62
<b>Figura 18.</b> Diagrama de árbol radial de muestras de tres pacientes sin tratamiento con Etanol. El anillo interior indica filos representativos. Las abundancias de phyla son proporcionales al ancho (valores en escala de raíz cuadrada). Los colores de las barras corresponden a los barcodes y el largo corresponde al número de reads. ....	63
<b>Figura 19.</b> Árbol filogenético a nivel de especie del paciente P003 de respuesta completa ...	67
<b>Figura 20.</b> Gráfico de barras elaborado en Graphpad Prisma 9 del promedio en cm de los halos de inhibición producidos por los sobrenadantes en un cultivo incorporado con K.Pneumoniae. Ctrl (-): medio LB Ctrl (+): tetraciclina 10g/mL. ....	70
<b>Figura 21.</b> Curva de crecimiento de K.pneumoniae bajo diferentes condiciones.....	72

## Índice de tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Tabla modificada de inhibidores de puntos de control inmunitario aprobados por la FDA.....	21
<b>Tabla 2.</b> Tabla modificada de (36). Impacto del microbioma intestinal en la respuesta o toxicidad de la terapia con ICI en modelos de ratones o pacientes humanos .....	23
<b>Tabla 3.</b> Medios empleados para el aislamiento selectivo de diferentes microorganismos y condiciones de incubación. La condición de anaerobiosis se generó mediante el uso de la cabina de anaerobiosis BACTRON, con una mezcla de gases N <sub>2</sub> 80%, CO <sub>2</sub> 10%, H <sub>2</sub> . .....	35
<b>Tabla 4.</b> Secuencias de primers.....	37
<b>Tabla 5.</b> Programa de PCR.....	38
<b>Tabla 6.</b> Componentes de PCR .....	38
<b>Tabla 7.</b> Programa de PCR.....	39
<b>Tabla 8.</b> Microorganismos aislados y utilizados en la investigación.....	40
<b>Tabla 9.</b> Pacientes respondedores seleccionados para el estudio. RC: Respuesta Completa; EE: Enfermedad Estable; RP: Respuesta Parcial.....	47
<b>Tabla 10.</b> Condiciones de cultivo de las muestras de los pacientes seleccionados.....	49
<b>Tabla 11.</b> Clasificación de bacterias aisladas.....	67
<b>Tabla 12.</b> Resultados de gutSMASH .....	73
<b>Tabla 13.</b> Tabla de metabolitos secundarios producidos por cepas intestinales. ....	75

# 1. Introducción

---

## 1.1. Cáncer

El cáncer es responsable de una de cada ocho muertes en todo el mundo (1). Anualmente, en Uruguay se registran unos 15000 casos nuevos de cáncer y 8000 muertes a causa de esta enfermedad. Alrededor del 25% de las defunciones registradas en 2015 se deben a esta afección, transformándose en la segunda causa de muerte en Uruguay (2). Esta afección comprende más de 100 enfermedades distintas, con diversos factores de riesgo que se originan en la mayoría de los tipos de células y órganos del cuerpo humano. Es una condición médica con bases moleculares que, se caracteriza por la transducción de señales anormales, que conducen a una multiplicación celular incontrolable. Las células cancerosas se destacan por sus mecanismos de resistencia a la muerte celular. La muerte celular en células eucariotas se produce por necrosis o apoptosis (muerte celular programada, genéticamente controlada) (3). La apoptosis es un proceso celular altamente controlado. En el caso de las células tumorales, las aberraciones genéticas inducen la activación de la apoptosis, pero en otros casos, pueden adquirir cambios en genes y proteínas implicados en las vías apoptóticas, permitiendo a dichas células tumorales evadir la apoptosis (4).

Como se señaló anteriormente, es una enfermedad genética celular, por lo que varios genes están involucrados en el desarrollo de la carcinogénesis como son, oncogenes, genes supresores de tumores y genes relacionados con la estabilidad del genoma. Por un lado, los protooncogenes son factores regulatorios de varios procesos biológicos en las células normales, funcionan como factores de crecimiento, transductores de señales celulares y factores de transcripción nuclear. Mutaciones en estos genes, impulsan, por un lado, diferencias en la estructura de proteínas codificadas y desregulación de expresión de proteínas (5). En las células normales, además de los oncogenes, están los genes supresores de tumores que protegen al organismo de la neoplasia, es decir la formación anormal de un tejido de carácter tumoral. La inactivación debido a mutaciones en este gen, conduce al desarrollo de cáncer. Por ejemplo, la mutación de un alelo en una célula puede suprimir la acción de la proteína P53, que codifica para el gen de supresor tumoral P53 (6).

Dentro de las células, múltiples controles del ciclo celular están altamente conservados. Estos controles funcionan como mecanismos de vigilancia del ADN que impiden la acumulación y propagación de errores genéticos durante la división celular. Asimismo, pueden demorar la progresión del ciclo celular o inducir la muerte celular. En el caso de las células cancerosas, mutaciones en estos puntos de control perturban el control del ciclo celular, desencadenando una división constante y excesiva de las células (7).

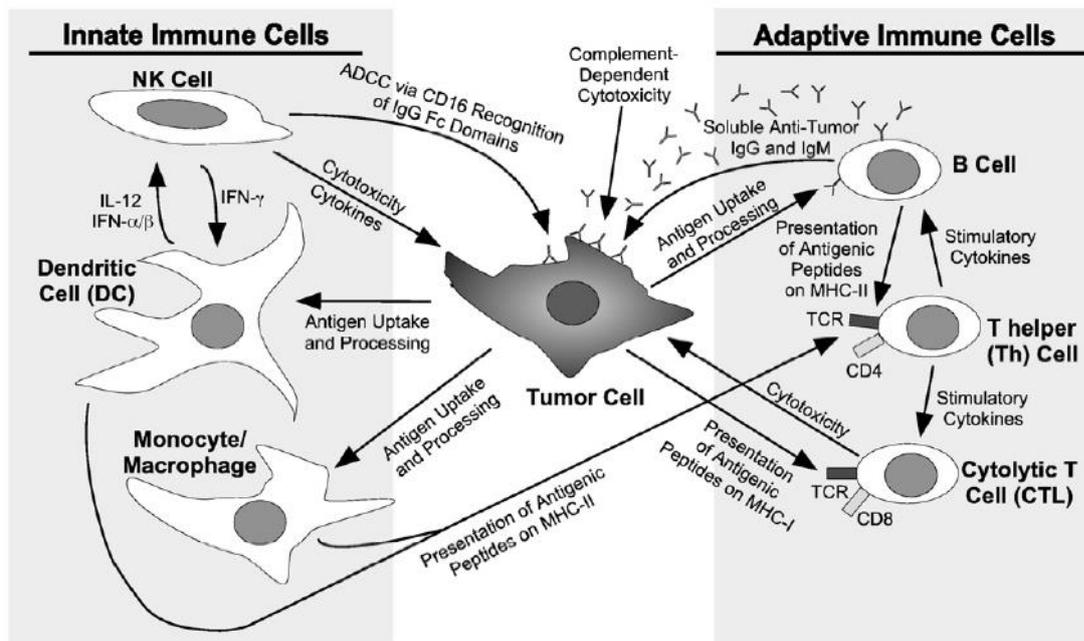
El microambiente tumoral y el sistema inmune también poseen un rol importante en el desarrollo de cáncer. De hecho, es necesario que las células cancerosas superen barreras intrínsecas (autónomas de la célula) y extrínsecas (inmunes) para el desarrollo de una neoplasia completa. El surgimiento de clones de células malignas se debe entonces no solo a la alta inestabilidad genética sino también a la habilidad que poseen de evadir los mecanismos de reconocimiento y destrucción del sistema inmune (8).

## **1.2. Sistema Inmune y su relación con el cáncer**

El sistema inmune está compuesto por células innatas, que median respuestas inmediatas y de corta duración (monocitos, macrófagos, células dendríticas y células asesinas naturales (NK) y células adaptativas que desarrollan respuestas y memoria (linfocitos T y B) (9). Inicialmente, las células del sistema inmune innato desencadenan la respuesta más temprana mediante la liberación de citoquinas, lisando directamente células anormales (células NK) o capturando fragmentos de las mismas (monocitos, macrófagos y células dendríticas) para presentar fragmentos peptídicos de antígenos extraños específicos a las células T en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (10). Por otro lado, las células T y B generan una respuesta específica de antígeno. Las mismas deben proliferar y diferenciarse para generar clones para producir una multitud de células efectoras activadas y competentes. Estos eventos de proliferación y diferenciación son promovidos por citocinas inflamatorias (interferón (IFN)- $\gamma$ , interleucina (IL-12) producidos por las células inmunitarias innatas activadas o células T (11).

La activación de las células T requiere dos eventos: el reconocimiento del antígeno/complejo MHC por el receptor de la célula T y una señal coestimuladora dada por la unión de moléculas presentes en la superficie de la célula presentadora (CD80 y CD86) que se une con la proteína celular de la célula conocida como CD28. La respuesta antitumoral

específicamente se basa en el reconocimiento de antígenos tumorales que pueden ser censados por los componentes del sistema inmune generando una respuesta (12).



**Figura 1.** Células principales de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo y sus funciones en respuesta a una célula tumoral (13)

Las células presentadoras de antígenos (APC) capturan y presentan antígenos tumorales en los complejos de mayor histocompatibilidad (MHC), que luego pueden ser reconocidos por las células T mediante el receptor de células T (TCR). A su vez, las células T reconocen antígenos peptídicos presentados, mediante estos complejos en células tumorales. Este evento de reconocimiento desencadena una cascada de señales que conducen a la proliferación de las células T y a la producción de citoquinas. Por otro lado, es necesaria una segunda señal, que se trata de una señal antígeno inespecífica mediada por receptores activados por ligandos en las células tumorales (14). Estas señales pueden ser co-estimuladores, es decir, aumentan la respuesta T celular, o co-inhibidores, que inhiben la actividad de las células T. El receptor coestimulador prominente es CD28, mientras que PD-1 y CTLA-4 son receptores co-inhibidores. Al unirse a su ligando B7-1 o B7-2 (expuesto por las APC pero no por células tumorales) CD28 se fosforila y recluta quinasas para facilitar la señalización de TCR (15). La molécula, PD-1, presente en las células T es activado por su ligando PD-L1. Esta unión desencadena la fosforilación de PD-1 y el reclutamiento de fosfatasa que resulta finalmente en la inhibición de la respuesta de las células T (16). Entonces, en presencia de la señal

coestimuladora apropiada se obtiene la activación de las células T y en última instancia, la eliminación de las células tumorales.

Aun así, pese a la expresión de antígenos por parte de las células tumorales, el sistema de inmunovigilancia aparentemente falla en la detección y remoción de las mismas. Esto se debe a que las células tumorales poseen la capacidad de escapar y evadir la detección del sistema inmune a través de distintas estrategias establecidas durante su desarrollo, que ya se han convertido en una de las características emergentes del cáncer (17). Algunos tumores poseen la capacidad de evadir el sistema inmune utilizando mecanismos de evasión inmunológica, otros evitan la confrontación con las células efectoras del huésped secretando factores antiinflamatorios e inmunosupresores, y otros inducen la apoptosis de las células efectoras (18). Las células malignas liberan factores solubles, como citocinas inmunosupresoras, prostaglandinas y factor de crecimiento del endotelio vascular, que redirigen las respuestas inmunitarias hacia un entorno favorable para el crecimiento (19).

Las células cancerosas durante su desarrollo pueden activar varios de estos mecanismos de evasión de forma simultánea para “huir” del sistema inmune (20). Dentro de las diversas estrategias de evasión que poseen las células tumorales se destaca la inducción de varios receptores e inhibidores tal como la proteína asociada a linfocitos-T (CTLA-4), la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1), la inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3 (Tim-3), entre otros (21). Mientras que los puntos de control inmunitario se utilizan como freno para restringir la hiperreactividad de las células T y autoinmunidad en células normales, las células tumorales lo utilizan como vía de escape de las células T. Lo que sucede es que, durante la tumor génesis, la desregulación de la expresión de la proteína del punto de control puede resultar en la activación aberrante de los receptores del punto de control, lo que impide que las células T reconozcan y eliminen las células tumor génicas (11).

A los mecanismos de evasión tumoral se suman también la generación de un microambiente tumoral, en donde células inmunosupresoras en conjunto con citoquinas inhibitoras pueden socavar la respuesta inmune. Este microambiente se destaca por una alta tasa de células T reguladoras que son bien conocidas por suprimir la función de las células T efectoras por contacto directo o por secreción de citoquinas inhibitoras, limitando así la inflamación. (22) (23). Se ha observado este fenómeno en varios tipos de cáncer. Por otro lado,

las células mieloides supresoras, son células reguladoras que se ha demostrado que facilitan la evasión tumoral, la metástasis y la angiogénesis. A su vez la síntesis y secreción de quimioquinas (encargadas de reclutar células T reguladoras y MDSCs al sitio del tumor) y del factor transformante de crecimiento beta promueven también un clima inmunosupresor (24)

En consecuencia, un mayor conocimiento del microambiente tumoral y los mecanismos de regulación inmunitaria dieron como resultado el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos para los pacientes.

### **1.3. Inmunoterapia**

Dentro de los muchos desafíos que se observan en la medicina, nada ha presentado un mayor reto que el tratamiento y la cura al cáncer. Aunque el proceso neoplásico ha sido reconocido durante siglos, poco se sabe sobre los mecanismos biológicos de transformación y progresión tumoral hasta el advenimiento de la medicina molecular en la segunda mitad del siglo XX. Los tratamientos iniciales para combatir esta enfermedad radican en tratamientos como la quimioterapia y la radiación ionizante para eliminar la mayor parte de la masa tumoral. Por un lado, se han obtenido resultados prometedores pero la incidencia de recaída es un problema significativo que resulta del desarrollo de mecanismos de resistencia al fármaco en porciones de las células tumorales (13).

En los últimos tiempos se han consagrado varios avances en el campo de la inmunología. Un mejor entendimiento de los mecanismos tanto celulares como moleculares que controlan el sistema inmune han sido los precursores de nuevas, innovadoras y prometedoras terapias contra el cáncer que tienen como objetivo manipular la respuesta inmune. Muchas células del sistema inmune están involucradas en el crecimiento tumoral (25). El éxito de los tratamientos basados en el sistema inmunitario y una mejor comprensión del papel del sistema inmunitario en el desarrollo y la progresión del cáncer han trazado el camino para el desarrollo extensivo de la inmunoterapia.

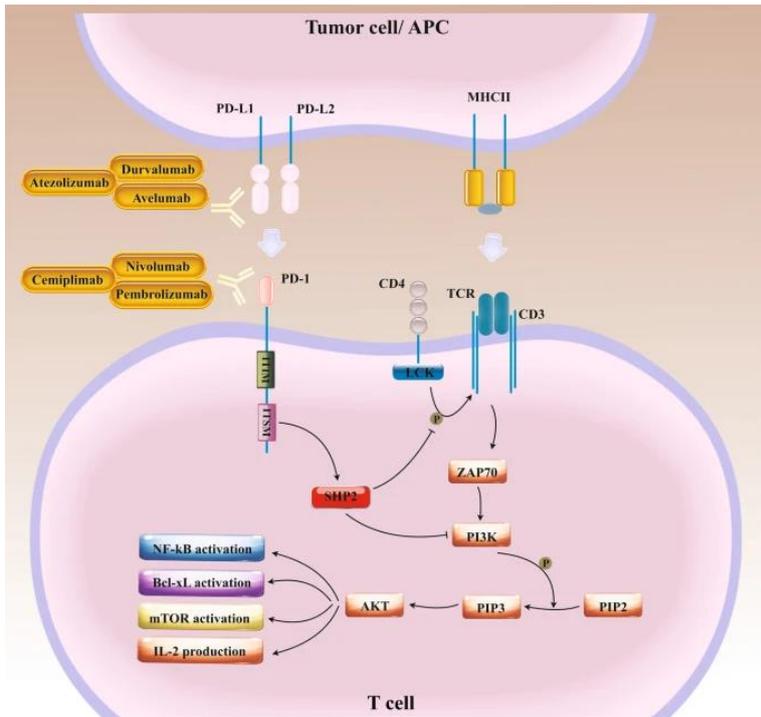
Aunque todos los tratamientos con inmunoterapia se basan en incrementar y modular el propio sistema inmunitario para de esta forma localizar y erradicar el cáncer, hay varios mecanismos de acción, entre los que cabe destacar los siguientes:

- Terapia con vacunas contra el cáncer, se trata de una vacuna terapéutica en la que se combinan antígenos tumorales y agentes que estimulan el sistema inmunitario (adyuvantes).
- Terapia con células dendríticas, consiste en incorporar antígenos tumorales a células dendríticas obtenidas del paciente que luego son reintroducidas en el cuerpo para luchar contra el cáncer.
- Terapia con linfocitos T específicos, en la que se estimulan con antígenos tumorales en un cultivo las células dendríticas y los linfocitos T del propio, para posteriormente ser reintroducidos en el cuerpo para que ataquen al cáncer directamente.
- Terapia con anticuerpos, consiste en el tratamiento con anticuerpos dirigidos contra los antígenos tumorales.

Esta última alternativa se desarrolló gracias a numerosos avances en la producción de hibridomas que proporcionaron las herramientas necesarias para producir de manera eficiente anticuerpos monoclonales altamente específicos.

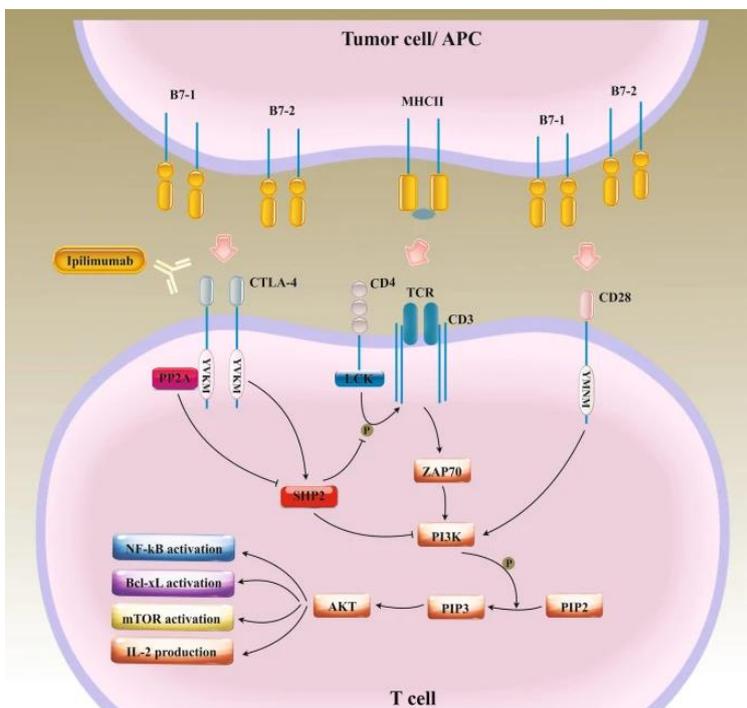
Como se describió anteriormente, la inmunidad mediada por las células T consiste en una red de eventos, caracterizada por una constante interacción entre señales inhibitoras y señales estimuladoras que promueven la respuesta inmune adaptativa contra antígenos foráneos. Las células tumorales poseen la capacidad de expresar estos receptores inhibitoros o activadores presentes en las células normales para evadir el sistema inmune. El objetivo de la estrategia basada en anticuerpos monoclonales es producirlos de manera específica para que se dirijan específicamente a estos receptores o sus respectivos ligandos (26).

En el año 2018 fue otorgado el premio Nobel a los inmunólogos James Allison y Tasuku Honjo por sus trabajos sobre proteínas claves que controlan el sistema inmunológico las cuales se pueden utilizar como posibles blancos en la inmunoterapia. Los dos puntos de control más destacados son CTLA-4, PD-1 y su ligando PD-L1 (24). En el caso de CTLA-4, este receptor es homólogo a la molécula co-estimuladora CD28 y se encuentra en las células T inducidas CTLA-4 interactúa con los mismos ligandos que CD28, pero con mayor afinidad y envía una señal inhibitora. (25). Durante la inmunidad antitumoral CTLA-4 bloquea la activación de las células T al inhibir la interacción entre CD80/CD86 y CD28 y enviar señales inhibitoras que suprimen la activación de las células T (27) (28).



**Figura 2.** Efectos inhibitorios de las interacciones PD-1/PD-L1 sobre las actividades antitumorales de las células T (29).

Al igual que CTLA-4, PD-1 se expresa en las células T activadas y su función es de carácter inhibitorio (29). Se encargan de anular la señalización mediada por el reconocimiento de antígenos por parte de los TCR. PD-1 posee un ligando, PD-L1 que se encuentra en las células tumorales (30).



**Figura 3.** Efectos inhibitorios de CTLA-4 sobre las actividades antitumorales de las células T (29).

Existen estrategias terapéuticas o moléculas terapéuticas para contrarrestar los mecanismos de evasión de las células tumorales. Específicamente los anticuerpos monoclonales dirigidos a los puntos de control inmunitarios han supuesto un gran avance en la terapia tumoral. Entre los inhibidores de puntos de control inmunitarios los inhibidores de PD-1/PD-L1 y CTLA-4 han mostrado resultados terapéuticos alentadores.

Estas terapias se han indicado para diversos tratamientos tumorales, mientras que otros se encuentran en ensayos clínicos. (Tabla 1.)

**Tabla 1.** Tabla modificada de inhibidores de puntos de control inmunitario aprobados por la FDA.

<b>Agente</b>	<b>Blanco IC</b>	<b>Condiciones aprobadas</b>
Ipilimumab	CTLA-4	Melanoma, cáncer colorrectal (CCR), carcinoma renal celular (CRC)
Nivolumab	PD-1	Cáncer colorrectal (CCR), carcinoma hepatocelular (CHC), cáncer de pulmón de células no pequeñas
Pembrolizumab	PD-1	Cáncer cervical, cáncer gástrico, carcinoma celular, carcinoma hepatocelular, linfoma clásico de Hodgking, melanoma, cáncer colorrectal (CCR), Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), Linfoma de células B, cáncer uro rectal.
Cemiplimab	PD-1	Carcinoma cutáneo celular
Atezolizumab	PD-L1	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer uro rectal
Avelumab	PD-L1	Cáncer colorrectal (CCR)
Durvalumab	PD-L1	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer uro rectal

Hasta el momento los anticuerpos monoclonales aprobados son Nivolumab, Cemiplimab y Pembrolizumab que son anticuerpos anti PD-1. Los anticuerpos anti PD-L1 son

Atezolizumab, Avelumab y Durvalumab. Por otro lado, el anticuerpo aprobado para el punto de control CTLA-4 es ipilimumab.

El mayor desafío de este tratamiento son los mecanismos de resistencia que desarrollan algunos pacientes y por desarrollar una combinación efectiva para superar la resistencia. Algunos pacientes son resistentes a este tratamiento o padecen la toxicidad mediada por ICI. Estos aspectos dificultan su aplicación clínica. La tasa de respuesta para los pacientes con melanoma tratados con Pembrolizumab (anti-PD-1) fue sólo del 33 %. Por otro lado, entre el 20-30 % de los pacientes con carcinoma de pulmón experimentaron principalmente los resultados deseados con la terapia de bloqueo de ICI (31).

#### **1.4. Microbiota intestinal**

El intestino humano está compuesto de entre 10-100 millones de comunidades bacterianas incluyendo hongos, levaduras, bacterias, arqueas y virus. A este conjunto de microorganismos que colonizan el tracto gastrointestinal (GIT) se lo denomina microbiota intestinal y comprende una mezcla dinámica de microorganismos, cuya composición cambia a lo largo del tiempo (32). El equilibrio entre los grupos de microorganismos intestinales, microorganismos no patógenos y microorganismos patógenos, es esencial para promover la salud del individuo, acompañado de una alta diversidad microbiana. La abundancia relativa de ciertos tipos de microorganismos y los metabolitos generados por ciertas comunidades bacterianas están asociadas a una microbiota sana.

##### **1.4.1. Relación entre la microbiota y el cáncer**

Actualmente, la microbiota se considera un componente determinante del organismo, puesto que esta interviene en varios procesos entre ellos vinculados a la digestión, neurológicos y de la respuesta inmune (33). El correcto equilibrio de las poblaciones dentro del GIT, permite el correcto desempeño de importantes funciones inmunológicas y metabólicas que ayudan a mantener la homeostasis.

Aunque, el descubrimiento de inmunoterapia significó para el tratamiento del cáncer un antes y un después, la tasa de respuesta a la inmunoterapia es relativamente baja (alrededor del 50 %) y algunos pacientes no logran mantener una respuesta favorable (34). En algunos casos,

los pacientes son resistentes a este tratamiento o padecen la toxicidad mediada por ICI. Estos aspectos dificultan su aplicación clínica. Los datos obtenidos respecto a la respuesta ante este tratamiento mostraron que, la tasa de respuesta para los pacientes con melanoma tratados con Pembrolizumab (anti-PD-1) es sólo del 33 %. Por otro lado, entre el 20-30 % de los pacientes con carcinoma de pulmón experimentaron principalmente los resultados deseados, con la terapia de bloqueo de ICI (31).

Numerosos estudios realizados en pacientes respondedores y no respondedores señalan que la microbiota intestinal adquiere un rol fundamental en la modulación de la respuesta a la inmunoterapia (35–38). Particularmente la microbiota basal de los pacientes oncológicos pueden derivar en una respuesta exitosa, o, por el contrario, generar citotoxicidad. La microbiota evoluciona de forma conjunta con su huésped y establece una fuerte relación mutualista en donde se destaca la producción y modulación de una variedad de metabolitos que impactan profundamente en varias funciones fisiológicas del organismo, entre ellas las vinculadas al sistema inmune.

Dicho esto, la composición, estructura y la función de la microbiota están estrechamente relacionadas con los hábitos alimenticios, el lugar geográfico y la cultura. En la actualidad, los estudios de la relación de la microbiota con la salud, en países desarrollados, están altamente sesgados por estos factores.

El descubrimiento del vínculo entre la microbiota intestinal y la respuesta a la inmunoterapia de inhibidores de puntos de control en melanoma como en otros tumores, resaltó la microbiota intestinal no solo como un biomarcador de respuesta potencial sino como un blanco terapéutico de interés. En la Tabla 2 se pueden observar varias investigaciones que estudiaron el impacto de la composición de la microbiota en la respuesta a la inmunoterapia.

**Tabla 2.** Tabla modificada de (36). Impacto del microbioma intestinal en la respuesta o toxicidad de la terapia con ICI en modelos de ratones o pacientes humanos

<b>Microbioma intestinal involucrado</b>	<b>Modelo de ratón utilizado o pacientes involucrados</b>	<b>Terapia ICIs</b>	<b>Impactos en la respuesta o toxicidad</b>	<b>Referencia</b>
--	---	---------------------	---	-------------------

<i>Bacteroides fragilis</i> <i>Bacteroides</i> <i>thetaiotaomicron</i>	Ratones GF	Anti-CTLA-4 (Ipilimumab)	Aumenta respuesta	Vetizou et al (2015)
<i>Bifidobacterium</i>	Ratones con melanoma	Anti-PD-L1	Demora el crecimiento del tumor	Sivan et al (2015)
<i>A.muciniphila</i> <i>Alistipes</i>	Pacientes NSCLC o RCC	Anti-PD-L1	Mejora la respuesta terapéutica	Routy et al (2018)
<i>Bacteroides caccae</i> <i>Bacteroides</i> <i>thetaiotamicron</i> <i>Dorea</i> <i>formicogenerans</i> <i>Faecalibacterium</i> <i>prausnitzii</i> <i>Holdemanina</i> <i>filiformis</i>	39 pacientes con Melanoma	Ipilimumab, Nivolumab	Respuesta terapéutica efectiva	Frankel et al (2017)
<i>Clostridiales</i> <i>Faecalibacterium</i> <i>Ruminococcaceae</i>	112 pacientes con melanoma	Anti-PD-1	Mejora la respuesta y aumenta la inmunidad antitumoral	Gopalakrish nan et al. (2018)
<i>Bifidobacterium</i> <i>longum</i> <i>Collinsella</i> <i>aerofaciens</i> <i>Enterococcus</i> <i>faecium</i>	42 pacientes con melanoma	Anti-PD-1	Aumenta la respuesta terapéutica y mejora el control tumoral	Matson et al. (2018)
<i>Bacteroides</i>	26 pacientes con melanoma	Anti-CTLA-4 (Ipilimumab)	Disminuye el riesgo de los efectos adversos	Chaput et al (2017)

<i>Faecalibacterium</i> y otros <i>Firmicutes</i>	26 pacientes con melanoma	Anti-CTLA-4 (Ipilimumab)	Mejor la respuesta terapéutica	Chaput et al (2017)
<i>Bacteroidetes</i>	Pacientes con melanoma	Anti-CTLA-4 (Ipilimumab)	Disminuye el riesgo de los efectos adversos	Dubin et al (2016)

### 1.4.2. Composición y diversidad

A lo largo del GIT, se percibe una diferencia marcada en términos de diversidad y números de bacterias (39). Esto se debe a las diversas condiciones generadas por variables como la motilidad del intestino, la concentración de ácidos grasos, sales biliares, secreciones pancreáticas e intestinales. Se calcula que exclusivamente cinco o seis géneros representan el 99% de la biomasa siendo *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Eubacterium* los géneros más presentes en las heces humanas, alrededor del 60%. Por otro lado, los géneros como *Clostridium*, *Enterobacteriaceae* y *Streptococcus* se encuentran en una menor cantidad (40). Específicamente en el colon, se localiza aproximadamente el 70% de todos los microorganismos encontrados en el cuerpo. Esto se debe a que el tránsito de esa zona es lento lo que permite la fermentación de sustratos no digeribles, facilitando así, la colonización de microorganismos (41). Está compuesto básicamente por bacterias anaerobias estrictas o facultativas, como *Bacteroides sp*, *Porphyromonas sp*, *Bifidobacterium sp*, *Lactobacillus sp* y *Clostridium sp*. El predominio de las bacterias anaerobias se debe a la baja concentración de oxígeno en el colon. A su vez, el colon humano alberga algunos patógenos primarios como *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* y *Bacteroides fragilis*, los cuales se encuentran en una baja proporción (0,1% o menos, del total de la microbiota intestinal) (42).

En el caso de pacientes que padecen cáncer, varios son los estudios que se han llevado a cabo para determinar la composición y enriquecimientos de ciertas especies bacterianas. En uno de los estudios metagenómicos más extensos hasta la fecha Routy et al. halló una mayor abundancia relativa de *Akkermansia muciniphila*, *Alistipes sp* y generalmente más *Firmicutes* comparados a los no respondedores. Mientras que, Gopalakrishna et al (36) encontró una mayor abundancia relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* en respondedores comparado a no

respondedores. Asimismo, Matson et al (43) halló que la respuesta en la terapia PD-1 estaba definida por un aumento en la abundancia relativa de un grupo de ocho especies liderado por *Bifidobacterium longum*. Por otro lado, Frankel et al (38) reportaron que la microbiota difería según el tipo de inmunoterapia de inhibidores de puntos de control utilizada pero que en respondedores siempre se presentó un enriquecimiento de *Bacteroides caccae*.

A pesar de que existen pruebas firmes que demuestran una posible asociación entre las bacterias intestinales y la respuesta en estudios con ratones, existe poco consenso, que puede estar asociado a varios factores. Entre ellos, los protocolos de recolección y extracción de ADN, las diferencias en la dieta y el uso de medicamentos entre países, problemas de tamaño de muestra y poder estadístico, variabilidad en las firmas de microbiomas entre los respondedores y señales microbianas que están funcionalmente relacionadas. Los efectos de cohorte que van desde las características específicas de la población hasta las elecciones metodológicas en el procesamiento y análisis de muestras. Utilizar cohortes más grandes y diversas con datos metagenómicos y metadatos estandarizados es importante para comprender qué patrones son determinantes.

### **1.4.3. Inmunomodulación**

La microbiota puede influenciar en múltiples niveles la respuesta inmune innata y adaptativa. Su rol en el desarrollo y regulación del sistema inmune se demostró por medio de estudios comparativos con ratones gnotobióticos (GF), desprovistos de una microbiota detectable y ratones libres de patógenos específicos. Los resultados mostraron que los ratones GF poseían una tasa menor de células TCD4+, y falta de folículos linfoides en la lámina propia del intestino generando una pobre respuesta inmune local. Los microorganismos se encargan de circular PAMPS, que son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones presentes en las células del sistema inmune innato, desencadenando una red de respuestas fundamentales del sistema inmunovigilancia. A modo de ejemplo se ha encontrado que unos tipos específicos de *Clostridium* y *Bacteroides* parecen tener la habilidad de inducir las células T reguladoras. El estudio de la inducción de las células T reguladoras en ratones reveló que esto ocasiona la protección de los roedores a la colitis e infecciones por patógenos entéricos y diarrea. Esto sugiere que las diferentes interacciones establecidas entre los microorganismos y el individuo contribuyen a una mejor respuesta inmune.

Las estrategias empleadas por este conjunto de microorganismos para ejercer un efecto sobre la respuesta inmune antitumoral aún no se han logrado dilucidar en su totalidad. Por un lado, se sabe que pueden modular la inmunidad tumoral mediante la activación de las células dendríticas y la migración directa de las bacterias intestinales al tumor. A su vez, las bacterias en órganos linfáticos pueden provocar una respuesta inmunitaria al proporcionar antígenos que causan la generación de células T reactivas al tumor a través de la reactividad cruzada o la activación de un espectador dentro del microentorno del tumor. Asimismo, la microbiota intestinal también produce metabolitos bioactivos incluyendo ácidos grasos de cadenas cortas que modulan la inmunidad del huésped. Estos metabolitos actúan como una fuente de energía para las células epiteliales, modulan la producción de citoquinas, afectan el cambio de clase, activan las células dendríticas y macrófagos e influyen la diferenciación de las células T memoria. Otros metabolitos como ácido N- acetilmurámico y N-acetil glucosamino tiene altas propiedades inmunomodulatorias (44).

En los últimos años se han realizado varias investigaciones en donde no solo se demostró la influencia de la microbiota sobre la respuesta inmune antitumoral, sino que también las respuestas terapéuticas pueden mejorarse a través de su modulación.

#### **1.4.3.1. Trasplante de materia fecal.**

El interés en la modulación de la microbiota intestinal como tratamiento adjunto a la inmunoterapia basada en inhibidores de puntos de control ha ganado interés. Se han comenzado a diseñar nuevas estrategias para proveer comunidades bacterianas (trasplante de materia fecal) o especies bacterianas específicas (probióticos) para aumentar la eficacia de la inmunoterapia. En una primera instancia se comenzó con estudios en animales. Aylet Sivan et al, comparó la tasa de crecimiento de melanoma en dos especies de ratones que albergaban una microbiota comensal distinta (49). Se observaron diferencias en la respuesta antitumoral. A su vez para probar si la manipulación de la microbiota podría ser efectiva como terapia se realizó un trasplante de material fecal de la especie con mayor respuesta antitumoral a la otra especie en combinación con anticuerpos PD-L1. Se observó un crecimiento más lento del tumor acompañado de un aumento en la respuesta de células T. La secuenciación del ARN ribosomal 16S identificó a *Bifidobacterium* como asociado con los efectos antitumorales.

Por otro lado, Gopalakrishnan et al. (36) estudiaron el trasplante de materia fecal en ratones GF. Los resultados revelaron que aquellos ratones que fueron trasplantados con material fecal de pacientes respondedores a la inmunoterapia redujeron significativamente el crecimiento del tumor comparado a aquellos ratones que fueron trasplantados con materia fecal de pacientes no respondedores. A su vez se realizó una secuenciación del ARNr 16s de la microbiota de ratones respondedores donde se observó una alta abundancia de *Ruminococcaceae/Faecalibacterium* (36). Ya que los resultados obtenidos en modelos murinos fueron prometedores, algunos investigadores comenzaron a realizar estudios en humanos. Baruch et al. diseñaron un ensayo clínico fase uno para determinar la seguridad, factibilidad e impacto inmune del trasplante de materia fecal en pacientes con melanoma refractario. Se observó respuesta clínica en tres pacientes, incluyendo dos respuestas parciales y una completa de un total de diez pacientes. Igualmente, Davar et al (37) diseñó un ensayo clínico para pacientes con melanoma para superar la resistencia a la terapia anti-PD-1. Se observaron beneficios clínicos en seis de los quince pacientes tratados.

Sin embargo, la falta de estandarización de este procedimiento y su carácter poco atractivo han propiciado el surgimiento de estudios sobre bacterioterapia, que consiste en utilizar cócteles bacterianos no tóxicos, generadoras de esporas o no, aislados de las heces de donantes de trasplante fecal para tratar la disbiosis de la microbiota intestinal (45).

#### **1.4.4. Efecto del uso de antibióticos sobre la microbiota**

Los antibióticos son ampliamente utilizados en las prácticas médicas, pero inducen profundos cambios en la microbiota, afectan la composición y diversidad de la microbiota intestinal (46). Algunas investigaciones notaron que el uso de antibióticos mostraba un efecto negativo sobre la respuesta al tratamiento y la supervivencia. A. Elkrif et al. (47) demostraron que la disbiosis asociada a antibióticos puede ser perjudicial para aquellos pacientes tratados con ICI. En su mayoría, las investigaciones realizadas sobre los efectos de los antibióticos en el resultado clínico, demuestran que la eficacia de los anticuerpos contra CLTA-4 y PD-1/PD-L1 se reduce en pacientes que recibieron antibióticos antes o después del inicio de la inmunoterapia (48). El descubrimiento de bacterias capaces de cambiar la disbiosis a una microbiota favorable ayudaría a los resultados del tratamiento. Por lo tanto, la modulación de

la microbiota intestinal por bacterias puede aumentar los pronósticos positivos del tratamiento con ICI.

#### **1.4.5. Biomarcadores de la microbiota intestinal**

Los biomarcadores no solo emplean un rol crucial en el diagnóstico, tratamiento y monitoreo del cáncer, sino que también, permiten el tratamiento personalizado y el análisis del progreso de la droga en el paciente.

En los últimos años algunos estudios revelaron que bacterias intestinales específicas estaban asociadas con la respuesta a ICIs utilizados para melanoma, NSCLC, RCC y carcinoma urotelial. Sivan et al. (49) estudiaron la función de las células dendríticas en ratones y hallaron que *Bifidobacterias* comensales mejoraron la respuesta de anticuerpos anti-PD-1. Chaput et al. (50) estudiaron la composición de la microbiota inicial de pacientes con melanoma bajo el tratamiento con Ipilimumab y notaron que aquellos pacientes con mejores PFS y OS tienen una microbiota enriquecida con *Faecalibacterium* y otros *Firmicutes* mientras que aquellos que no presentaron pronósticos prometedores la microbiota estaba enriquecida con *Bacteroides*. A su vez, Routy et al. descubrió una correlación entre la respuesta clínica y la abundancia relativa de *A.muciniphila* (35).

Por lo que efectivamente las bacterias podrían utilizarse como una posible alternativa a los biomarcadores convencionales para evaluar la respuesta a la inmunoterapia.

#### **1.4.6. Estrategias para estudiar la microbiota intestinal**

Existen dos enfoques principales empleados en el análisis de la microbiota: métodos dependientes de cultivo y métodos independientes de cultivo.

Los métodos dependientes de cultivo se basan en el crecimiento de ciertos microorganismos en medios artificiales específicos. Debido a los diferentes requerimientos nutricionales cada bacteria puede ser cultivada en un medio de cultivo característico. Específicamente, las bacterias de la microbiota intestinal poseen requerimientos nutricionales extremadamente específicos o requieren determinadas condiciones de crecimiento, difíciles de recrear fuera del cuerpo humano.

Los métodos independientes de cultivo, se basan en el análisis de AND o ARN directamente de muestras fecales. Puede realizarse por metagenómica shotgun en donde se emplean técnicas de secuenciación masiva o la secuenciación del gen 16s. Ambas estrategias pueden ser utilizadas para identificar la presencia y abundancia relativa de diferentes taxones en la microbiota intestinal (51).

Ambos enfoques, tanto los métodos dependientes e independientes de cultivo poseen ventajas como desventajas. Ambos métodos en conjunto proveen una comprensión integral de las comunidades microbianas.

#### **1.4.6.1. Secuenciación del ARNr 16S**

La mayoría de los métodos de secuenciación de comunidades bacterianas se basan en concreto en la secuenciación del gen que codifica la subunidad menor del ribosoma 16S (ARNr 16S). Este gen es común a todas las bacterias, contiene similitudes y diferencias en su secuencia. Se basa en 9 sitios hipervariables, que permiten la caracterización taxonómica de las bacterias de una comunidad, logrando llegar hasta el nivel de género y en algunos casos hasta especie. (52). La descripción del perfil taxonómico se basa en la comparación del gen de la muestra con los datos de referencia presentes en las bases de datos. La ventaja de este procedimiento radica en que incluso las bacterias no cultivables pueden identificarse.

#### **1.4.6.2. Metagenómica Shotgun**

La metagenómica shotgun es una estrategia que permite la secuenciación simultánea de material genético de múltiples especies microbianas dentro de una comunidad compleja, como es el caso de la microbiota intestinal. De esta forma, este tipo de análisis no solo provee un estudio profundo de la diversidad de la microbiota, pero también permite la identificación de ciertos taxones y vías metabólicas.

El procedimiento general de las técnicas de secuenciación masiva incluye la fragmentación del ADN, donde se generan pequeños fragmentos y posteriormente se unen a sus extremos unos adaptadores, a este conjunto se lo conoce como librería; luego está la ligación del material amplificado a una superficie donde se realizará la secuenciación del material

genético para finalmente obtener los datos de secuenciación que serán procesados mediante diversas herramientas bioinformáticas.

Entre las tecnologías se destaca Illumina que se basa en la secuenciación por síntesis con nucleótidos marcados con fluorocromos y terminadores reversibles. Esto permite una secuenciación masiva y paralela en millones de fragmentos de ADN. Todas las muestras están marcadas con un “index” pudiendo introducir distintas muestras en la misma secuenciación, lo que se conoce como multiplexing (53). La secuenciación por Nanopore, es una secuenciación de tercera generación, que se caracteriza por la generación de fragmentos de lectura largos (de hasta 1 Mb) sin necesidad de amplificación por PCR, lo que evita sesgos y permite una cobertura mucho más homogénea del genoma. El fundamento detrás de esta tecnología para la identificación de las bases de la cadena de ADN es la detección de la variación de una corriente eléctrica que se genera al pasar la cadena a través de un nanoporo anclado a una membrana

### **1.5. Actividad Antimicrobiana.**

La resistencia bacteriana a los antibióticos, es decir, la capacidad de una bacteria de sobrevivir a concentraciones de determinados antibióticos es una cuestión de interés en la actualidad. Las infecciones causadas con bacterias resistentes se asocian a una mayor morbilidad, mortalidad y coste del tratamiento que las causadas por bacterias sensibles (54).

Algunas bacterias son capaces de producir metabolitos naturales, principalmente toxinas, que pueden incluso inhibir el crecimiento de otros patógenos. En la actualidad, los metabolitos secundarios han adquirido gran interés en el área farmacéutica, biotecnológica como industrial, debido a sus múltiples actividades biológicas tales como: antibióticos, antiinflamatorios, antitumorales, pigmentos, toxinas, entre otros. Desde el punto de vista molecular, estas moléculas pueden utilizarse como agentes antimicrobianos ejerciendo diversas funciones biológicas tales como, inhibir la síntesis de la pared bacteriana, alterar la integridad de la membrana citoplásmica, impedir la síntesis proteica o bloquear la síntesis de ácidos nucleicos. Hay también otros antimicrobianos cuya función es proteger otros compuestos de las enzimas hidrolíticas bacterianas, como es el caso de los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (44). Existen varios métodos para estudiar y evaluar la actividad antimicrobiana, entre los bioensayos se encuentra el ensayo de difusión en disco y difusión en medio líquido.

### **1.5.1. Metabolitos producidos por bacterias**

Las bacterias pueden producir una amplia gama de metabolitos que, entre otras funciones, pueden mediar en las interacciones bacterianas y mostrar actividad antimicrobiana. Una gran cantidad de estos productos naturales se originan a partir de grandes complejos enzimáticos multifuncionales, péptidos sintetizados no ribosomales (NRPS), policétido sintetasas (PKS) o sistemas híbridos PKS/NRPS. Otra clase amplia y diversa de productos naturales consiste en la superfamilia de moléculas derivadas de los ribosomas, las denominadas moléculas de síntesis ribosomal y péptidos modificados postraduccionalmente (RiPP) (55).

### **1.6. Justificación del Proyecto**

La inmunoterapia es un tipo de tratamiento, basado en la estimulación del sistema inmune que ha mostrado ser una alternativa a los tratamientos convencionales. Si bien este nuevo enfoque ha mostrado resultados prometedores, algunos pacientes no responden al tratamiento y las razones de este comportamiento heterogéneo no se han logrado desenmascarar en su totalidad. Estudios recientes han sugerido que la composición de la microbiota intestinal puede ser que desempeñe un papel determinante en la respuesta a la inmunoterapia.

Estudios preclínicos mostraron que la alteración de la composición de la microbiota intestinal como la presencia de ciertos géneros bacterianos pueden aumentar la respuesta a la inmunoterapia. Por esta razón, es que el estudio de la composición de la microbiota de pacientes respondedores a la inmunoterapia brindaría un mejor entendimiento de las posibles bacterias involucradas en aumentar la respuesta a este tratamiento.

## 2. Objetivo

---

### 2.1. Objetivo General:

Caracterizar e identificar aislamientos bacterianos del microbioma de pacientes oncológicos respondedores a la inmunoterapia por puntos de control inmunitario y estudiar interacciones entre bacterias entéricas aisladas y bacterias intestinales patógenas.

### 2.2. Objetivos Específicos

Primera parte

1. Generación de biobanco de cepas bacterianas a partir de muestras de materia fecal provenientes de pacientes oncológicos respondedores.
2. Identificación molecular de los aislamientos obtenidos a partir de las muestras de materia fecal proveniente de pacientes oncológicos respondedores.

Segunda parte:

1. Caracterización de interacciones inhibitorias o promotoras de crecimiento entre bacterias previamente aisladas del microbioma de pacientes oncológicos y patógenos humanos aislados del intestino.
2. Predicción *in silico* de metabolitos naturales producidos por las bacterias entéricas aisladas de pacientes oncológicos.

### **3. Metodología**

---

#### **3.1. Primera Parte: Caracterización del microbioma de pacientes respondedores**

##### **3.1.1. Procesamiento de muestras**

En las primeras 24 horas de ser obtenidas, las muestras fecales de pacientes se recibieron en un recipiente estéril de boca ancha y tapa rosca y fueron recibidas en el laboratorio e inmediatamente tratadas. Las muestras se fraccionaron en alícuotas con un peso neto que oscilaba en 0,250 mg. Para pesar el contenido en cada tubo se utilizó una balanza analítica. El procedimiento fue realizado bajo condiciones de esterilidad. Las alícuotas fueron rotuladas con el número del paciente y se almacenaron en el freezer de -80°C para el aislamiento y caracterización de la composición de la microbiota.

##### **3.1.2. Aislamiento de cepas bacterianas a partir de muestras de materia fecal provenientes de pacientes oncológicos respondedores.**

Método: Screening de bacterias en una muestra fecal o comunidad mixta.

El aislamiento de bacterias entéricas se llevó a cabo dentro de una cámara de anaerobiosis (Bactron 300-2, Institut Pasteur de Montevideo), debido a que las bacterias de interés son en su mayoría anaerobias estrictas. Se midió el nivel de oxígeno dentro de la cámara utilizando un oxímetro Fibox 4, variando entre 0,01-0,03%. Todas las soluciones y placas utilizadas fueron previamente autoclavadas e introducidas en la cámara anaeróbica al menos con 24 horas de anticipación para asegurar las condiciones anóxicas.

##### **3.1.3. Aislamiento sin tratamiento**

Para recuperar bacterias entéricas sin tratamiento se colocó la solución de PBS y Glicerol 50%, las placas de Petri de YCFA agar, placas BHI agar y placas LB agar en la cabina anaeróbica para reducir el contenido de oxígeno. Las muestras fueron ingresadas en la cámara y dentro de la misma se pesó 0,01g en un tubo eppendorf que luego se resuspendió en 1 mL de PBS. La muestra fue homogeneizada por pipeteo y se realizaron diluciones seriadas en 1 mL de PBS en tubos eppendorf hasta alcanzar el orden de  $10^{-7}$ . Las soluciones correspondientes a

los órdenes  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  se plaquearon en placas de cultivo. Se incubaron en la estufa dentro de la cámara a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 hrs.

### 3.1.4. Aislamiento con pre-tratamiento con EtOH

Un procedimiento similar con modificaciones se siguió para el tratamiento con EtOH. Se pesó 0,01g de muestra en un tubo eppendorf que luego se resuspendió en 1 mL de solución de etanol 100%. Se dejó reposar aproximadamente una hora. A partir de la solución obtenida se realizaron diluciones seriadas en 1 mL de PBS en tubos eppendorf hasta alcanzar el orden de  $10^{-3}$ . Las soluciones correspondientes a los órdenes  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  se plaquean en placas de cultivo. Se incubaron en la estufa dentro de la cámara a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 hrs.

### 3.1.5. Medios y condiciones de cultivo

Se utilizaron cuatro medios diferentes: medio de extracto de levadura, casitona y ácido graso (YCFA), medio de infusión de cerebro y corazón (BHI), medio de infusión de cerebro y corazón suplementado con mucina (BHI suplementado con mucina) y caldo de lisogenia agar (LB Agar).

**Tabla 3.** Medios empleados para el aislamiento selectivo de diferentes microorganismos y condiciones de incubación. La condición de anaerobiosis se generó mediante el uso de la cabina de anaerobiosis BACTRON, con una mezcla de gases  $N_2$  80%,  $CO_2$  10%,  $H_2$

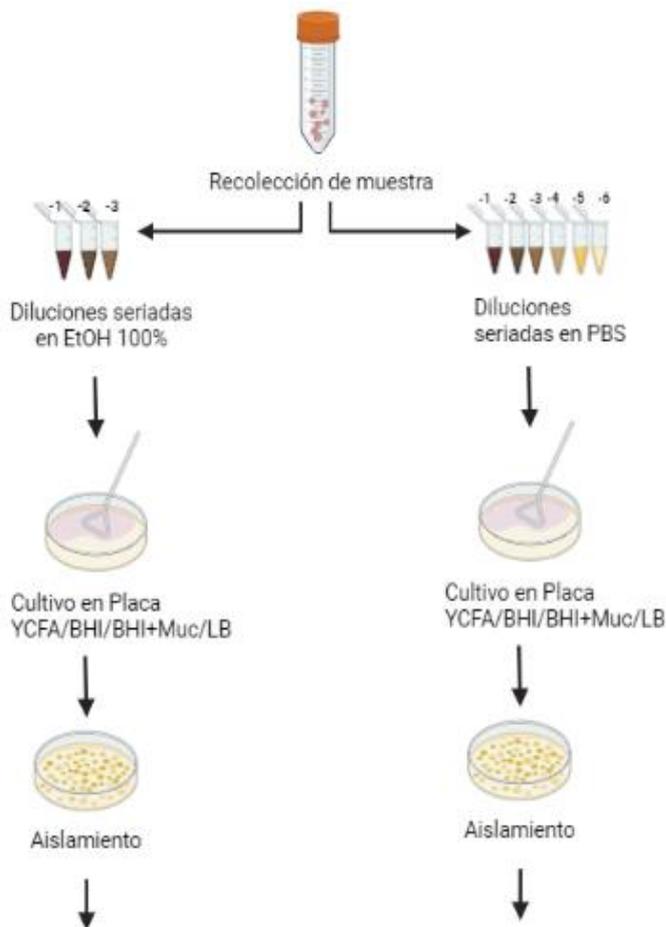
MEDIOS DE CULTIVO	CONDICIONES DE INCUBACIÓN
YCFA Agar	Anaerobiosis, $37^{\circ}\text{C}$ , 48 h
BHI Agar	Anaerobiosis, $37^{\circ}\text{C}$ , 48 h
BHI + MUCINA Agar	Anaerobiosis, $37^{\circ}\text{C}$ , 48 h
LB Agar	Anaerobiosis, $37^{\circ}\text{C}$ , 48 h

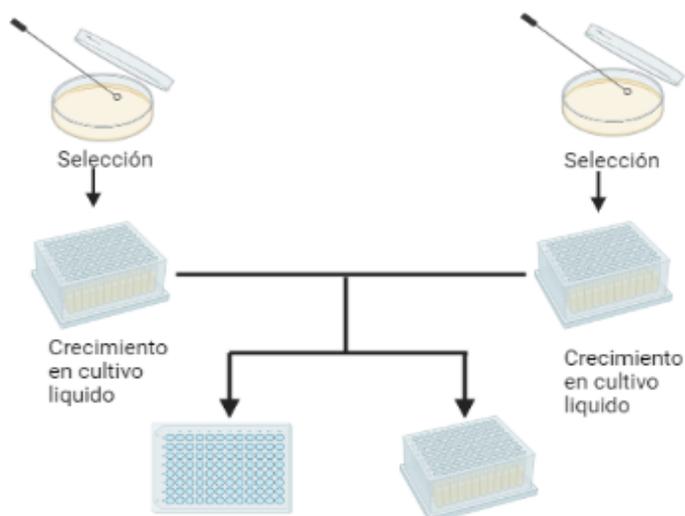
Luego de 48 horas de crecimiento, se seleccionaron colonias de microorganismos para su aislamiento, almacenamiento e identificación molecular. Este paso se realizó dentro de la cámara de anaerobiosis en donde se utilizó una placa profunda de 96 pocillos a las cuales se les adiciono 0,5 mL de medio de cultivo líquido (YCFA/BHI/BHI+Mucina/LB). De las placas

crecidas se picaron diferentes colonias y se inoculó cada uno de los pocillos con escarbadiantes. Se buscó seleccionar colonias con diferencias macroscópicas marcadas. Las características macroscópicas que se tuvieron en cuenta fueron su color (crema, blanca o pigmentada), forma (circular, irregular o filamentosa), superficie (plana o convexa) y borde (ondulado, en sierra o liso). Los últimos dos pocillos H11 y H12 se dejaron vacíos para los controles positivos y controles negativos en todas las placas realizadas. Por último, la placa se recubre con una película transpirable que permite el intercambio de gases, pero a su vez evita la posible contaminación entre pocillos vecinos. Las placas crecieron dentro de la estufa a 37°C por 24 horas.

### 3.1.6. Almacenamiento y conservación de cepas

Las cepas fueron conservadas en placas deep well de 96 pocillos con glicerol en una proporción 1:1 0,5 mL de cultivo overnight y una disolución de glicerol al 50%. Las placas fueron rotuladas y almacenadas a -80°C.





**Figura 4.** Procedimiento general de la preparación de las muestras de heces.

### 3.1.7. Generación de Librerías

La elaboración de las librerías se realizó con el kit Ligation sequencing kit SQK-LSK109 (Oxford Nanopore) siguiendo el protocolo del proveedor. Este protocolo permite la agrupación y ejecución conjunta de múltiples librerías de secuenciación. El kit incluye adaptadores y primers de PCR forward y reverse con el mismo barcode en ambos primers. Existen 96 barcodes únicos dentro del kit y suficientes adaptadores para realizar 10 librerías por barcode. Cada barcode fue diseñado para minimizar la oportunidad de una contaminación cross-talk.

Se realizó la amplificación y fragmentación de la región de interés. Para la construcción de librerías de la secuencia de ADNr de longitud completa, específicamente se amplificó la región V1-V9 del gen 16S. Los primers utilizados fueron 27f y 1492r, flanqueados por secuencias de anclaje. Estas regiones de anclaje los hacen específicos para Nanopore.

**Tabla 4.** Secuencias de primers

27F: 5'-TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC secuencia anclaje-3'
1492R: 5'-ACTGCCTGTCGCTCTATCTTC secuencia anclaje-3'

Para la identificación bacteriana de las colonias aisladas en las placas sembradas se realizó una secuenciación del ADN ribosomal 16S con los primers de la Tabla 4. Se utilizó el programa de amplificación mostrado en la tabla 5.

**Tabla 5.** Programa de PCR

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclo</b>
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	15 seg	
Annealing	55°C	15 seg	25-30
Extensión	72°C	30 seg	
Hold	4°C	∞	

La calidad de los productos de PCR de aproximadamente 1500 pb se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % p/v, con tinción de GoodView bajo luz UV.

Las secuencias de anclaje se utilizan para realizar una segunda PCR en donde se unen los códigos de barra (bar-code), a esta etapa se la conoce como barcoding. El producto de la amplificación por PCR son amplicones con código de barras con extremos 5' modificados para simplificar la unión posterior de los adaptadores.

**Tabla 6.** Componentes de PCR

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
PCR Barcode (10 uM)	0,8
Producto de PCR	2,4
H2O	21,5

---

Mango Master Mix	25
------------------	----

---

**Tabla 7.** Programa de PCR

<b>Paso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclo</b>
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	15 seg	
Annealing	62°C	15 seg	8-10
Extensión	72°C	30 seg	
Hold	4°C	∞	

---

Posteriormente se realizó un paso de purificación del ADN utilizando el sistema de AMPure XP beads. Este sistema de purificación de productos de PCR consiste en un conjunto de perlas paramagnéticas que permiten eliminar contaminantes (dNTP, sales, cebadores, dímeros de cebadores) sin necesidad de centrifugación ni filtración. Se cuantificó la concentración de ADN utilizando el sistema Qubit.

Luego de la ligación de los adaptadores de secuenciación, se realiza el paso final de purificación con Ampure beads (Beckman Coulter, Brea, CA) según el protocolo de Oxford Nanopore. La secuenciación de la librería fue evaluada en 2 celdas distintas: MinION flow cell FLOMIN106 en el Minion y Flong flow cell FLO\_FLG001 en el Gridion (Oxford Nanopore). Con ambas celdas se siguieron protocolos de Oxford Nanopore.

### **3.1.8. Análisis Filogenético**

Para trabajar con los datos obtenidos en la secuenciación, fue requerido una estación de trabajo con un sistema Linux operativo. Se corrió Porefile (56) y se obtuvo un archivo .RMA

que se procesó con el software MEGAN CE. Se extrajo el archivo.tree de MEGAN (57) y se procesó con FigTree para obtener el árbol filogenético.

### 3.2. Segunda Parte:

Caracterización de interacciones inhibitorias o promotoras de crecimiento entre bacterias previamente aisladas del microbioma de pacientes oncológicos y patógenos humanos aislados del intestino.

#### 3.2.1. Microorganismos utilizados en este estudio

En las placas del paciente P003 se observaron colonias de bacterias que inhibían el crecimiento de otras colonias. Se aislaron en medio YCFA agar y luego en medio liquido YCFA. El cultivo liquido se almacenó en un freezer a -80°C con glicerol 50% como criopreservante. Las bacterias aisladas fueron secuenciadas por Illumina.

**Tabla 8.** Microorganismos aislados y utilizados en la investigación.

<b>ID</b>	<b>Fecha aislamiento</b>	<b>Fuente</b>	<b>Características</b>
F335	2021	Hospital Maciel	Urocultivo, resistencia NDM
18	2022	Instituto Pasteur	Muestra de heces de pacientes oncológicos
15	2022	Instituto Pasteur	Muestra de heces de pacientes oncológicos
4	2022	Instituto Pasteur	Muestra de heces de pacientes oncológicos
6	2022	Instituto Pasteur	Muestra de heces de pacientes oncológicos

IN 2	2022	Instituto Pasteur	Muestra de heces de pacientes oncológicos
2	2022	Instituto Pasteur	Muestra de heces de pacientes oncológicos
22	2022	Instituto Pasteur	Muestra de heces de pacientes oncológicos
20	2022	Instituto Pasteur	Muestra de heces de pacientes oncológicos
3	2022	Instituto Pasteur	Muestra de heces de pacientes oncológicos
4	2022	Instituto Pasteur	Muestra de heces de pacientes oncológicos
7	2022	Instituto Pasteur	Muestra de heces de pacientes oncológicos

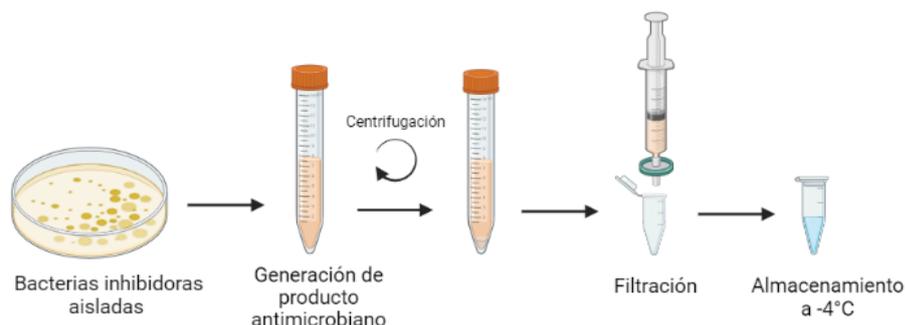
### 3.2.2. Crecimientos de bacterias inhibidoras

Para este ensayo en específico, las bacterias se descongelaron para generar los sobrenadantes para los ensayos de inhibición. Para ello se sembraron las once muestras en YCFA agar y se crecieron por 24 horas a 30°C.

### 3.2.3. Generación de sobrenadantes líquidos

De las placas de aislamiento se seleccionó una colonia por placa para realizar la inoculación del respectivo medio de cultivo líquido en tubos de vidrio para la generación de sobrenadantes líquidos. Se incubaron los tubos en la estufa dentro de la cámara de anaerobiosis a 30°C por 48 horas. Se centrifugaron los tubos crecidos por seis minutos a 6000 rpm en la centrífuga. Se transfirió el sobrenadante de cada uno de los tubos a tubos eppendorf previamente

rotulados. Se filtraron los sobrenadantes con un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . El líquido filtrado se depositó en tubos eppendorf de 1,5 mL previamente rotulados y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  como se observa en la Figura 5.



**Figura 5.** Procedimiento para la generación de sobrenadantes a partir de las bacterias aisladas.

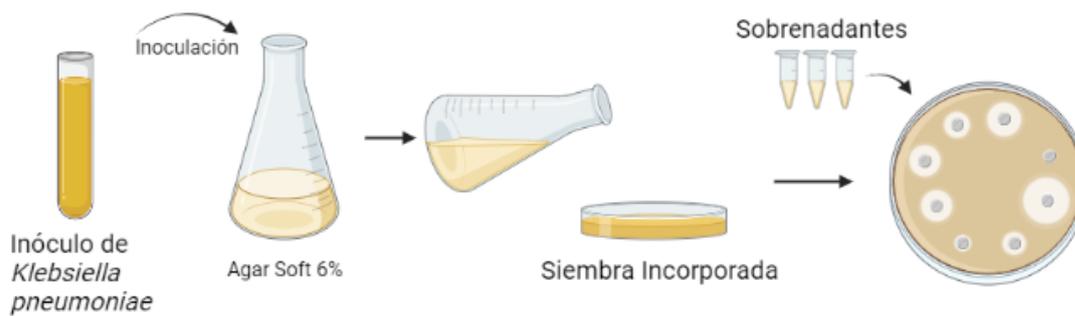
### 3.2.4. Ensayo de Inhibición: antibiograma disco-placa

Se utilizó el método de antibiograma disco-placa para el ensayo de inhibición.

Se utilizó la técnica siembra incorporada. Se realizó un medio LB Agar Soft con una concentración de Agar 6% y se esterilizó.

Se utilizó la bacteria caracterizada previamente como multirresistente *K.Pneumoniae* (F335). La misma se encontraba almacenada en glicerol 50% a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se extrajo del freezer de  $-80^{\circ}\text{C}$  se creció en medio LB líquido a  $37^{\circ}\text{C}$  con agitación suave por 24 horas. Se realizó un cultivo incorporado semisólido con Agar 6% en una placa de Petri.

Antes de inocular se estimó la concentración del inóculo midiendo la densidad óptica. Partiendo de referencia bibliográfico de que 1 OD equivale a una concentración de  $1 \times 10^9$  ufc/mL se determinó el volumen necesario para lograr una concentración de  $1 \times 10^6$  ufc/mL en 50 mL de Agar Soft. Se testearon los sobrenadantes sobre trozos de papeles whatman estériles, dispuestos sobre la placa de Petri. Se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de las soluciones de los sobrenadantes. Se utilizó como control negativo de crecimiento 10  $\mu\text{L}$  de Tetraciclina (1mg/mL) y como control positivo de crecimiento 10  $\mu\text{L}$  de LB líquido. Las placas crecieron por 72 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . El ensayo fue realizado por triplicado.



**Figura 6.** Ensayo de inhibición. Método de antibiograma en placa

Los halos se midieron utilizando el programa ImageJ versión Java 8. Se seteó la escala a 10 cm Global y se realizaron 3 medidas para cada uno de los halos. Los datos se graficaron utilizando el programa GraphPad Prisma 9.

### 3.2.5. Ensayo de inhibición en medio líquido

Sobre la placa de 96 pocillos se determinó la inhibición midiendo la turbidez en cada uno de los pocillos. Se evaluaron las siguientes condiciones:

- Medio LB líquido: blanco.
- Medio LB líquido inoculado con *K.pneumoniae* suplementado con Tetraciclina: control negativo de crecimiento.
- Medio LB líquido inoculado con *K.pneumoniae*: control positivo de crecimiento.
- Medio LB líquido inoculado con *K.pneumoniae* con sobrenadante .

Se analizaron aquellos sobrenadantes que presentaron un halo de inhibición en el ensayo de antibiograma en placa.

Se midió la densidad óptica del medio de cultivo a 600 nm cada 2 horas durante un período de 7 horas. Se graficaron los datos obtenidos de Varioskan utilizando el programa GraphPad Prisma 9.

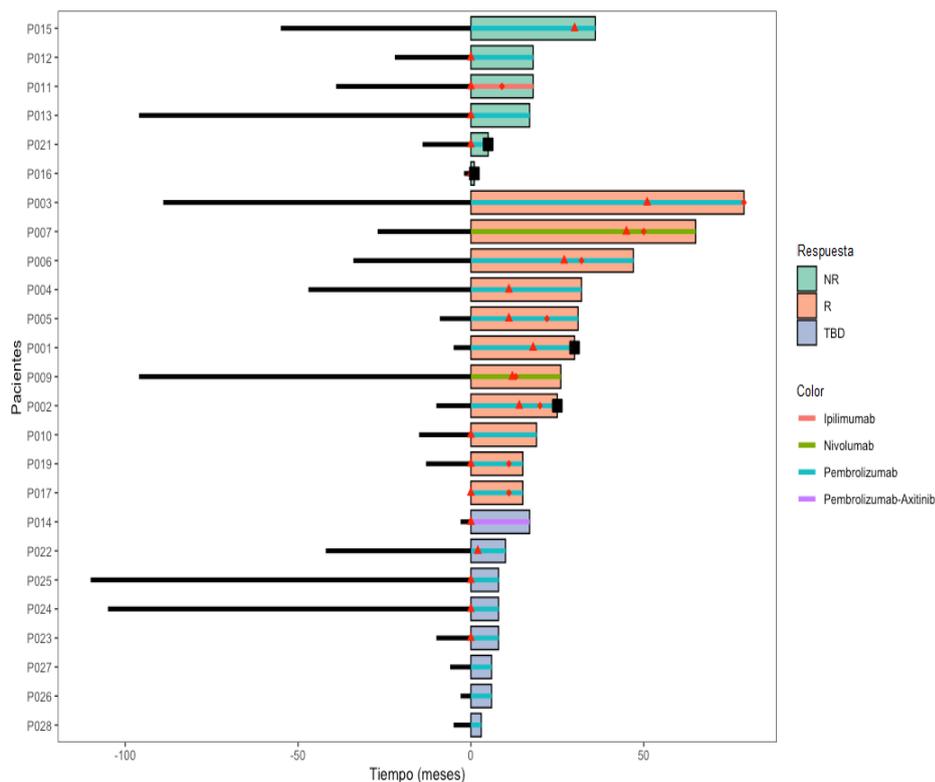
### **3.2.6. Análisis de la generación de metabolitos**

Se utilizaron dos estrategias para predecir metabolitos naturales generados por las bacterias aisladas del paciente respondedor P003. En ambos casos se partió de la secuencia genómica, la cual fue ingresada en la plataforma correspondiente. Para identificar y caracterizar pequeñas moléculas producidas por bacterias en el microbioma intestinal humano se utilizó la herramienta bioinformática GutSMASH (58) que utiliza los genomas de bacterias para predecir la presencia de grupos de genes biosintéticos. Por otro lado, se utilizó AntiSMASH (59) buscando identificar cluster de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1. Características y motivo clínico de la población estudiada

El trabajo se enmarca en un proyecto en donde se analizaron la microbiota intestinal de un total de 28 pacientes. A partir de los datos recopilados, se determinó que la mediana de edad es de 65 años, con un rango de 36 a 90 años. El porcentaje de pacientes por debajo de los 60 años es del 50%. Respecto al sexo, el 61% de los pacientes es de sexo masculino. El 57% de los pacientes presentaba cáncer de células NSCL, que predominaba ampliamente, seguido de melanoma, que lo padecían alrededor de un 15% de los pacientes. El resto padecen otros tipos de cáncer, entre ellos de riñón, carcinoma epidermoide de lengua, orofaringe, entre otros. Los datos de los pacientes, el tipo de cáncer y el tratamiento se puede observar en la Figura 5. En la imagen se aprecia el momento del diagnóstico, el comienzo del tratamiento (tomado arbitrariamente al mes 0) y el tiempo que ha transcurrido desde la primera dosis. A su vez, se indicó si hasta el momento el paciente posee una respuesta positiva o negativa al tratamiento como también el tipo de droga suministrada (Pembrolizumab, Iplimumab, Pembrolizumab-Axitinib o Nivolumab).



**Figura 7.** Swimmer Plot del tratamiento de todos los pacientes. Gráfico elaborado en R, con el paquete ggplot2, en el eje vertical los pacientes y en el eje horizontal el tiempo transcurrido desde el diagnóstico en meses. La toma de muestra está señalada con una figura roja: los triángulos corresponden a la primera muestra de materia fecal extraída y son los analizados en este trabajo.

Como se aprecia en la Figura 5, la mayoría de los pacientes recibió Pembrolizumab y en algunos casos Ipilimumab. Pembrolizumab se utiliza sobre todo para cáncer de pulmón de células no pequeñas. Se trata de un anticuerpo monoclonal que impide la interacción del receptor inhibitor del linfocito T, PD-1 con el ligamento tumoral correspondiente. El punto de control PD-1 se encuentra en los linfocitos T. El Ipilimumab es un anticuerpo monoclonal, que se utiliza sobre todo para el tratamiento del melanoma y bloquea la unión de un receptor co-inhibidor de los linfocitos T, CTLA-4, con el ligando tumoral correspondiente.

En cuanto a las muestras, en algunos casos, se extrajo la muestra de materia fecal después de iniciar el tratamiento. Es importante tener en cuenta este factor, ya que la inmunoterapia puede modificar la comunidad de microorganismos del intestino, lo que puede afectar los resultados finales. En otros casos, la muestra se recolectó antes del inicio del tratamiento (pre-tratamiento). La ventaja de obtener la muestra pre-tratamiento es que, con la toma de muestras posteriores, se puede observar la evolución y comparar la microbiota basal del paciente y la microbiota a lo largo del tratamiento. Asimismo, cómo se relacionan estos cambios ante la respuesta o no respuesta a la inmunoterapia. Estos datos son esenciales para futuras investigaciones en las que se podría comparar la evolución de la composición de la microbiota de los pacientes a lo largo del tratamiento.

#### **4.2. Selección de pacientes**

La investigación se centra exclusivamente en aquellos pacientes que mostraron alguna respuesta clasificada como positiva al tratamiento. Es decir, los que presentaron una respuesta completa, parcial o estable.

Se entiende como paciente respondedor aquellos que según el criterio REICIST 1.1 se considera dentro de una de las siguientes categorías:

1. Respuesta completa (RC): desaparición de todas las lesiones y ganglios patológicos.

2. Respuesta parcial (RP): disminución  $\geq$  al 30% de la suma de los diámetros máximos.
3. Enfermedad estable (EE): no cumple los criterios para la respuesta parcial ni progresión de la enfermedad (60).

A continuación, se presentan los pacientes de interés para la investigación, que son aquellos que mostraron algún tipo de respuesta positiva al tratamiento y se los consideran respondedores.

**Tabla 9.** Pacientes respondedores seleccionados para el estudio. RC: Respuesta Completa; EE: Enfermedad Estable; RP: Respuesta Parcial

<b>Paciente</b>	<b>Tipo</b>	<b>Respuesta</b>
P003	Respondedor	RC
P004	Respondedor	EE
P005	Respondedor	EE
P006	Respondedor	EE
P007	Respondedor	RP
P009	Respondedor	RP
P010	Pre-tratamiento	EE

Se tomaron las muestras correspondientes de materia fecal de los pacientes excepto la del paciente P018. La misma fue procesada como se señaló anteriormente en la metodología. Se utilizaron diferentes medios de cultivo y diferentes tratamientos para las muestras.

### **4.3. Aislamientos bajo diferentes condiciones de cultivo**

#### **4.3.1. Medios de cultivo utilizados**

Existen diversos métodos para caracterizar y analizar las comunidades microbianas de la microbiota intestinal que pueden ser divididos en métodos dependientes e independientes de cultivo. Los datos obtenidos de estos métodos permiten obtener información sobre la riqueza (número de especies) y la abundancia relativa de cada especie, representando en su conjunto la diversidad microbiana (61).

Los métodos dependientes de cultivo se basan en el empleo de medios diferenciales para seleccionar poblaciones bacterianas de interés explotando los requerimientos metabólicos específicos de las diferentes poblaciones de bacterias. Para esta investigación, como se mencionó anteriormente, se utilizaron cuatro medios diferentes: medio de extracto de levadura, casitona y ácido graso (YCFA), medio de infusión de cerebro y corazón (BHI), medio de infusión de cerebro y corazón suplementado con mucina (BHI-Muc) y caldo de lisogenia agar (LB Agar).

El medio YCFA es un medio no selectivo enriquecido que se utiliza en el aislamiento y cultivo de una amplia variedad de bacterias que se encuentran en el intestino humano, sobre todo aquellas bacterias intestinales que dependen de la presencia de ácidos grasos volátiles para su crecimiento (62). Los componentes nutritivos básicos provienen del extracto de levadura y del digerido pancreático de caseína. A su vez, se enriquece con varias vitaminas, azúcares y ácidos grasos específicos para favorecer el crecimiento de microorganismos intestinales exigentes.

Dado que, ciertos microorganismos necesitan condiciones específicas de cultivo para su crecimiento, como la presencia de determinados nutrientes, se emplearon otros medios de cultivo buscando favorecer el crecimiento de otros filos de bacterias de interés. Se utilizó el medio de infusión de corazón y cerebro. Este medio es un medio de cultivo utilizado para los organismos exigentes, como *Streptococcus*. Los componentes clave incluyen infusión de distintos tejidos animales con el agregado de peptona, buffer fosfato y glucosa que proporciona una fuente de energía fácilmente accesible para los microorganismos. Asimismo, el medio BHI se suplementó con mucina, una proteína de alto peso molecular, secretada principalmente por los tejidos epiteliales.

Por último, el medio de lisogenia o LB agar también se utilizó ya que promueve el crecimiento de bacterias entéricas. Incluye en su formulación péptidos y peptonas

proporcionadas por la triptona. A su vez, extracto de levaduras que otorgan vitaminas y bacto-triptona que proporciona aminoácidos esenciales para promover el crecimiento de diferentes bacterias.

#### **4.3.2. Colonias de bacterias aisladas en cada medio de cultivo.**

De aquellas muestras aisladas en medio YCFA, a nivel macroscópico se observaron colonias con diferentes formas: circulares, ovaladas y estrelladas, como también de diversos colores, entre ellas: amarillas, blancas y transparentes. Como se señaló anteriormente, el medio YCFA, al ser un medio bacteriológico complejo de amplio rango, suplementado con cisteína y varias vitaminas promueve el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos anaerobios intestinales, lo que se observó claramente en las placas las cuales mostraban un número alto de colonias con diferente morfología, colores y relieves.

En el caso de las muestras aisladas en medio BHI no exhibieron un crecimiento tal como aquellas aisladas en medio YCFA, el número de colonias era considerablemente menor. Esta diferencia puede deberse a que el medio YCFA contiene una amplia variedad de nutrientes y vitaminas que posibilita el crecimiento de más bacterias. En cambio, para el caso de las placas con LB Agar se observaron colonias de bacterias que presentaban una morfología variada, al igual que en los otros medios de cultivo. Asimismo, algunas poseían un color amarillo mientras que otras eran transparente o blancas. Para estas placas se observó incluso un número aún menor de colonias de bacterias en comparación con los otros medios de cultivo empleados.

Dadas referencias bibliográficas que indican la presencia de bacterias del género *Clostridium* presentes en la microbiota intestinal, se empleó el pre-tratamiento de las muestras fecales con etanol 100% buscando favorecer su crecimiento.

El resumen de los medios de cultivo y las condiciones utilizados para cada una de las muestras se muestra a continuación (Tabla 10).

**Tabla 10.** Condiciones de cultivo de las muestras de los pacientes seleccionados

---

<b>Paciente</b>	<b>Medio</b>	<b>EtOH</b>
-----------------	--------------	-------------

---

P003E	BHI-Muc	NO
	YCFA	NO
P004	BHI-Muc	SI
	YCFA	SI
P005E	LB	SI
	YCFA	NO
	BHI-Muc	NO
P006E	LB	NO
	YCFA	NO
	BHI-Muc	NO
P007	YCFA	NO
P009	BHI-Muc	NO
P010	BHI-Muc	NO

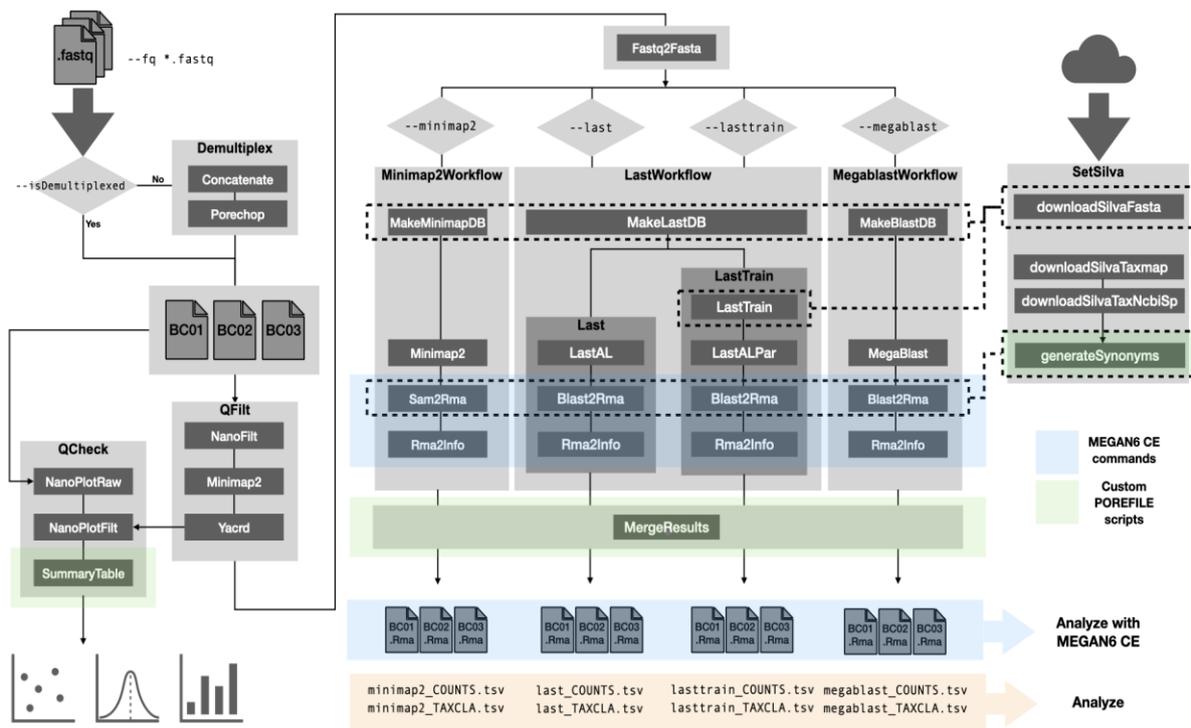
#### **4.4. Clasificación taxonómica de las muestras de pacientes oncológicos mediante secuenciación Oxford Nanopore.**

Con el fin de identificar y clasificar los microorganismos aislados de las muestras fecales de los pacientes oncológicos respondedores, se llevó a cabo la construcción de librerías de secuencias multiplex del ARNr 16S, generadas por amplificación a partir de ADN bacteriano de las colonias previamente aisladas.

En este trabajo se realizó la secuenciación desarrollada con la técnica Oxford Nanopore para la identificación molecular bacteriana. Las muestras se procesaron en el equipo Gridion y Minion según su disposición. Se filtraron los reads de forma tal de conservar aquellos con

calidades  $>7$  y longitud de reads 1500 bases. Los datos de la secuenciación se procesaron utilizando Porefile (56). Porefile es una canalización de Nextflow que agrupa varios softwares de terceros que permite procesar y clasificar reads provenientes de la secuenciación del gen completo 16S. Es importante resaltar que se secuenció el gen ADNr 16s por completo lo que permite una mayor resolución taxonómica. Por esta razón es que se utilizó Nanopore ya que es un método de secuenciación de tercera generación que secuencia reads largos. En cambio, otros métodos de secuenciación, como Illumina, secuencian reads cortos por lo que se debe utilizar un pequeño fragmento de todo el gen ADNr 16. Esto implica una menor la resolución taxonomica.

Los reads de cada amplicón son alineados con la base de datos SILVA SSU NR9. SILVA proporciona conjuntos de datos completos, de calidad verificada y actualizados regularmente de secuencias alineadas de ARN ribosómico (ARNr) pequeñas (16S/18S, SSU) y subunidades grandes (23S/28S, LSU) tanto para bacterias como arqueas.



**Figura 8.** Conjunto de subflujos que forman Porefile

Luego de la ejecución de Porefile se obtienen diferentes archivos, entre ellos uno de tipo .RMA para cada uno de los barcodes. El formato RMA contiene todos los reads, alineamientos, clasificaciones taxonómicas y funcionales. Se utilizó MEGAN para la clasificación taxonómica

de las bacterias. Este software realiza análisis taxonómico y funcional de los reads, facilitando la exploración y la comparación de muestras metagenómicas. Asimismo, MEGAN permite visualizar la diversidad microbiana presente en una muestra empleando la taxonomía definida en la base de datos NCBI para resumir y ordenar los resultados.

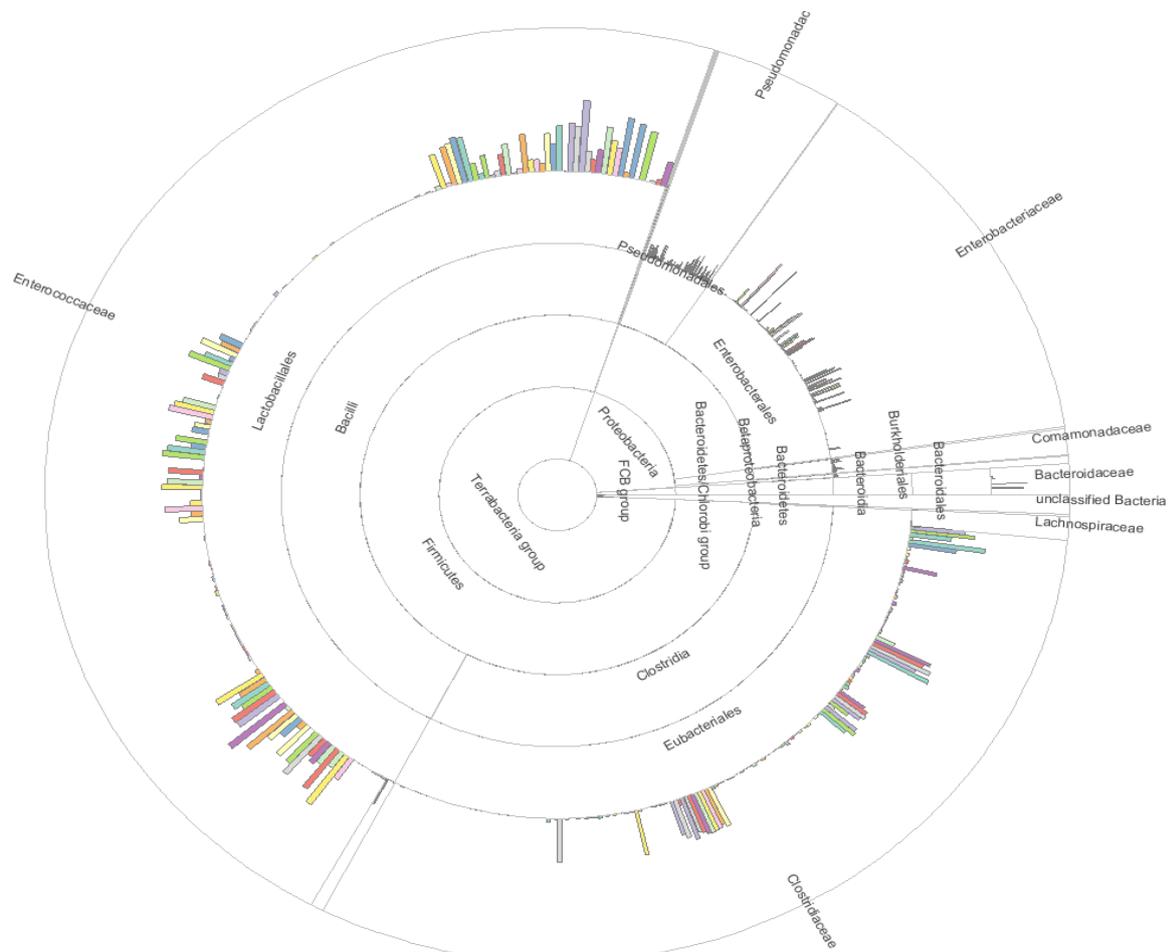
#### **4.4.1. Análisis de la composición de la comunidad microbiana de muestras aisladas en diferentes medios de cultivo.**

Como se mencionó anteriormente, los medios de cultivo un inicio, se compararon las bacterias crecidas y aisladas en tres de los cuatro medios: YCFA, BHI suplementado con mucina y LB. Se subieron los archivos al programa MEGAN correspondientes a cada medio de cultivo. Se obtuvo como resultado final un árbol filogenético, en donde, se visibilizaba desde dominio hasta nivel de especie. Para analizar y comparar la presencia de grupos taxonómicos de interés entre los diferentes medios utilizados se realizó un gráfico de árbol radial. Este recurso dentro de las herramientas de MEGAN CE permite representar los diferentes niveles taxonómicos dentro de las muestras analizadas de forma proporcional, con respecto al total. En este caso se comparó hasta el nivel de familia para las tres condiciones de cultivo.

Las muestras correspondientes a seis pacientes fueron procesadas con medio BHI suplementado con mucina. Se lograron identificar un total de 390 especies de bacterias, pertenecientes a 131 géneros, 10 clases y 4 filos. El nivel de filo contribuye a la comprensión general de la estructura de la comunidad microbiana. La biota intestinal de los mamíferos (el ser humano incluido) comprende 4 filos de bacterias: *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Firmicutes*. Las especies Gram (+) agrupan las *Actinobacterias* y los *Firmicutes*, mientras que las especies Gram (-) concentran los *Bacteroidetes* y las *Proteobacterias*. En este caso se observó una mayor proporción de bacterias pertenecientes al filo *Firmicutes*, dentro del cual se encontraron presentes las clases *Bacili* y *Clostridia*. Específicamente, dentro de este filo se encontró un predominio de la familia *Enterococcaceae* y *Clostridiaceae*. *Enterococcaceae* es una familia de bacterias Gram-positivas del orden de las *Lactobacillales* mientras que *Clostridiaceae* es una familia de bacterias del grupo *Clostridia*.

También se hallaron los filos *Proteobacterias* y *Bacteroidetes*, pero en una menor proporción. Para el caso de *Proteobacterias* se determinó un predominio de las familias

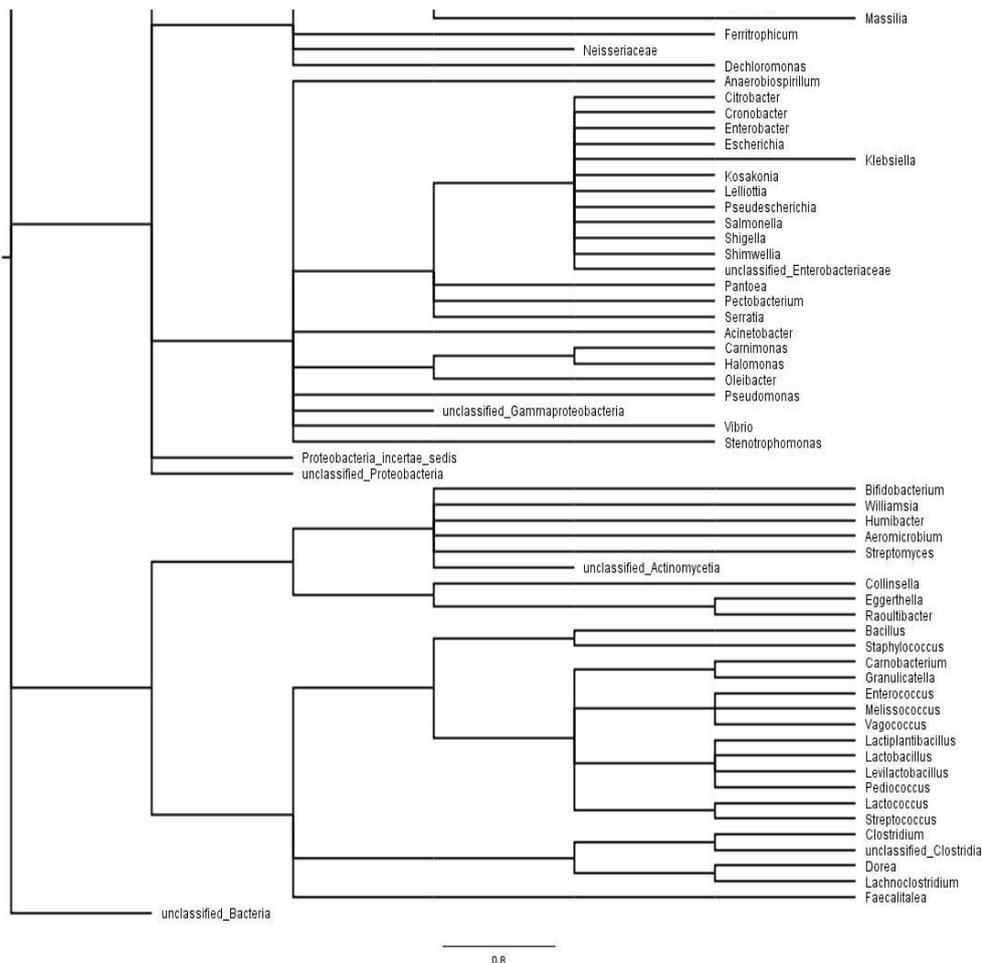
*Enterobacteriaceae*, seguido de *Pseudomonadaceae* y *Comamonadaceae*. Mientras que la familia que predominó para el filo *Bacteroidetes* fue *Bacteroidaceae*. Estos resultados coinciden con la bibliografía; Matson et al. identificaron las especies bacterianas comensales asociadas con la respuesta clínica a la terapia PD-1 en una cohorte de 42 pacientes (43). Determinaron que la presencia de bacterias de la familia *Enterococcaceae* y *Bifidobacteriaceae* mejora la respuesta terapéutica, acompañado de un aumento en el control tumoral. Asimismo, contribuye a un aumento de la respuesta de las células T. La presencia de *Bacteroidaceae* se encontró en varios estudios en donde se observó una respuesta terapéutica efectiva. Específicamente las especies *Bacteroides caccae*, *Bacteroides thetaiotamicron*, *Bacteroides fragilis* y *Bacteroides thetaiotaomicron* se hallaron presentes en pacientes respondedores empleando Ipilimumab (anti-CTLA-4).



**Figura 9.** Diagrama de árbol radial de muestras de seis pacientes aisladas en medio BHI suplementado con mucina. El anillo interior indica filos representativos y el anillo exterior representa familias. Las abundancias de phyla son proporcionales al ancho y las abundancias de familias son proporcionales al diámetro (valores en escala de raíz cuadrada). Los colores de las barras corresponden a los barcodes y el largo corresponde al número de reads.

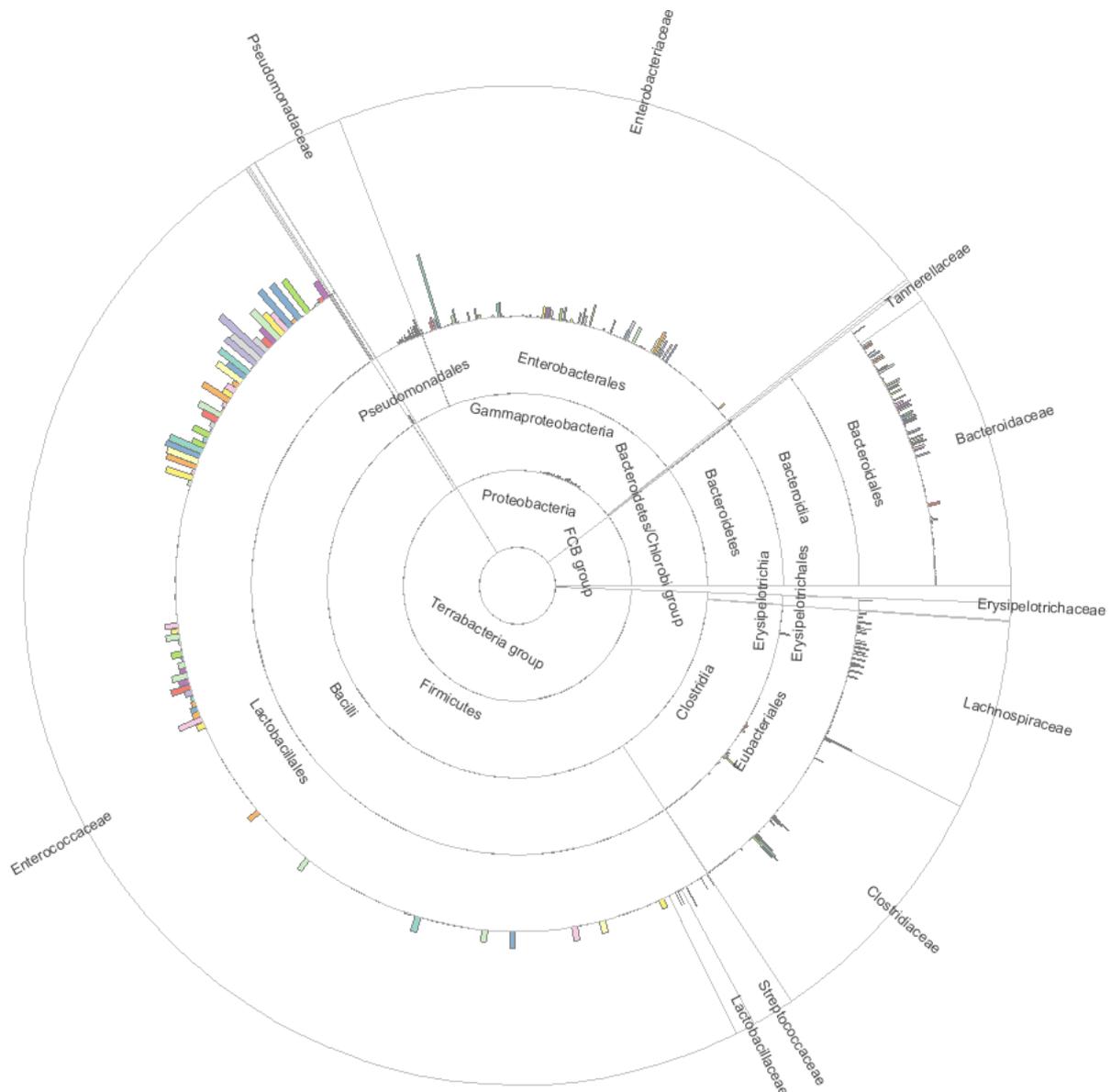
A su vez, para otorgar una visión más profunda se realizó un árbol filogenético a nivel de género de las bacterias identificadas para esta condición. En la Figura 10 se observan varios géneros de interés, entre ellos *Bifidobacterium*, un género de bacterias gram-positivas, anaerobias presentes en el tracto gastrointestinal de mamíferos. Sivan et al. demostraron un papel fundamental de este género en la mejora de la inmunidad antitumoral *in vivo*. Los efectos se observaron en varios entornos tumorales, esto puede implicar que *Bifidobacterium* coloniza un compartimiento específico del intestino que le permite interactuar con células críticas del huésped que modulan la función de las DC o la liberación de factores que conducen a una mejor función de DC (49).

Asimismo, se detectó la presencia del género *Lachnoclostridium*, perteneciente a la familia *Lachnospiraceae*. Se ha reportado el potencial antiinflamatorio de *Lachnoclostridium* y su capacidad para modular el sistema inmune. En un estudio donde se reclutaron 20 respondedores a ICI y 21 no respondedores se observó un enriquecimiento de *Lachnoclostridium* en pacientes que mostraron una respuesta objetiva al tratamiento (63).



**Figura 10.** Árbol Filogenético a nivel de género de bacterias identificadas en medio BHI con mucina.

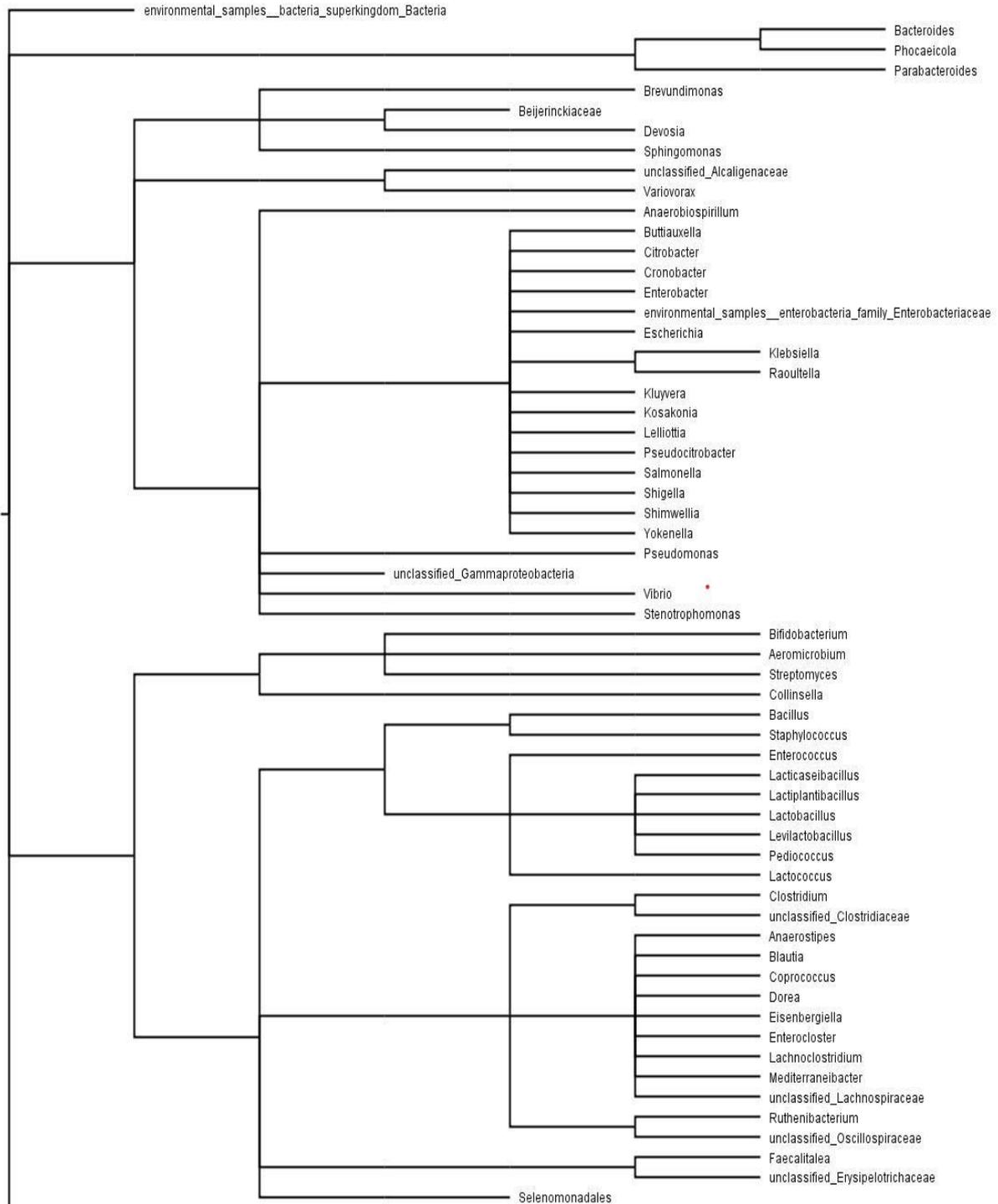
De la misma manera, se realizó un árbol radial para seis muestras de pacientes analizadas en medio YCFA liquido (Figura 11).



**Figura 11.** Diagrama de árbol radial de muestras de seis pacientes aisladas en medio YCFA. El anillo interior indica filos representativos y el anillo exterior representa familias. Las abundancias de phyla son proporcionales al ancho y las abundancias de familias son proporcionales al diámetro (valores en escala de raíz cuadrada). Los colores de las barras corresponden a los barcodes y el largo corresponde al número de reads.

Para esta condición de cultivo se identificaron un total de 344 especies pertenecientes a 81 géneros, 10 clases y 4 filos de bacterias.

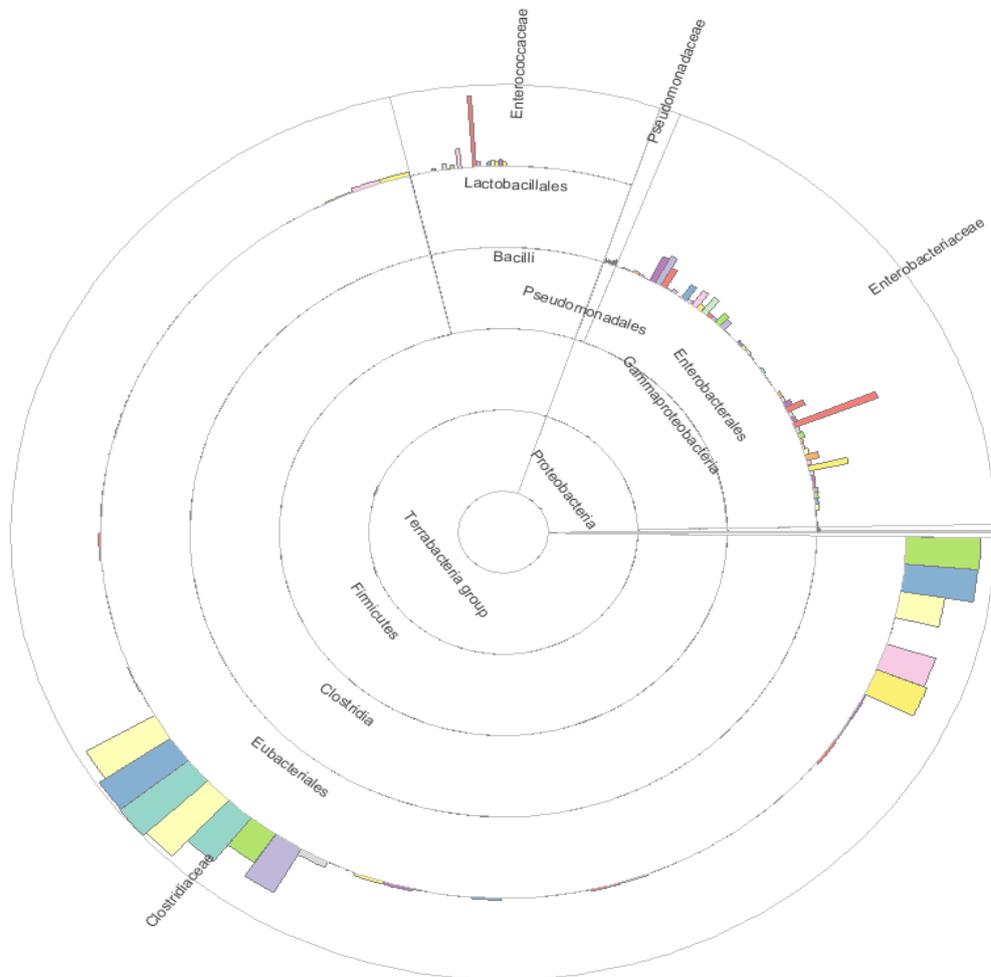
A nivel macroscópico se detectó una mayor cantidad de colonias en las muestras crecidas en YCFA, pero se identificaron una menor cantidad de especies y géneros de bacterias en comparación a aquellas muestras aisladas en medio BHI suplementado con mucina. De hecho, las bacterias observadas en las placas con YCFA presentaban características similares, por lo que los resultados son coherentes.



**Figura 12.** Árbol Filogenético a nivel de género de bacterias identificadas en medio YCFA

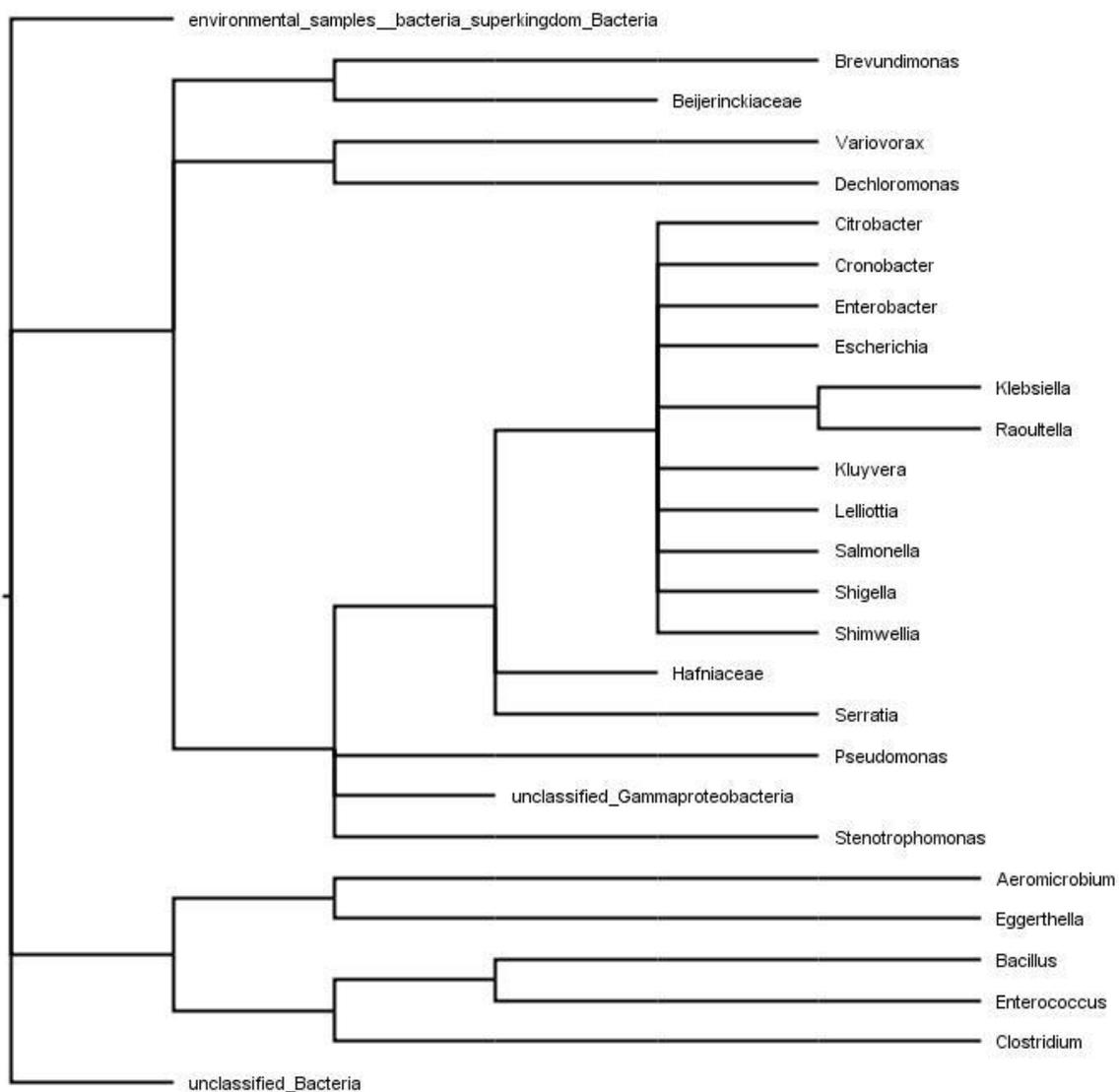
Al igual que en el diagrama anterior, el filo predominante es *Firmicutes*, seguido de *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*, aunque estos últimos se encuentran en mayor proporción. En el caso de las familias pertenecientes a *Firmicutes* se observó un claro predominio de las bacterias pertenecientes a la familia *Enterococcaceae*, una menor proporción de *Clostridiaceae* y un aumento de la proporción identificada de bacterias perteneciente a la familia *Lachnospiraceae*. Se identificaron otras familias como *Streptococcus* y *Lactobacillaceae*. Se aislaron las mismas clases para ambos medios: *Bacili*, *Clostridia*, *Negativicutes*, *Erysipelotrichia*, *Coriobacteriia*, *Actinomycetia*, *Gammaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Bacteroidia*.

Por último, para aquellas muestras crecidas en LB se identificaron un total de 137 especies, 45 géneros, 7 clases y 3 filo de bacterias.



**Figura 13.** Diagrama de árbol radial de muestras de tres pacientes aisladas en medio BHI suplementado con mucina. El anillo interior indica filos representativos y el anillo exterior representa familias. Las abundancias de phyla son proporcionales al ancho y las abundancias de familias son proporcionales al diámetro (valores en escala de raíz cuadrada). Los colores de las barras corresponden a los barcodes y el largo corresponde al número de reads.

Se observó una predominancia del filo *Firmicutes* para estas muestras. Asimismo, se determinó la ausencia del género *Bacteroidetes*. En cuanto a las familias y géneros identificados se observa una menor diversidad. Esto puede deberse a que el medio LB no está enriquecido con vitaminas, azúcares, ácidos grasos o infusiones de tejido animal como es el caso de YCFA y BHI que promueve el crecimiento de bacterias anaerobias exigentes.



**Figura 14.** Árbol Filogenético a nivel de género de muestras crecidas en medio LB.

De los resultados obtenidos se observó que el medio empleado favorece o dificulta el crecimiento de ciertos géneros bacteriano, en especial, aquellas bacterias exigentes que requieren de medios suplementados con vitaminas, ácidos grasos y otros componentes para crecer. Por esta razón, es que el estudio de los requerimientos nutricionales para favorecer el crecimiento de ciertos microorganismos de interés de la microbiota intestinal son importantes.

Por otro lado, las bacterias aisladas e identificadas de las muestras de pacientes respondedores a la inmunoterapia por inhibidores de puntos de control inmunitario coincidieron con aquellas halladas en otras investigaciones donde se analizó la microbiota intestinal de pacientes respondedores.

#### **4.4.2. Comparación de la composición de la comunidad microbiana de muestras con y sin tratamiento con EtOH.**

El pre-tratamiento con etanol, se utilizó para contribuir a la recuperación de bacterias formadoras de esporas las cuales se ven menos afectadas al pretratamiento con etanol. Las esporas son cuerpos de pared gruesa formados dentro de las células vegetales de ciertas bacterias, capaces de resistir a condiciones adversas del medio ambiente por períodos de tiempo prolongados. El tratamiento de muestras clínicas o cultivos mixtos con etanol se ha descrito como un tratamiento eficaz para el aislamiento de bacterias esporuladas (64). Una investigación reciente utilizó la desinfección de heces de donantes con etanol antes de la selección bacteriana para eliminar las formas vegetativas, lo que finalmente resultó en la identificación de muy pocos microorganismos. Por otro lado, un estudio evaluó el impacto del pre tratamiento con etanol, donde se compararon los datos de cultivo obtenidos antes y después de la desinfección de la misma muestra. El empleo de etanol permitió cultivar 60 especies que estaban ausentes en las condiciones estándar de cultivo (65).

Una de las bacterias formadoras de esporas son las bacterias del género *Clostridium*, bacterias anaerobias pertenecientes al orden *Clostridiales*, del filo *Firmicutes*. Algunas investigaciones resaltan que estas bacterias cumplen un papel importante en mediar la respuesta inmune. Se identificaron miembros del orden *Clostridiales* presente en la microbiota intestinal asociados con una menor carga tumoral en modelos de cáncer colorrectal (CCR) en ratones (66). Estas especies comensales también se reducen significativamente en pacientes con

cáncer en comparación con controles sanos. Incluso, la aplicación oral de una mezcla de *Clostridiales* en ratones previno e incluso trató con éxito el CCR como terapia independiente.

La técnica con EtOH consiste en dejar una suspensión de la muestra inmersa en EtOH 100% por aproximadamente 1 hora. Para este trabajo se realizó el pre-tratamiento con etanol para las muestras de tres pacientes, las cuales fueron luego inoculadas en YCFA. Se amplificó el gen 16s a partir de las colonias aisladas, el cual fue secuenciado mediante Nanopore. Los datos de secuenciación así obtenidos se analizaron utilizando Porefile, obteniéndose el árbol filogenético a nivel de género que se muestra en la Figura 15. Para las placas tratadas con etanol se lograron aislar algunos géneros de interés como *Clostridium*, *Bacteroides*, *Enterococcus* como se observa en la Figura 15. De esta forma, debido a su capacidad única para formar endoesporas, las especies de *Clostridium* se pueden recuperar de poblaciones mixtas en las que otros componentes de la microbiota intestinal las superan en número.

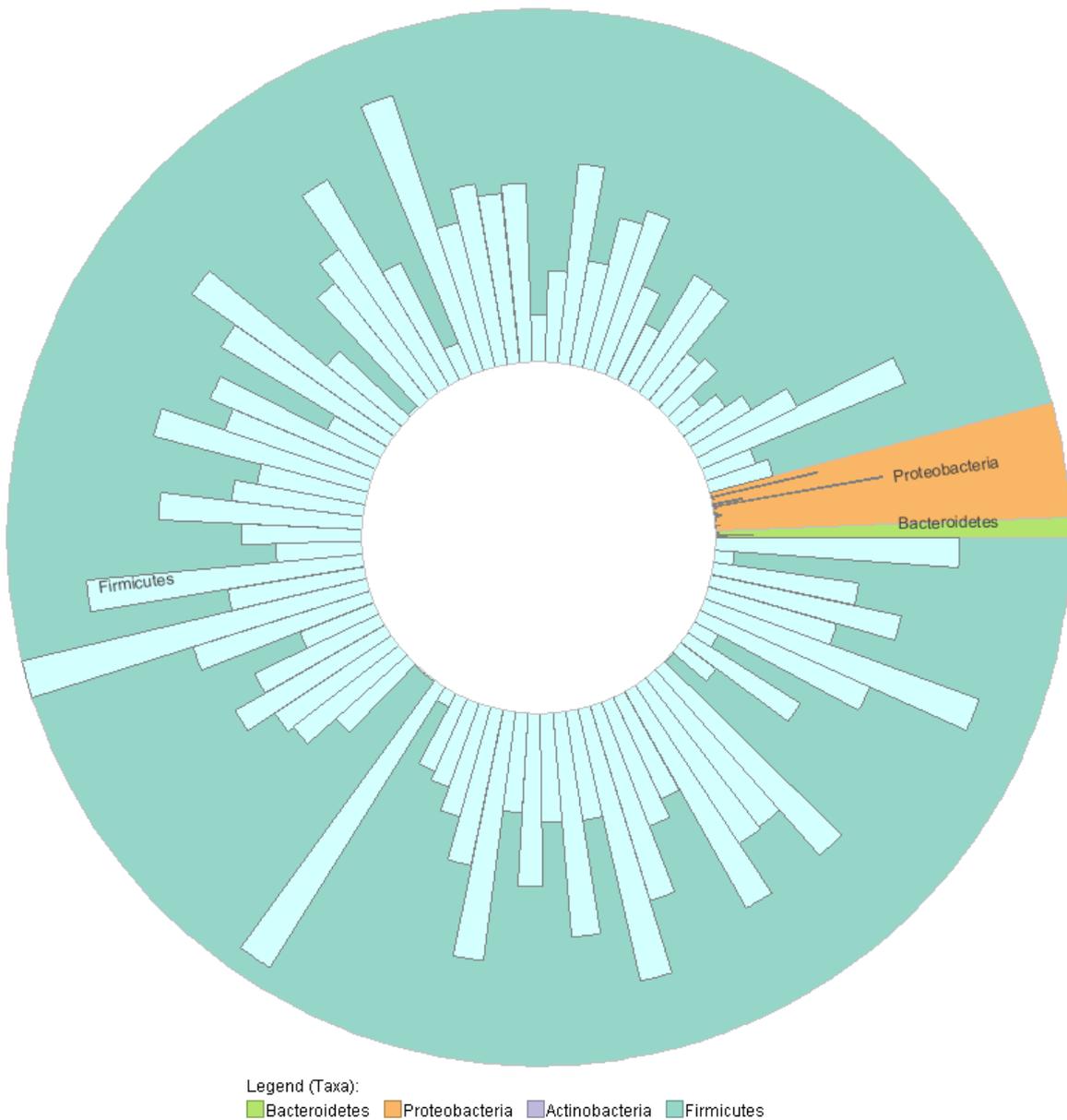
En cambio, para las placas sin tratamiento con etanol se lograron identificar varios géneros de bacterias, entre ellos *Citrobacter*, *Salmonella*, *Listeria*, *Klebsiella*, *Raoultella* y *Lactobacillus*, las cuales no se observaron en las placas tratadas previamente con etanol, como se observa en la Figura 16.

Estos resultados indican que posiblemente el tratamiento de las muestras con etanol afectó el crecimiento de ciertas bacterias al alterar la estructura o función de la membrana. Ciertamente, el etanol parece ser afectar significativamente el crecimiento de bacterias no formadoras de esporas. Se logró aislar más géneros de bacterias cuando las muestras no fueron tratadas previamente con EtOH.



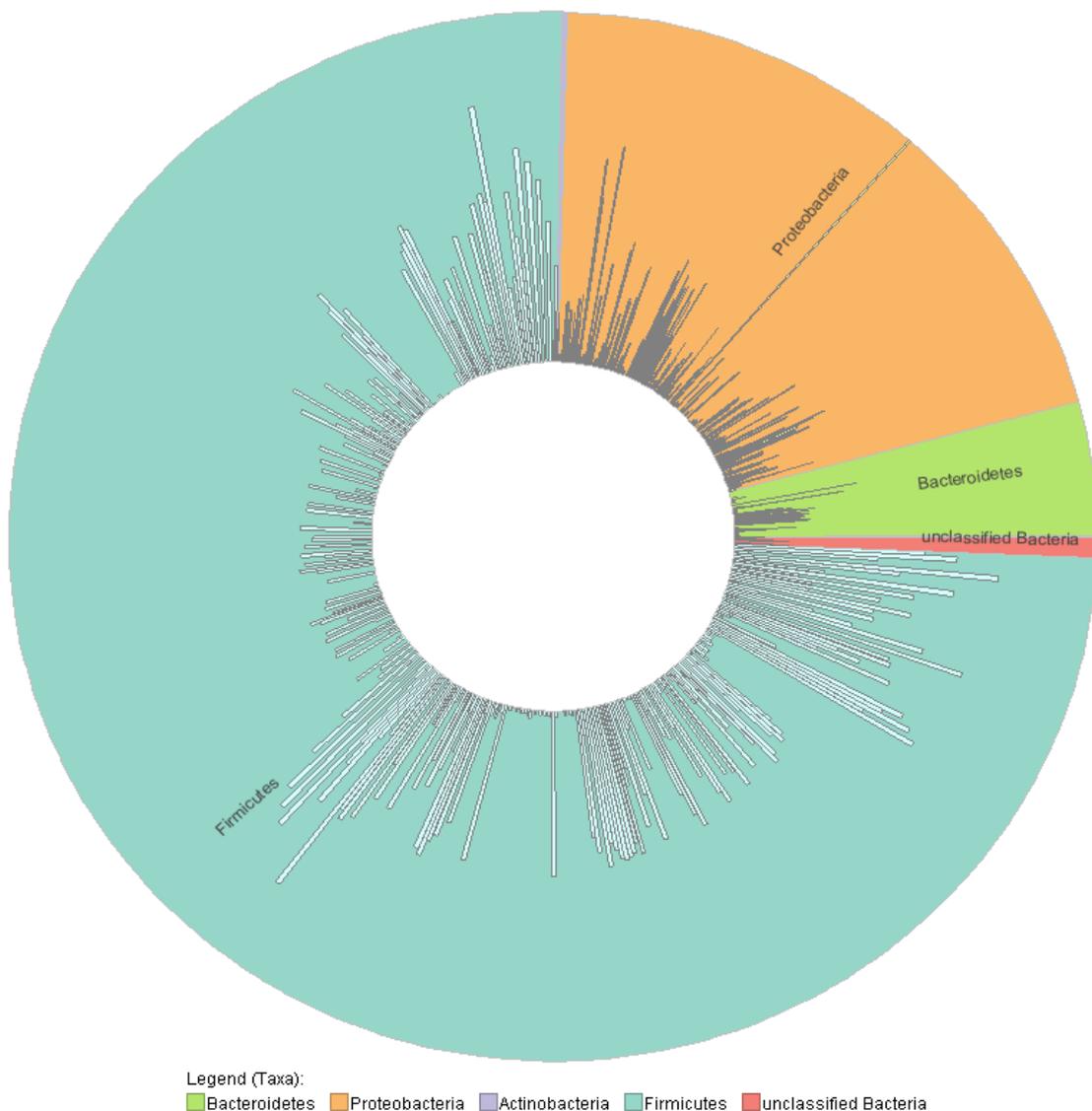
**Figura 16.** Clasificación taxonómica nivel de género de bacterias aisladas sin pre-tratamiento con etanol.

El predominio de *Firmicutes* también se observó para las muestras sin tratamiento, la diferencia radica en que se puede observa una mayor proporción de bacterias pertenecientes al filo *Proteobacteria* y *Bacteroides*.



**Figura 17.** Diagrama de árbol radial de muestras de tres pacientes aisladas pre-tratados con Etanol. El anillo interior indica filos representativos. Las abundancias de phyla son proporcionales al ancho (valores en escala de raíz cuadrada). Los colores de las barras corresponden a los barcodes y el largo corresponde al número de reads.

Una menor proporción de los filos *Proteobacteria* y *Bacteroides* en las muestras tratadas con etanol concuerda con lo observado a nivel de género. Por un lado, entre los géneros pertenecientes al filo *Proteobacteria* están *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter*, *Citrobacter*, entre otros que no se identificaron en las muestras con etanol, pero si en las muestras sin tratamiento. A su vez, las bacterias pertenecientes al filo *Bacteroides* no poseen la capacidad de formar esporas, por lo que su ausencia en las muestras con tratamiento es coherente con los resultados observados en la Figura 16.



**Figura 18.** Diagrama de árbol radial de muestras de tres pacientes sin tratamiento con Etanol. El anillo interior indica filos representativos. Las abundancias de phyla son proporcionales al ancho (valores en escala de raíz cuadrada). Los colores de las barras corresponden a los barcodes y el largo corresponde al número de reads.

Se demostró que el tratamiento con etanol alteró la composición bacteriana cultivable y, en comparación con el perfil original, enriqueció de manera eficiente las bacterias resistentes al etanol, lo que facilitó su aislamiento e identificación. Una profundización de los resultados a nivel de especie permitiría observar si el tratamiento de las muestras con etanol permite el crecimiento y aislamiento de especies de bacterias, sobre todo aquellas pertenecientes al género *Clostridium* que no logran aislarse con los métodos convencionales.

#### **4.4.3. Identificación de especies presentes en la muestra P003.**

Se realizó la caracterización taxonómica de las bacterias aisladas de la microbiota del paciente P003. El paciente P003 era el único de los pacientes respondedores que exhibía una respuesta completa por esta razón es que se decidió analizar aquellas bacterias aisladas.

Los datos de la secuenciación se procesaron utilizando el programa Porefile. Se lograron identificar los aislamientos de las muestras fecales del paciente P003 hasta el nivel de especie. Esto fue posible dado que se utilizaron primers que permitían la secuenciación completa del gen de ARNr 16s lo que permitió una mayor resolución taxonómica.

Se identificaron un total de 286 especies distribuidos en 98 géneros, 16 clases y 5 filos (*Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* y *Firmicutes*).

Específicamente, se logró detectar la presencia de la especie *Akkermansia muciniphila*, una bacteria difícil de aislar, debido a sus requerimientos nutricionales. Cabe resaltar de no haberse utilizado mucina para suplementar el medio BHI no hubiera sido posible el aislamiento de *A.muciniphila*. Este microorganismo pertenece al filo *Verrucomicrobia* y utiliza las mucinas intestinales como única fuente de carbono y nitrógeno. Incluso, es el único representante intestinal cultivado del filo *Verrucomicrobia*. Este filo se encuentra en la microbiota intestinal que puede ser fácilmente detectado por análisis filogenéticos y metagenómicos (67).

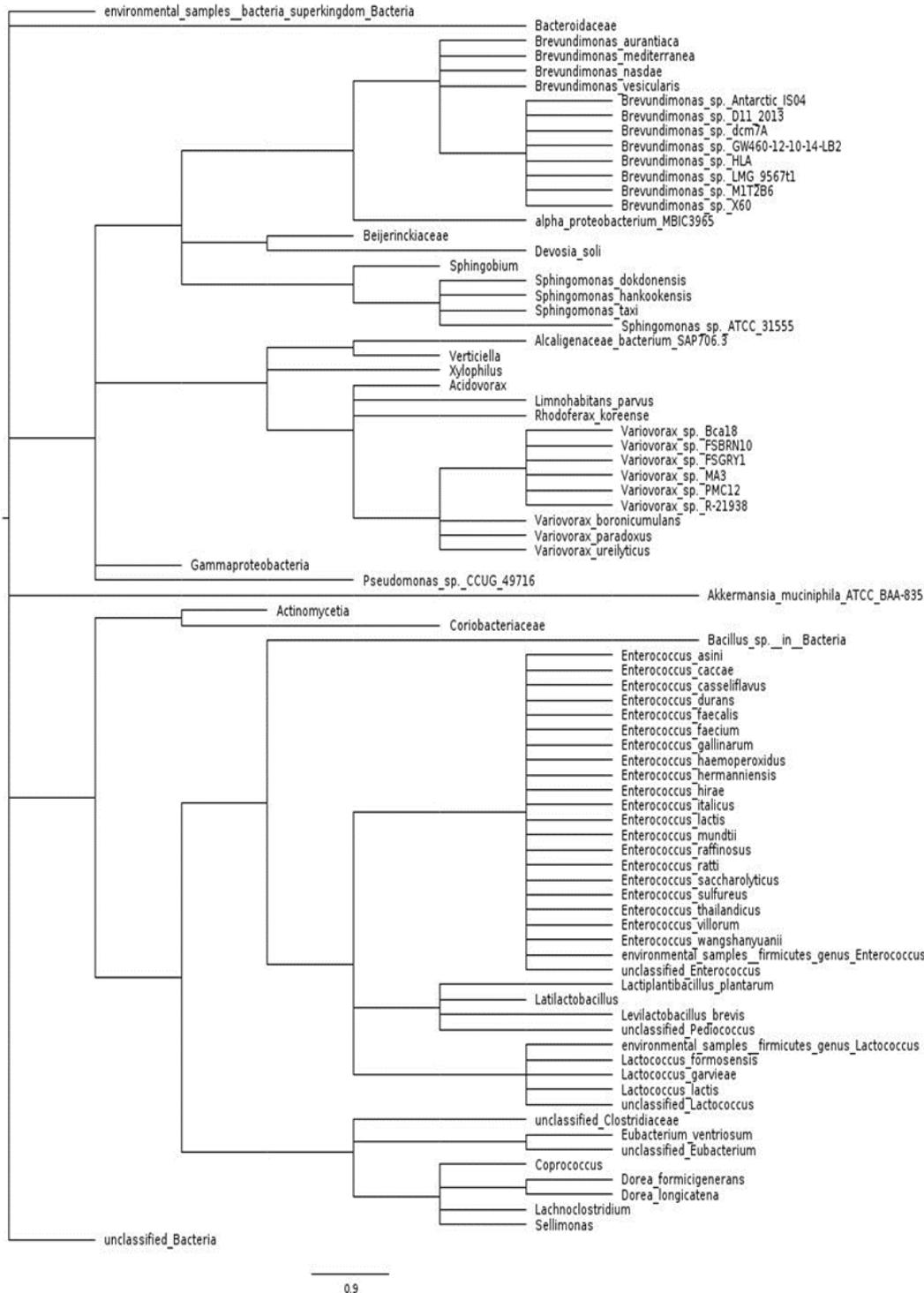
Varios estudios reportaron una reducción en la abundancia de *A. muciniphila* frente a desórdenes y enfermedades humanas, entre ellas cáncer (68). Cabe resaltar que Routy et al. estudiaron la respuesta ante la inmunoterapia en pacientes con dos tipos de cáncer. De esta forma determinaron que al segmentar los respondedores de los no respondedores (utilizando el

método RECIST 1.1), se apreciaba una sobrerrepresentación de *Firmicutes*, como también otros géneros bacterianos como *A. muciniphila* y *Alistipes*. De hecho, el comensal que se asoció más significativamente con resultados clínicos favorables tanto en los pacientes con NSCLC y RCC fue *A. muciniphila*. En los resultados mostrados en esta investigación, *A. muciniphila* se encontraba enriquecida en pacientes con un PFS de 3 meses mientras que en aquellos con un PFS menos a 3 no se encontró. Otro estudio halló que la presencia de *A. muciniphila* fue detectable en el 69% y el 58% de los pacientes exhibiendo una respuesta parcial o estable. Mientras que en aquellos que mostraron progresión de la enfermedad, no se logró detectar. En una cohorte de 53 pacientes se comprobó el enriquecimiento de *A. muciniphila* en aquellos pacientes que presentaron la mejor respuesta clínica y un PFS mayor al de tres meses. Este descubrimiento demostró que *A. muciniphila* se encuentra sobrerrepresentada al momento del diagnóstico en las muestras fecales de pacientes quienes luego presentaron una respuesta beneficiosa de la inhibición por PD-1. (69).

Asimismo, se identificó la presencia de la especie *Dorea formicogenarus*. Un estudio en pacientes con melanoma metastásico demostró que entre los pacientes que respondieron al tratamiento con Pembrolizumab, el microbioma se encontraba enriquecido con la especie *Dorea formicogenarus* (70). Por otro lado, se detectó la presencia de bacterias pertenecientes al género *Bacteroides*, específicamente *Bacteroides fragilis* y *Bacteroides thetaiotaomicron* en las muestras fecales del paciente P003. Estudios revelaron que las bacterias pertenecientes a este género mejoran la respuesta de las células T, inducen la respuesta inmune Th1 y promueve la maduración de las células dendríticas. Sin embargo, una investigación centrada en la inmunoterapia PD-1 de pacientes con melanoma reveló que los respondedores tienen una menor abundancia de *Bacteroidales* que los no respondedores (71). Un estudio en el que se analiza la microbiota de 112 pacientes concluyó que el orden *Clostridiales* y la familia *Ruminococcaceae* se enriquecen en pacientes respondedores a inmunoterapia contra el cáncer. Mientras que el orden *Bacteroidales* se enriquece en no respondedores (66).

Igualmente, se detectó la presencia del género *Enterococcus*. Cada vez surgen más investigaciones que resaltan la capacidad que poseen de modular la microbiota y cooperar en la respuesta a la inmunoterapia como tratamiento al cáncer. Producen una amplia gama de sustancias que tienen propiedades antimuorales y antimicrobianas, pueden inducir o promover la acción de linfocitos encargados de reconocer y destruir las células cancerosas. Este

sinergismo de acción (bactericida y tumoricida) puede aprovecharse en el tratamiento de pacientes con cáncer inmunocomprometidos, de forma tal de controlar posibles infecciones, pero al mismo tiempo utilizarse como adyuvante en el tratamiento (72). Para este genero se aislaron varias especies, entre ellas: *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. hirae*, entre otros (Figura 19).



**Figura 19.** Árbol filogenético a nivel de especie del paciente P003 de respuesta completa

Fue entonces posible aislar e identificar varias especies de bacterias del paciente P003 involucradas en la modulación del sistema inmune. Varias investigaciones clínicas detectaron la presencia de estas especies en pacientes que exhibieron una respuesta completa a la inmunoterapia con ICI. Es importante resaltar que la microbiota al estar altamente influenciada por la dieta y la localización podría haber presentado mayor diferencia. Aun así, varios géneros y especies que se hallaron en la investigación coincidieron con estudios previos realizados en otras localidades.

Se logró aislar e identificar una gran diversidad de microorganismos. La aplicación de un enfoque metagenómico podría otorgar una visión mas amplia de la composición microbiana en estas muestras.

#### **4.4.4. Generación de un Biobanco.**

Por último, el almacenamiento con glicerol de cada una de las placas de 96 contribuyó a la creación de un biobanco de cepas bacterianas aisladas de pacientes oncológicos respondedores. Generar un banco de bacterias identificadas y conservadas permite, en un futuro, indagar nuevos tratamientos y posibles biomarcadores a nivel regional. A su vez, estudiar de forma individual bacterias que sean de interés. Específicamente, en búsqueda de comprender nuevos métodos de inhibición de patógenos intestinales se aislaron once bacterias que mostraron un comportamiento inhibitorio. Las mismas fueron secuenciadas y utilizadas en la segunda parte de la investigación.

### **Segunda Parte**

#### **4.5. Determinación de la capacidad inhibitoria de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias presentes en la microbiota intestinal.**

**Tabla 11.** Clasificación de bacterias aisladas.

<b>ID</b>	<b>Características</b>	<b>Clasificación</b>
-----------	------------------------	----------------------

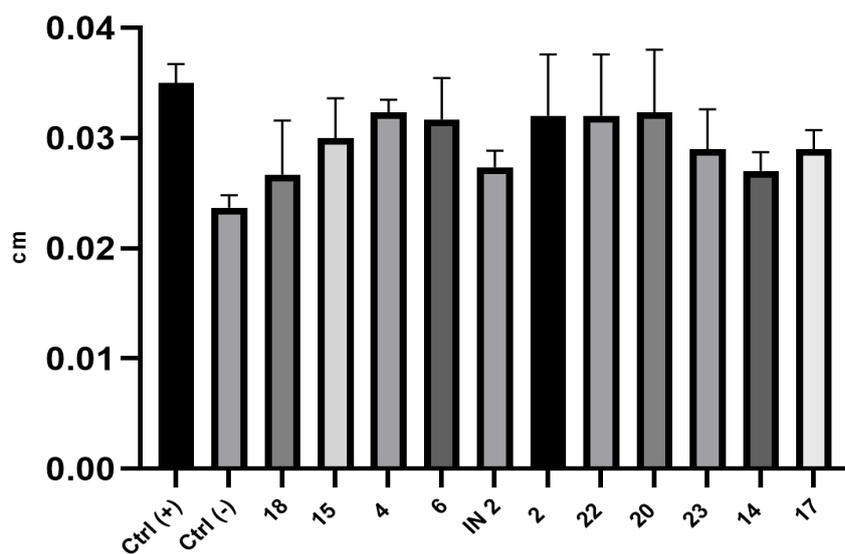
<b>F335</b>	Urocultivo, resistencia NDM	<i>K.Pneumoniae</i>
<b>18</b>	Muestra de heces de pacientes oncológicos	<i>Escherichia coli</i>
<b>15</b>	Muestra de heces de pacientes oncológicos	<i>Clostridium perfringens</i>
<b>4</b>	Muestra de heces de pacientes oncológicos	<i>Clostridium perfringens</i>
<b>6</b>	Muestra de heces de pacientes oncológicos	<i>Enterococcus hirae</i>
<b>IN2</b>	Muestra de heces de pacientes oncológicos	<i>Paraclostridium sordelli</i>
<b>2</b>	Muestra de heces de pacientes oncológicos	<i>Enterococcus hirae</i>
<b>22</b>	Muestra de heces de pacientes oncológicos	<i>Cateribacterium sp</i>
<b>20</b>	Muestra de heces de pacientes oncológicos	<i>Clostridium perfringens</i>
<b>23</b>	Muestra de heces de pacientes oncológicos	<i>Cateribacterium</i>
<b>14</b>	Muestra de heces de pacientes oncológicos	<i>Clostridium perfringens</i>
<b>17</b>	Muestra de heces de pacientes oncológicos	<i>Escherichia coli</i>

Los sobrenadantes generados de las once bacterias aisladas del paciente P003 se utilizaron para determinar capacidad inhibitoria. Se realizaron dos tipos de ensayo, por un lado uno en medio líquido y otro en placa. El método en placa conocido como método del antibiograma disco es utilizado para determinar la sensibilidad bacteriana a antimicrobianos (71). El mismo consiste en depositar, sobre la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con determinados microorganismos, discos de papel impregnados con los diferentes sobrenadantes. Al momento en el que el disco impregnado con sobrenadante hace contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe y el sobrenadante difunde al agar.

De esta forma, el sobrenadante se difunde a través del agar y pasadas las 24 horas de incubación en caso de haber inhibición los discos se ven rodeados por un halo de inhibición.

Para este ensayo se evaluó la inhibición del crecimiento de una *K.pneumoniae* multirresistente. En la actualidad, las enterobacterias productoras de carbapenemasas (CPE) en el ámbito hospitalario, representan un verdadero problema. Las carbapenemasas son enzimas que hidrolizan antibióticos carbapenémicos, de esta forma las bacterias que expresan esta enzima adquieren resistencia a una gran parte de antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Poseen un amplio espectro de hidrólisis sobre antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos, entre ellos los carbapenémicos. Las carbapenemasas plasmídicas se pueden clasificar en tres clases: carbapenemasas clase A, carbapenemasas clase B y carbapenemasas clase D. Las enzimas de clase B tienen uno o dos iones zinc como cofactor enzimático, denominándose metalo-betalactamasas. Una de las principales metaloenzimas corresponde a NDM (por “New Delhi metallo-beta-lactamase”) (82).

La técnica de siembra incorporada utilizada para el crecimiento de *K.pneumoniae* consiste en introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo previamente generado) en el medio, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Con el programa ImageJ se procesaron las fotos correspondientes a cada una de las tres placas, se realizaron tres medidas de cada uno de los halos, a lo largo, a lo ancho y de forma diagonal. Se promediaron los datos obtenidos y luego se graficaron utilizando un gráfico de barras. El gráfico de barras muestra sobre el eje horizontal las muestras y sobre el eje vertical la medida del halo en cm. El gráfico fue realizado en Graphpad Prisma con estadística ANOVA. El análisis de varianza (ANOVA) de un factor es un método estadístico para examinar las diferencias en las medias de tres o más grupos.



**Figura 20.** Gráfico de barras elaborado en Graphpad Prisma 9 del promedio en cm de los halos de inhibición producidos por los sobrenadantes en un cultivo incorporado con *K.Pneumoniae*. Ctrl (-): medio LB Ctrl (+): tetraciclina 10g/mL.

Como se observa en el gráfico (Figura 20), el halo de inhibición del control positivo fue el de mayor diámetro. Para el control positivo se utilizó tetraciclina. La tetraciclina es un antibiótico que pertenece a la clase de las tetraciclinas, donde también se encuentran doxiciclina, minociclina, demeclociclina, entre otros. Abarcan un amplio espectro en su actividad antimicrobiana y pueden utilizarse contra bacterias gram-negativas, como *K.pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Vibrio*. Actúan fundamentalmente como bacteriostáticos a las dosis habituales y poseen diversos mecanismos de acción como la inhibición de la síntesis proteica en el ribosoma. Se esperaba observar un halo de inhibición ya que la *K.pneumoniae* estudiada es del tipo NDM y es resistente tan solo a antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

A continuación, se observa el control negativo, donde se utilizó medio LB. La medida fue considerablemente más pequeña que el control positivo, que era lo esperado ya que el LB líquido no debería inhibir el crecimiento de la bacteria. Seguidamente, se observan los resultados para los once sobrenadantes, donde todos poseen medidas mayores al control negativo. Para el sobrenadante 18, no se determinó un gran halo de inhibición, mientras que los sobrenadantes para 2, 22, 4 y 20 fueron los que registraron un mayor tamaño.

#### **4.6. Comparación del cambio de turbidez de un cultivo líquido de *K.pneumoniae* con y sin sobrenadantes.**

Se seleccionaron los sobrenadantes 2, 22, 4 y 20. De acuerdo a la Tabla 11 estos sobrenadantes corresponden a *Enterococcus hirae*, *Cateribacterium sp*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium perfringens* respectivamente.

Para determinar qué antibiótico utilizar como control de inhibición, se registró el cambio de turbidez del medio líquido LB inoculado con *K.pneumoniae*. Se evaluó la efectividad de tres antibióticos mediante ensayo de antibiograma en placa analizaron tres antibióticos pasados las 24 horas de incubación a 37°C, tetraciclina (10mg/mL), sulfamida (10mg/mL) y vancomicina (10mg/mL). Se observó mayor inhibición de crecimiento al utilizar tetraciclina, registrando los valores más pequeños mientras que la vancomicina (10 mg/mL) y la sulfamida (10 mg/mL) mostraron valores superiores, indicando una inhibición parcial. En este ensayo se utilizó un blanco y un control de crecimiento de la bacteria.

La evaluación de la susceptibilidad de la bacteria frente a los sobrenadantes se realizó por el método de microdilución, cuya lectura se basa en el indicador de cambio de turbidez. Por un plazo de 7 horas se midió la turbidez con intervalos de 2 horas y con esos valores se realizó una curva de crecimiento (Figura 21). Se realizaron seis medidas por condición que luego se promediaron. Como control de crecimiento se utilizó medio líquido LB inoculado con *K.pneumoniae*. Como era de esperarse estos pocillos fueron los que registraron un mayor crecimiento. Como estándar de inhibición se utilizó el medio líquido LB inoculado con *K.pneumoniae* con tetraciclina. En estos pocillos no se observó crecimiento. Para el sobrenadante 2 se registró un cambio en la turbidez, lo que indica que si hubo crecimiento. Aun así, se observa una inhibición parcial ya que la variación de la turbidez en el control de crecimiento fue significativamente mayor. Para los otros tres sobrenadantes restantes los resultados fueron semejantes a los obtenidos para los pocillos con antibióticos, lo que indica que posiblemente los sobrenadantes inhibieron el crecimiento de la bacteria multirresistente.

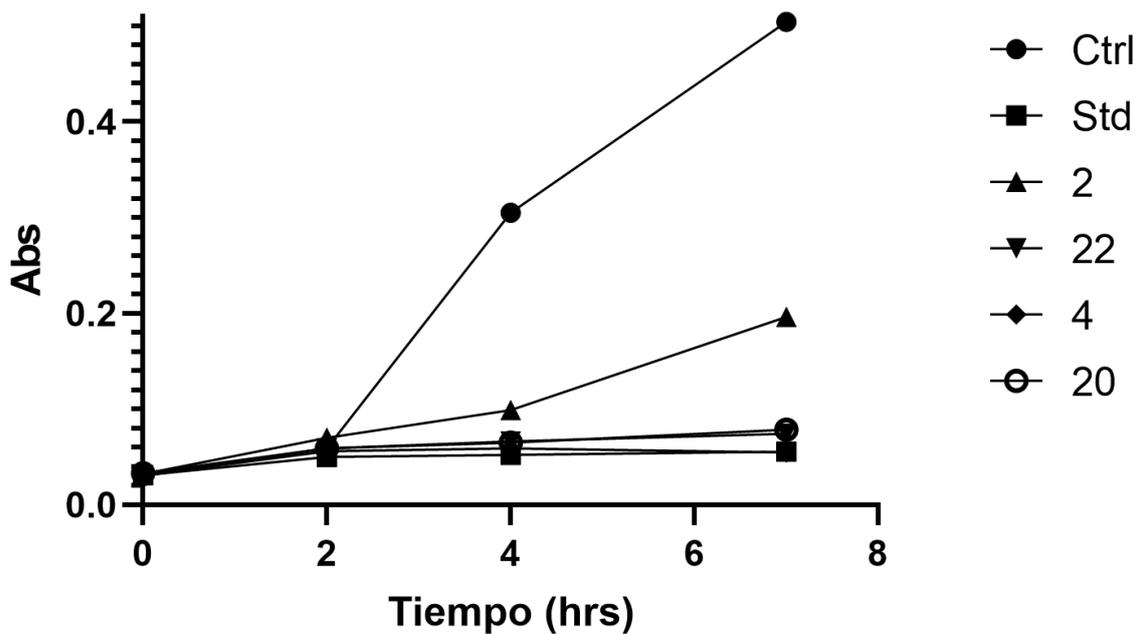


Figura 21. Curva de crecimiento de *K.pneumoniae* bajo diferentes condiciones. Se midió la turbidez a 600 nm.

#### 4.7. Identificación de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) a partir de gutSMASH.

Dado que los metabolitos microbianos también participan en la regulación de la inmunidad tumoral se decidió utilizar el genoma completo de las cuatro bacterias, utilizadas en el ensayo de inhibición en medio líquido aisladas del paciente P003, para estudiar y determinar el potencial metabólico. Utilizando gutSMASH se realizó una predicción de clúster de genes metabólicos anaeróbicos nuevos o conocidos. El programa logró identificar clusters de genes asociados a ciertas rutas metabólicas. Las vías metabólicas anaeróbicas que predice gutSMASH se pueden dividir en diferentes clases según su producto. La clase que predomina en los resultados son SCFA (Tabla 12), es decir, ácidos grasos de cadena corta, con 5 átomos de carbono como máximo. Los SCFA principales son acetato, piruvato, fumarato, butirato y propionato. Estos ácidos grasos de cadena pueden mediar la respuesta antiinflamatoria. Poseen la capacidad de inducir a las células T reguladoras, asimismo, interactúan con células T CD8+ y aumentar su efecto antitumoral (83). Por lo tanto, las bacterias aisladas del paciente P003 poseen cluster de genes asociadas a rutas metabólicas vinculadas a la generación de SCFA que pueden contribuir a una mejor respuesta a la inmunoterapia debido a su capacidad para mediar la respuesta inmune antitumoral.

**Tabla 12.** Resultados de gutSMASH

<b>Tipo</b>	<b>Clase</b>	<b>Cluster similares conocidos</b>	<b>ID</b>	<b>Microorganismo</b>
De piruvato a acetato-fumarato	SCFA	De piruvato a acetato-fumarato <i>E. coli</i>	22	<i>Catenibacterium</i>
Piruvato: ferredoxina oxidorreductasa	SCFA	PFOR <i>B. thetaiotaomicron</i>	4	<i>C. perfringens</i>
De piruvato a acetato-fumarato	SCFA	De piruvato a acetato-fumarato <i>C. acetobutylicum</i>	4	<i>C. perfringens</i>
Arginina a putrescina	Amina alifática	Arginina a putrescina <i>R. gnavus</i>	4	<i>C. perfringens</i>
Vía de la etanolamina	SCFA-otro	Degradación de Etanolamina <i>S. typhimurium</i>	4	<i>C. perfringens</i>
Clúster de genes de acetato a butirato	SCFA	Clúster de genes de acetato a butirato <i>C. sporogenes</i>	4	<i>C. perfringens</i>
Arginina a Bicarbonato	Otro	Arginina a Bicarbonato <i>P. aeruginosa</i>	4	<i>C. perfringens</i>
Degradación de propanodiol	SCFA-otro	Degradación de propanodiol <i>S. entérica</i>	4	<i>C. perfringens</i>
Vía de la etanolamina	SCFA-otro	Degradación de etanolamina <i>S. typhimurium</i>	4	<i>C. perfringens</i>

Degradación de propanodiol	SCFA-otro	Degradación de propanodiol <i>S. entérica</i>	4	<i>C. perfringens</i>
De piruvato a acetato-formato	SCFA	De piruvato a acetato-formato <i>C. acetobutylicum</i>	20	<i>C. perfringens</i>
Piruvato: ferredoxina oxidorreductasa	SCFA	PFOR <i>B. thetaiotaomicron</i>	20	<i>C. perfringens</i>
Clúster de genes de acetato a butirato	SCFA	Clúster de genes de acetato a butirato <i>C. sporogenes</i>	20	<i>C. perfringens</i>
Arginina a putrescina	Amina alifática	Arginina a putrescina <i>R. gnavus</i>	20	<i>C. perfringens</i>
Arginina a Bicarbonato	Otro	Arginina a Bicarbonato <i>P. aeruginosa</i>	2	<i>E. hirae</i>
Piruvato: ferredoxina oxidorreductasa	SCFA	PFOR <i>B. thetaiotaomicron</i>	2	<i>E. hirae</i>
De piruvato a acetato-formato	SCFA	De piruvato a acetato-formato <i>E. coli</i>	2	<i>E. hirae</i>

#### 4.8. Identificación de péptidos y metabolitos especializados/secundarios con antiSMASH.

También se utilizó el programa antismash, para identificar genes involucrados en la producción de péptidos y metabolitos especializados/secundarios que tuvieran una posible actividad antimicrobiana contra el patógeno multirresistente hospitalario *K. pneumoniae*.

AntiSMASH predice la producción de ciertos metabolitos mediante la identificación de ciertos cluster de genes involucrados en la biosíntesis (BGCs), regulación y transporte de metabolitos.

Entre ellos se encontraron rantipéptidos, terpenos y lantipéptidos, estudiados por sus propiedades antimicrobianas. A su vez, se halló un cluster de genes que se relaciona con las enzimas PKS de tipo III que desempeñan funciones críticas en la biosíntesis de importantes metabolitos secundarios, que van desde moléculas de señalización hasta productos naturales bioactivos.

**Tabla 13.** Tabla de metabolitos secundarios producidos por cepas intestinales.

<b>Tipo</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>ID</b>
Rantipéptido	<i>C.perfringens</i>	20
Autoinductor de lactona cíclica	<i>C.perfringens</i>	20
PKS tipo III	<i>E.hirae</i>	2
Terpenos	<i>E. hirae</i>	2
Lantipéptido clase II	<i>E.hirae</i>	2
Autoinductor de lactona cíclica	<i>E.hirae</i>	2
Rantipéptido	<i>C.perfringens</i>	4
Lantipéptido clase II	<i>C.perfringens</i>	4

Específicamente, el análisis del genoma de las bacterias pertenecientes al género *Clostridium* identificó BGCs involucrados en la producción de metabolitos que exhiben actividad antibiótica contra importantes patógenos. Por un lado, los rantipéptidos, que son péptidos ricos en Cys (también conocido como SCIFF) principalmente producidos por este grupo de bacterias. A este grupo pertenecen péptidos como freyrasina y termocelina, que se

caracterizan por tener una alta actividad inhibitoria contra bacterias multirresistentes. Debido a su estrecho espectro antibacteriano, son inofensivos para las células de los mamíferos, no conducen a la resistencia a los medicamentos (74).

Por lo tanto, la inhibición del crecimiento *K.pneumoniae* en medio líquido puede deberse a la generación de estos metabolitos naturales, anteriormente mencionados, por parte de las bacterias entéricas aisladas del paciente P003.

## 5. Conclusiones:

---

Recientemente se descubrió la capacidad de la microbiota intestinal en modular el sistema inmunológico del huésped. Los inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI) son una de las inmunoterapias contra el cáncer más innovadoras para varios tipos de cáncer y amplían significativamente las opciones terapéuticas de los pacientes. Sin embargo, no todos los pacientes muestran una respuesta efectiva o desarrollan efectos adversos. Más importante aún, se demostró que la respuesta terapéutica se puede predecir utilizando biomarcadores específicos o mejorar o disminuir mediante la modulación del microbioma intestinal.

La caracterización de los aislamientos obtenidos a partir de la microbiota intestinal permitió determinar la presencia de ciertos géneros de interés en la microbiota de pacientes oncológicos. A partir de los resultados de este trabajo se creó exitosamente un biobanco de microorganismos de pacientes respondedores con cepas identificadas a nivel de especie mediante la tecnología Oxford Nanopore.

De las técnicas dependientes de cultivo, se encontraron diferencias en el crecimiento de bacterias en diferentes medios y con el tratamiento previo de las muestras.

En conjunto los resultados obtenidos sugieren que la composición bacteriana de pacientes oncológicos respondedores a la inmunoterapia de inhibidores de puntos de control coincide en varios aspectos con investigaciones anteriores realizadas. La caracterización de la microbiota intestinal podría en un futuro utilizarse como posible predictor de la respuesta a la inmunoterapia.

En un segundo lugar, el proyecto planteaba el estudio de bacterias entéricas aisladas de pacientes que pudieran presentar carácter inhibitorio frente a bacterias patógenas. Los resultados de los ensayos de inhibición determinaron la presencia de bacterias entéricas con carácter inhibitorio contra patógenos intestinales. El estudio de estas interacciones puede ayudar a dirigir nuevas intervenciones clínicas basadas en interacciones naturalmente presentes en el microbioma. La predicción de posibles clúster de genes involucrados en la generación de metabolitos naturales con carácter antimicrobiano subrayó la posibilidad de en un futuro utilizar

estas sustancias como alternativa o potenciador de los antibióticos convencionales, como posible solución a las bacterias multirresistentes.

## 6. Referencias Bibliográficas

---

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011 (accessed 2023 Feb 14);61(2):69–90. <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.20107>. doi:10.3322/caac.20107
2. Barrios E, Garau M. Cáncer: magnitud del problema en el mundo y en Uruguay, aspectos epidemiológicos. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2017 (accessed 2023 Feb 14);4(1):04–66. <http://www.anfamed.edu.uy/index.php/rev/article/view/270>. doi:10.25184/anfamed2017.4.1.2
3. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*. 2012 (accessed 2023 Feb 14);19(1):107–120. <http://www.nature.com/articles/cdd201196>. doi:10.1038/cdd.2011.96
4. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer Therapy. *Cancer*. 1994 (accessed 2023 Feb 14);73(8):2013–2026. [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(19940415\)73:8<2013::AID-CNCR2820730802>3.0.CO;2-J](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(19940415)73:8<2013::AID-CNCR2820730802>3.0.CO;2-J). doi:10.1002/1097-0142(19940415)73:8<2013::AID-CNCR2820730802>3.0.CO;2-J
5. Croce CM. Oncogenes and Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2008 (accessed 2023 Feb 14);358(5):502–511. <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra072367>. doi:10.1056/NEJMra072367
6. Parrales A, Iwakuma T. Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*. 2015 (accessed 2023 Feb 14);5. <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fonc.2015.00288/abstract>. doi:10.3389/fonc.2015.00288
7. Matthews HK, Bertoli C, de Bruin RAM. Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2022 (accessed 2023 Feb 14);23(1):74–88. <https://www.nature.com/articles/s41580-021-00404-3>. doi:10.1038/s41580-021-00404-3

8. Varol C. Tumorigenic Interplay Between Macrophages and Collagenous Matrix in the Tumor Microenvironment. In: Sagi I, Afratis NA, editors. *Collagen*. Vol. 1944. New York, NY: Springer New York; 2019. p. 203–220. (Methods in Molecular Biology). [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9095-5\\_15](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9095-5_15). doi:10.1007/978-1-4939-9095-5\_15
9. Lubbers R, van Essen MF, van Kooten C, Trouw LA. Production of complement components by cells of the immune system. *Clinical and Experimental Immunology*. 2017 (accessed 2023 Feb 14);188(2):183–194. <https://academic.oup.com/cei/article/188/2/183/6411968>. doi:10.1111/cei.12952
- 10 Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of Immune Evasion by Tumors. In: *Advances in Immunology*. Vol. 90. Elsevier; 2006. p. 51–81. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065277606900029>. doi:10.1016/S0065-2776(06)90002-9
11. Botticelli A, Pomati G, Cirillo A, Scagnoli S, Pisegna S, Chiavassa A, Rossi E, Schinzari G, Tortora G, Di Pietro FR, et al. The role of immune profile in predicting outcomes in cancer patients treated with immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:974087. doi:10.3389/fimmu.2022.974087
12. Gross L. Intradermal Immunization of C3H Mice against a Sarcoma That Originated in an Animal of the Same Line. *Cancer Research*. 1943 May 1 (accessed 2023 Feb 14). <https://www.semanticscholar.org/paper/Intradermal-Immunization-of-C3H-Mice-against-a-That-Gross/c1ea94ddbaf61772a08a2f494cb014802e66ecbd>
13. Borghaei H, Smith MR, Campbell KS. Immunotherapy of cancer. *European Journal of Pharmacology*. 2009;625(1–3):41–54. doi:10.1016/j.ejphar.2009.09.067
14. Huse M. The T-cell-receptor signaling network. *Journal of Cell Science*. 2009 (accessed 2023 Feb 14);122(9):1269–1273. <https://doi.org/10.1242/jcs.042762>. doi:10.1242/jcs.042762
15. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*. 2013 (accessed 2023 Feb 14);13(4):227–242. <http://www.nature.com/articles/nri3405>. doi:10.1038/nri3405
16. Rota G, Niogret C, Dang AT, Barros CR, Fonta NP, Alfei F, Morgado L, Zehn D, Birchmeier W, Vivier E, et al. Shp-2 Is Dispensable for Establishing T Cell Exhaustion and for

- PD-1 Signaling In Vivo. *Cell Reports*. 2018 (accessed 2023 Feb 14);23(1):39–49. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124718303553>. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.026
17. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 (accessed 2023 Feb 14);144(5):646–674. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867411001279>. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
18. Wang M, Jiang H, Liu X, Wang X. Biophysics involved in the process of tumor immune escape. *iScience*. 2022 (accessed 2023 Feb 14);25(4):104124. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004222003947>. doi:10.1016/j.isci.2022.104124
19. Loose D, Van de Wiele C. The immune system and cancer. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 2009;24(3):369–376. doi:10.1089/cbr.2008.0593
20. Teague RM, Kline J. Immune evasion in acute myeloid leukemia: current concepts and future directions. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2013 (accessed 2023 Feb 14);1(1):13. <https://doi.org/10.1186/2051-1426-1-13>. doi:10.1186/2051-1426-1-13
21. Wang M, Bu J, Zhou M, Sido J, Lin Y, Liu G, Lin Q, Xu X, Leavenworth JW, Shen E. CD8+T cells expressing both PD-1 and TIGIT but not CD226 are dysfunctional in acute myeloid leukemia (AML) patients. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*. 2018;190:64–73. doi:10.1016/j.clim.2017.08.021
22. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature Reviews. Cancer*. 2012;12(4):298–306. doi:10.1038/nrc3245
23. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology*. 2013;14(10):1014–1022. doi:10.1038/ni.2703
24. Chaudhary B, Elkord E. Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting. *Vaccines*. 2016;4(3):28. doi:10.3390/vaccines4030028

25. Schmitz F, Wolf D, Holderried TAW. The Role of Immune Checkpoints after Cellular Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(10):3650. doi:10.3390/ijms21103650
26. Korman AJ, Peggs KS, Allison JP. Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy. In: *Advances in Immunology*. Vol. 90. Elsevier; 2006. p. 297–339. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S006527760690008X>. doi:10.1016/S0065-2776(06)90008-X
27. Reyes SJ, González KB, Rodríguez C, Navarrete-Muñoz C, Salazar AP, Villagra A, Caglevic C, Hepp MI, Reyes SJ, González KB, et al. Actualización general de inmunoterapia en cáncer. *Revista médica de Chile*. 2020 (accessed 2023 Feb 14);148(7):970–982. [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0034-98872020000700970&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-98872020000700970&lng=es&nrm=iso&tlng=es). doi:10.4067/S0034-98872020000700970
28. Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *Journal of Experimental Medicine*. 1996 (accessed 2023 Feb 14);183(6):2541–2550. <https://rupress.org/jem/article/183/6/2541/21413/CTLA4-ligation-blocks-CD28dependent-T-cell>. doi:10.1084/jem.183.6.2541
29. Ponce CF, Marínez JDH, Redondo CS. Ctl-4, una molécula que inhibe la activación de los linfocitos T. *Revista Científica Salud Uninorte*. 2006 (accessed 2023 Feb 15);22(2). <https://rcientificas.uninorte.edu.co/index.php/salud/article/view/4095>
30. Lee KM, Chuang E, Griffin M, Khattri R, Hong DK, Zhang W, Straus D, Samelson LE, Thompson CB, Bluestone JA. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science (New York, N.Y.)*. 1998;282(5397):2263–2266. doi:10.1126/science.282.5397.2263
31. Molinero Muñoz M, Zamora Barrios MD, Martínez Sesmero JM, Molinero Muñoz M, Zamora Barrios MD, Martínez Sesmero JM. Efectividad y seguridad de inhibidores de puntos de control inmunitario en pacientes excluidos de ensayos clínicos. *Revista de la OFIL*. 2020 (accessed 2023 Feb 15);30(4):325–328. [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1699-714X2020000400010&lng=es&nrm=iso&tlng=es](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1699-714X2020000400010&lng=es&nrm=iso&tlng=es). doi:10.4321/s1699-714x2020000400012

32. Guarner F. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición Hospitalaria*. 2007 (accessed 2023 Mar 5);22:14–19. [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0212-16112007000500003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0212-16112007000500003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
33. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*. 2010 (accessed 2023 Feb 27);90(3):859–904. <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00045.2009>. doi:10.1152/physrev.00045.2009
34. Lee KA, Thomas AM, Bolte LA, Björk JR, de Ruijter LK, Armanini F, Asnicar F, Blanco-Miguez A, Board R, Calbet-Llopart N, et al. Cross-cohort gut microbiome associations with immune checkpoint inhibitor response in advanced melanoma. *Nature Medicine*. 2022 (accessed 2023 Feb 27);28(3):535–544. <https://www.nature.com/articles/s41591-022-01695-5>. doi:10.1038/s41591-022-01695-5
35. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, Fluckiger A, Messaoudene M, Rauber C, Roberti MP, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1–based immunotherapy against epithelial tumors. *Science*. 2018 (accessed 2022 Apr 23);359(6371):91–97. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aan3706>. doi:10.1126/science.aan3706
36. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets TV, Prieto PA, Vicente D, Hoffman K, Wei SC, et al. Gut microbiome modulates response to anti–PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2018 (accessed 2022 Apr 23);359(6371):97–103. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aan4236>. doi:10.1126/science.aan4236
37. Davar D, Dzutsev AK, McCulloch JA, Rodrigues RR, Chauvin J-M, Morrison RM, Deblasio RN, Menna C, Ding Q, Pagliano O, et al. Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti–PD-1 therapy in melanoma patients. *Science*. 2021 (accessed 2022 Apr 23);371(6529):595–602. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abf3363>. doi:10.1126/science.abf3363
38. Frankel AE, Coughlin LA, Kim J, Froehlich TW, Xie Y, Frenkel EP, Koh AY. Metagenomic Shotgun Sequencing and Unbiased Metabolomic Profiling Identify Specific Human Gut Microbiota and Metabolites Associated with Immune Checkpoint Therapy Efficacy

- in Melanoma Patients. *Neoplasia*. 2017 (accessed 2023 Feb 28);19(10):848–855.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1476558617302385>.  
doi:10.1016/j.neo.2017.08.004
39. Jandhyala SM. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*. 2015 (accessed 2023 Feb 27);21(29):8787. <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v21/i29/8787.htm>. doi:10.3748/wjg.v21.i29.8787
40. Tanner ACR, Kent RL, Holgerson PL, Hughes CV, Loo CY, Kanasi E, Chalmers NI, Johansson I. Microbiota of Severe Early Childhood Caries before and after Therapy. *Journal of Dental Research*. 2011 (accessed 2023 Feb 27);90(11):1298–1305.  
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034511421201>.  
doi:10.1177/0022034511421201
41. Conlon MA, Bird AR. The Impact of Diet and Lifestyle on Gut Microbiota and Human Health. *Nutrients*. 2014 (accessed 2023 Mar 11);7(1):17–44.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4303825/>. doi:10.3390/nu7010017
42. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, Creasy HH, Earl AM, FitzGerald MG, Fulton RS, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012 (accessed 2023 Feb 28);486(7402):207–214.  
<https://www.nature.com/articles/nature11234>. doi:10.1038/nature11234
43. Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre M-L, Luke JJ, Gajewski TF. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science*. 2018 (accessed 2022 Apr 23);359(6371):104–108.  
<https://www.science.org/doi/10.1126/science.aao3290>. doi:10.1126/science.aao3290
44. Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009 (accessed 2023 Mar 4);27(1):44–52.  
<https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-mecanismos-accion-antimicrobianos-S0213005X08000177>.  
doi:10.1016/j.eimc.2008.11.001

45. Castañeda Guillot C. Trasplante de microbiota fecal. *Revista Cubana de Pediatría*. 2019 (accessed 2023 Feb 27);91(3). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0034-75312019000300010&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-75312019000300010&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
46. Patangia DV, Anthony Ryan C, Dempsey E, Paul Ross R, Stanton C. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *MicrobiologyOpen*. 2022 (accessed 2023 Feb 28);11(1):e1260. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/mbo3.1260>. doi:10.1002/mbo3.1260
47. Elkrief A, Derosa L, Kroemer G, Zitvogel L, Routy B. The negative impact of antibiotics on outcomes in cancer patients treated with immunotherapy: a new independent prognostic factor? *Annals of Oncology*. 2019 (accessed 2023 Feb 28);30(10):1572–1579. (Incidence and mortality of nasopharyngeal carcinoma). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923753419609671>. doi:10.1093/annonc/mdz206
48. Zhao S, Gao G, Li W, Li X, Zhao C, Jiang T, Jia Y, He Y, Li A, Su C, et al. Antibiotics are associated with attenuated efficacy of anti-PD-1/PD-L1 therapies in Chinese patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2019 (accessed 2023 Feb 28);130:10–17. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169500219303034>. doi:10.1016/j.lungcan.2019.01.017
49. Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, Benyamin FW, Man Lei Y, Jabri B, Alegre M-L, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*. 2015 (accessed 2023 Feb 28);350(6264):1084–1089. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aac4255>. doi:10.1126/science.aac4255
50. Chaput N, Lepage P, Coutzac C, Soularue E, Le Roux K, Monot C, Boselli L, Routier E, Cassard L, Collins M, et al. Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017;28(6):1368–1379. doi:10.1093/annonc/mdx108
51. Browne HP, Forster SC, Anonye BO, Kumar N, Neville BA, Stares MD, Goulding D, Lawley TD. Culturing of ‘unculturable’ human microbiota reveals novel taxa and extensive

sporulation. *Nature*. 2016 (accessed 2023 May 13);533(7604):543–546. <https://www.nature.com/articles/nature17645>. doi:10.1038/nature17645

52. Fraher MH, O’Toole PW, Quigley EMM. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2012 (accessed 2023 Feb 27);9(6):312–322. <http://www.nature.com/articles/nrgastro.2012.44>. doi:10.1038/nrgastro.2012.44

53. Md. SS-G, Diego-Álvarez D, Buades C, Romera-López A, Pérez-Cabornero L, Valero-Hervás D, Cantalapedra D, Bioinformatics, Felipe-Ponce V, Hernández-Poveda G, et al. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES GENÉTICAS: DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO AL DIAGNÓSTICO GENÓMICO CON LA SECUENCIACIÓN MASIVA. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2015 (accessed 2023 Feb 27);26(4):458–469. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0716864015000942>. doi:10.1016/j.rmclc.2015.07.004

54. McNulty CAM, Richards J, Livermore DM, Little P, Charlett A, Freeman E, Harvey I, Thomas M. Clinical relevance of laboratory-reported antibiotic resistance in acute uncomplicated urinary tract infection in primary care. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006 (accessed 2023 Mar 4);58(5):1000–1008. <https://academic.oup.com/jac/article-lookup/doi/10.1093/jac/dkl368>. doi:10.1093/jac/dkl368

55. Li Y, Rebuffat S. The manifold roles of microbial ribosomal peptide-based natural products in physiology and ecology. *Journal of Biological Chemistry*. 2020 (accessed 2023 Mar 13);295(1):34–54. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925817495482>. doi:10.1074/jbc.REV119.006545

56. Porefile: a Nextflow full-length 16S profiling pipeline for ONT reads. 2023 (citado 2023 Mar 1). <https://github.com/microgenlab/porefile>

57. lab DH. megan-ce. (citado 2023 Mar 9); disponible desde 202 <https://github.com/husonlab/megan-ce>

58. gutSMASH. (citado 2023 May 13). <https://gutsplash.bioinformatics.nl/>

59. antiSMASH bacterial version. (citado 2023 May 13). <https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>

60. 2018-Criterios-de-Evaluación-en-Tumores-Sólidos-1.1-RECIST-1.1-en-pacientes-con-Cáncer-Primario-yo-Metastásico-o-Enfermedad-Metastásica-Recurrente.pdf. (accessed 2023 Mar 5). <http://www.investigacionyposgrado.uadec.mx/site/wp-content/uploads/2020/07/2018-Criterios-de-Evaluaci%C3%B3n-en-Tumores-S%C3%B3lidos-1.1-RECIST-1.1-en-pacientes-con-C%C3%A1ncer-Primario-yo-Metast%C3%A1sico-o-Enfermedad-Metast%C3%A1sica-Recurrente.pdf>
61. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes & Nutrition*. 2011 (accessed 2023 Mar 1);6(3):209–240. <http://genesandnutrition.biomedcentral.com/articles/10.1007/s12263-011-0229-7>. doi:10.1007/s12263-011-0229-7
62. Duncan SH, Barcenilla A, Stewart CS, Pryde SE, Flint HJ. Acetate Utilization and Butyryl Coenzyme A (CoA):Acetate-CoA Transferase in Butyrate-Producing Bacteria from the Human Large Intestine. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002 (accessed 2023 Mar 1);68(10):5186–5190. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.68.10.5186-5190.2002>. doi:10.1128/AEM.68.10.5186-5190.2002
63. Lee P-C, Wu C-J, Hung Y-W, Lee CJ, Chi C-T, Lee I-C, Yu-Lun K, Chou S-H, Luo J-C, Hou M-C, et al. Gut microbiota and metabolites associate with outcomes of immune checkpoint inhibitor-treated unresectable hepatocellular carcinoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2022 (accessed 2023 Mar 19);10(6):e004779. <https://jitc.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jitc-2022-004779>. doi:10.1136/jitc-2022-004779
64. Álvarez J, Fernández Real JM, Guarner F, Gueimonde M, Rodríguez JM, Saenz de Pipaon M, Sanz Y. Microbiota intestinal y salud. *Gastroenterología y Hepatología*. 2021 (accessed 2023 Mar 2);44(7):519–535. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0210570521000583>. doi:10.1016/j.gastrohep.2021.01.009
65. Afouda P, Hocquart M, Pham T-P-T, Kuete E, Ngom II, Dione N, Valles C, Bellali S, Lagier J-C, Dubourg G, et al. Alcohol pretreatment of stools effect on culturomics. *Scientific Reports*. 2020 (accessed 2023 Mar 2);10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7089995/>. doi:10.1038/s41598-020-62068-x

66. Montalban-Arques A, Katkeviciute E, Busenhardt P, Bircher A, Wirbel J, Zeller G, Morsy Y, Borsig L, Glaus Garzon JF, Müller A, et al. Commensal Clostridiales strains mediate effective anti-cancer immune response against solid tumors. *Cell Host & Microbe*. 2021 (accessed 2023 Mar 4);29(10):1573-1588.e7. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312821003772>. doi:10.1016/j.chom.2021.08.001
67. Derrien M, Belzer C, de Vos WM. Akkermansia muciniphila and its role in regulating host functions. *Microbial Pathogenesis*. 2017 (accessed 2022 Apr 23);106:171–181. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0882401015301789>. doi:10.1016/j.micpath.2016.02.005
68. Rosenbaum M, Knight R, Leibel RL. The gut microbiota in human energy homeostasis and obesity. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2015 (accessed 2023 Feb 28);26(9):493–501. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043276015001356>. doi:10.1016/j.tem.2015.07.002
69. Derosa L, Routy B, Thomas AM, Iebba V, Zalcman G, Friard S, Mazieres J, Audigier-Valette C, Moro-Sibilot D, Goldwasser F, et al. Intestinal Akkermansia muciniphila predicts clinical response to PD-1 blockade in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Nature Medicine*. 2022 (accessed 2022 Apr 23);28(2):315–324. <https://www.nature.com/articles/s41591-021-01655-5>. doi:10.1038/s41591-021-01655-5
70. Khan MAW, Ologun G, Arora R, McQuade JL, Wargo JA. Gut Microbiome Modulates Response to Cancer Immunotherapy. *Digestive Diseases and Sciences*. 2020 (accessed 2023 May 13);65(3):885–896. <http://link.springer.com/10.1007/s10620-020-06111-x>. doi:10.1007/s10620-020-06111-x
71. Dai Z, Zhang J, Wu Q, Fang H, Shi C, Li Z, Lin C, Tang D, Wang D. Intestinal microbiota: a new force in cancer immunotherapy. *Cell Communication and Signaling*. 2020 (accessed 2023 May 13);18(1):90. <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-020-00599-6>. doi:10.1186/s12964-020-00599-6
72. Griffin ME, Espinosa J, Becker JL, Luo J-D, Carroll TS, Jha JK, Fanger GR, Hang HC. Enterococcus peptidoglycan remodeling promotes checkpoint inhibitor cancer immunotherapy. *Science (New York, N.Y.)*. 2021;373(6558):1040–1046. doi:10.1126/science.abc9113

73. Picazo JJ. Procedimientos en Microbiología Clínica.
74. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007;20(3):440–458, table of contents. doi:10.1128/CMR.00001-07
75. Hu Y, Le Leu RK, Christophersen CT, Somashekar R, Conlon MA, Meng XQ, Winter JM, Woodman RJ, McKinnon R, Young GP. Manipulation of the gut microbiota using resistant starch is associated with protection against colitis-associated colorectal cancer in rats. *Carcinogenesis*. 2016;37(4):366–375. doi:10.1093/carcin/bgw019
76. Chen Y, Wang J, Li G, Yang Y, Ding W. Current Advancements in Sactipeptide Natural Products. *Frontiers in Chemistry*. 2021 (accessed 2023 Mar 11);9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2021.595991>

## 7. Anexo

---

Soluciones:

### **Medio YCFA Agar (500 mL)**

Triptona 5.0g

Extracto de Levadura 1.25g

NaHCO<sub>3</sub> 2.0g

(D)+Glucosa 1.0g

(D)+Maltosa 1.0g

(D)+Celobiosa 1.0g

L-cisteína 0.5g

Solución Mineral I 75ml

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3g

H<sub>2</sub>O 1L

Solución Mineral II 75ml

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3g

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6g

NaCl 6g

MgSO<sub>4</sub> 0.6g

CaCl<sub>2</sub> (dry) 0.6g

H<sub>2</sub>O 1L

Solución de Resazurina 0.5ml

Resazurina 0,1 g

H<sub>2</sub>O hasta 100 mL

Solución de Hemina 5ml

KOH 0,28 g

Etanol 95% 25 mL

Heamina 0,1 g

H<sub>2</sub>O hasta 100 mL

Solución de Vitamínica I 0.5ml

Biotina 5 mg

Cobalamina (Vitamina B12) 5 mg

Ácido 4-aminobenzoico 15 mg

Ácido fólico 25 mg

Piridoxina 75 mg

H<sub>2</sub>O hasta 500 mL

H<sub>2</sub>O hasta 500ml

Mix de ácidos grasos volátiles 3.1ml

Ácido acético 17 mL

Ácido propiónico 6 mL

Ácido valérico 1 mL

Ácido isovalérico 1 mL

Ácido isobutírico 1 mL

NaOH para ajustar el pH hasta 7.45

Después de autoclavar

Solución vitamínica II 0.5ml

Clorhidrato de tiamina 25 mg

Riboflavina 25 mg

H<sub>2</sub>O hasta 500 mL

#### **Medio BHI Agar (500 mL)**

BHI 26 g

L-cisteína 0,5 g

Resazurina 0,5 mL (0,1%)

Agar 5 g

#### **Medio BHI suplementado con mucina (500 mL)**

BHI 26 g

L-cisteína 0,5 g

Resazurina 0,5 mL (0,1%)

Agar 5 g

Mucina

#### **LB Agar (500 mL)**

20 g de medio LB

500 mL de H2

### Código Porefile

```
nextflow run microgenlab/porefile --fq 'path/to/*.fastq' --minimap2
```

### Cálculos:

Cálculo del volumen inicial de inóculo para una concentración final  $1 \times 10^6$  ufc/mL en 50 mL de volumen final de medio de cultivo.

$$1 \text{ OD} = 1 \times 10^9 \text{ ufc/mL}$$

$$0,24 \text{ OD} = X$$

$$X = 2,4 \times 10^8 \text{ ufc/mL}$$

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i}$$

$$V_i = 208 \text{ uL}$$