



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

**Departamento de Medicina**

**Facultad de Medicina y Odontología**

Programa de Doctorado en Medicina

**MICROBIOTA INTESTINAL, ¿NUEVO  
BIOMARCADOR EN CÁNCER DE PULMÓN NO  
MICROCÍTICO?**

**TESIS DOCTORAL** presentada por:

Feiyu Zhang

**Directores:**

Dr. Carlos Camps Herrero

Dra. Eloísa Jantus-Lewintre

**Valencia 2021**



**CARLOS CAMPS HERRERO**, Dr. por la Universitat de València, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universitat de València y Jefe del Servicio de Oncología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (HGUV).

**CERTIFICA:**

Que Don **Feiyu Zhang**, ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral que lleva por título “Microbiota intestinal, ¿nuevo biomarcador en cáncer de pulmón no microcítico?”. Dicha tesis reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación para optar al título de Doctor por la Universitat de València.

Valencia, 13 de julio de 201.

Dr. Carlos Camps Herrero

D.N.I.: 22517021N



*Prof. Carlos Camps  
Catedrático de Medicina  
Facultad de Medicina  
Universitat de València*



**ELOÍSA JANTUS-LEWINTRE**, Dra. por la Universidad de Valencia, Jefa del Laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación del Hospital General Universitario de Valencia y Profesora Titular del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia

**CERTIFICA:**

Que Don **Feiyu Zhang**, ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral que lleva por título “**Microbiota intestinal, ¿nuevo biomarcador en cáncer de pulmón no microcítico?**”. Dicha tesis reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación para optar al título de Doctor por la Universitat de València.

Valencia, 13 de julio de 2021.

  
Dra. Eloísa Jantus-Lewintre

D.N.I.: 24474835Y



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a todas aquellas personas que colaboraron en hacer realidad esta tesis doctoral.

Al Dr. Carlos Camps Herrero, por permitirme formar parte de su gran equipo de trabajo, por su experiencia, sus consejos y su exigencia, y porque siempre nos ha motivado a aprender y a superarnos.

A la Dra. Eloísa Jantus-Lewintre, por su acogida en el laboratorio y sabios consejos. Muchas gracias por su enorme apoyo, su actitud académica seria y rigurosa que han pasado por mi vida de investigación y han contribuido en mi proceso de aprendizaje y crecimiento profesional.

A la Dra. Macarena Ferrero Gimeno, por todo su tiempo, dedicación y profesionalidad, por ser un ejemplo de trabajo y esfuerzo, y por todo lo mucho que he aprendido junto a ella. Gracias, porque sin su ayuda no habría sido posible llevar a término esta tesis.

A la Dra. Silvia Calabuig Fariñas, por sus valiosos aportes y participación en el proyecto, apoyo incondicional y su valiosa aportación científica durante el desarrollo de este proyecto.

A todos los compañeros y amigos de la Fundación de Investigación: Andrea Moreno, Alejandro Herreros, Elena Duréndez, Susana Torres, Marais Mosqueda, Sandra Gallach, Eva Escorihuela, Mariluz, Sara, Valentina y Eva (PD-L1), amigos venezolanos (Franklin Herrera y Héctor Amado), y los que han pasado por allí durante estos años. Como el castellano no es mi lengua materna, todos ellos me han ayudado un montón a mejorar el idioma; como estoy viviendo fuera de mi país, todos ellos me han acompañado en valencia y me han hecho sentir como en casa; así como cada vez que me he sentido deprimido o en los momentos que han sido duros, siempre me han animado.

Al Servicio de Oncología Médica del Hospital General de Valencia, médicos, residentes, data managers, enfermeras, etc., por toda su ayuda y por su importante labor y dedicación.

Especialmente a los pacientes, ya que gracias a su colaboración han permitido tanto la realización de este trabajo como el continuo avance en la investigación contra el cáncer.

A la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO), especialmente a Giuseppe D'Auria y Mariana Reyes Prieto, por sus ayudas en parte de secuenciación.

Al Programa China Scholarship Council (CSC) por ofrecerme la beca para los estudiantes chinos para estudiar en el extranjero.

Pero sobre todo, si a alguien le he de dedicar esta tesis, es a mi familia. Agradecer a mis padres, hermanos y sobrinos, por confiar en mí, por vuestro apoyo, porque siempre me habéis animado y habéis dado todo por mí, quiero decirles que “能成为你们的家人, 是我这辈子最幸运的事情 (Ser tu familia es lo más afortunado de mi vida)”. Especialmente deseo dar las gracias a Dong Ning, por su apoyo incondicional, por sus sonrisas y por haberme rescatado en las situaciones difíciles, quiero que sepas que esta tesis doctoral no sólo es mía, sino es de nosotros dos.



## RESUMEN

El cáncer de pulmón es el tumor con mayor mortalidad a nivel mundial. La microbiota intestinal es considerada como un “nuevo órgano” del cuerpo humano. Estudios recientes demuestran que la microbiota intestinal puede tener un impacto en la respuesta inmune antitumoral. El objetivo principal de este estudio es caracterizar la microbiota intestinal en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) en estadios avanzados tratados con inhibidores de los puntos de control inmunitario (ICIs).

Para ello, se realizó la secuenciación del gen 16S ribosomal RNA en muestras fecales de 69 pacientes con CPNM avanzado y se estudió la diversidad y la composición microbiana, así como su correlación con las características clínico-patológicas, la respuesta al tratamiento con ICIs y el pronóstico.

El análisis de los datos de la secuenciación reveló que la diversidad microbiana se relacionaba con el uso previo de antibióticos y con el desarrollo de toxicidad dermatológica inmunorelacionada. Respecto a la respuesta a ICIs, el grupo de pacientes con alta abundancia relativa de *Phascolarctobacterium* presentaba el beneficio clínico, y un incremento de la supervivencia libre de progresión (SLP). Por otra parte, el grupo de pacientes con alta abundancia relativa de *Dialister* presentaba peor respuesta, y una disminución tanto en la SLP como en la supervivencia global. Además, el análisis de regresión de Cox multivariante mostró que tanto la presencia de toxicidades relacionadas con ICIs como la abundancia de *Dialister* tenían un valor pronóstico independiente en nuestra cohorte de pacientes.

Por tanto, nuestros resultados muestran que la microbiota intestinal puede ser utilizada como un biomarcador predictivo y/o pronóstico en pacientes con CPNM en estadios avanzados tratados con ICIs.

## SUMMARY

Lung cancer is the most deadly tumor in the world. The gut microbiota is considered as a “new organ” of the human body. Recent studies have found that the gut microbiota can have an impact on the antitumor immune response. The aim of this study is to characterize the gut microbiota in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with immune checkpoint inhibitors (ICIs).

The 16S ribosomal RNA gene sequencing was performed from stool samples of 69 advanced NSCLC patients. We analyzed the microbial diversity and composition, and its correlation with clinicopathological characteristics, response to ICIs treatment and prognosis.

Analysis of sequencing data revealed that microbial diversity was related to the previous use of antibiotics and dermatological toxicity related to ICIs. Regarding the response to ICIs, the group of patients with a high relative abundance of *Phascolarctobacterium* showed clinical benefit, and prolonged progression-free survival (PFS). On the other hand, the group of patients with a high relative abundance of *Dialister* presented worse response, and reduced PFS and overall survival. Moreover, multivariate Cox regression analysis revealed that the presence of ICIs-related toxicity and *Dialister* might be considered as independent prognostic biomarkers in this cohort of patients.

Therefore, our results show that the gut microbiota might be used as predictive and/or prognostic biomarkers in patients with advanced NSCLC treated with ICIs.

## RESUM

El càncer de pulmó és el tumor amb major mortalitat a nivell mundial. La microbiota intestinal és considerada com un “nou òrgan” del cos humà, i estudis recents han trobat que la microbiota intestinal pot tindre un impacte en la resposta immune antitumoral. L'objectiu principal d'aquest estudi és caracteritzar la microbiota intestinal en pacients amb càncer de pulmó no microcític (CPNM) en estadis avançats tractats amb inhibidors dels punts de control immunes (ICIs).

Per fer l'estudi, es va realitzar la seqüenciació del gen 16S en mostres d'excrements de 69 pacients amb CPNM avançat yes van estudiar la diversitat i la composició microbiana, així com la seua correlació amb les característiques clinicopatològiques, la resposta al tractament amb ICIs i el pronòstic .

L'anàlisi de les dades de la seqüenciació va revelar que la diversitat microbiana es relacionava amb l'ús previ d'antibiòtics i la toxicitat dermatològica immunorelacionada. Respecte a la resposta a ICIs, el grup de pacients amb alta abundància relativa de *Phascolarctobacterium* presentava una la millor resposta, i un increment de la supervivència lliure de progressió (SLP). D'altra banda, el grup de pacients amb alta abundància relativa de *Dialister* presentava una pitjor resposta, així com una menor SLP i supervivència global. A més, l'anàlisi de regressió de Cox multivariant va mostrar que tant la presència de toxicitats relacionades amb els ICIs com l'abundància de *Dialister* tenien un valor pronòstic independent en la nostra cohort de pacients.

Per tant, els nostres resultats mostren que la microbiota intestinal pot ser utilitzada com a biomarcador predictiu i/o pronòstic en pacients amb CPNM en estadis avançats tractats amb ICIs.



# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1. Cáncer .....	3
1.1. Características del cáncer .....	3
1.2. Cáncer de pulmón .....	4
1.3. Diagnóstico y estadificación del cáncer de pulmón .....	6
1.4. Clasificación del cáncer de pulmón .....	8
1.5. Tratamiento del cáncer de pulmón .....	9
1.6. Inmunoterapia .....	11
1.7. Búsqueda de biomarcadores .....	14
2. Microbiota .....	16
2.1. Concepto de microbiota .....	16
2.2. Microbiota y cáncer .....	17
2.3. Microbiota e inmunidad .....	19
2.4. Factores que modifican la comunidad microbiana .....	23
2.5. Microbiota y su relación con las terapias oncológicas .....	25
2.6. Metodologías para el análisis de la microbiota .....	31
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
1. Objetivo principal .....	35
2. Objetivos específicos .....	35
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
1. Pacientes y muestras .....	39
1.1. Pacientes .....	39
1.2. Variables demográficas y clínico-patológicas .....	39
1.3. Muestras .....	41
2. Extracción del DNA .....	42
3. Secuenciación de nueva generación (NGS) .....	43
3.1. Preparación de librería .....	43
3.1.1. Amplificación de fragmentos V3 y V4 .....	44

3.1.2. Limpieza de amplicones.....	45
3.1.3. Ligación de índices a amplicones.....	46
3.1.4. Segunda limpieza de amplicones.....	47
3.1.5. Validación de librerías .....	48
3.1.6. Cuantificación, normalización y combinación de librerías.....	48
3.1.7. Desnaturalización y carga de librerías para secuenciar .....	48
3.2. Secuenciación.....	49
3.3. Procesamiento de las secuencias .....	51
3.4. Análisis de resultados de secuenciación .....	52
4. Análisis estadístico.....	53
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
1. Análisis descriptivo de las características clínico-patológicas de la población.....	57
2. Análisis descriptivo de la microbiota intestinal de la población .....	60
2.1. Análisis de los datos de secuenciación .....	60
2.2. Análisis de la composición microbiana intestinal .....	61
3. Análisis de las características de microbiota intestinal en pacientes con CPNM avanzado tratados con ICIs .....	65
3.1. Características clínico-patológicas.....	65
3.1.1. Correlación con la evolución clínica.....	65
3.1.2. Correlación con la microbiota intestinal .....	70
3.2. Toxicidad relacionada con ICIs.....	78
3.2.1. Correlación con el resultado clínico.....	78
3.2.2. Correlación con la microbiota intestinal .....	81
3.3. Microbiota intestinal y el resultado clínico.....	86
3.3.1. Diversidad microbiana intestinal .....	86
3.3.2. Composición microbiana intestinal.....	92
3.3.3. Análisis multivariante .....	101
4. Integración de los resultados .....	106
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>109</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>113</b>

<b>VII. ANEXOS .....</b>	<b>137</b>
1. Tablas suplementarias.....	139
2. Aprobación CEIm .....	144
3. Documento de información al paciente y consentimiento informado .....	146
4. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos .....	152
5. Financiación .....	160
6. Comunicaciones a congresos derivadas de la tesis doctoral.....	160
7. Publicación derivada de la tesis doctoral .....	163
8. Otras publicaciones.....	184





## LISTADO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

**ACP:** Análisis de componentes principales

**AGCCs:** Ácidos grasos de cadena corta

**APC:** Célula presentadora de antígeno

**BCD:** Beneficio clínico duradero

**CDs:** Células dendríticas

**CI:** Control inmunitario

**CPM:** Cáncer de pulmón microcítico

**CPNM:** Cáncer de pulmón no microcítico

**CTLA-4:** Antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**FA:** Fuga anastomótica

**FDA:** Administración de Medicamentos y Alimentos

**FIAF:** Factor adiposo inducido por el ayuno

**FISABIO:** Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana

**GZMB:** Granzima B

**HR:** *Hazard ratio*

**IC:** Intervalo de confianza

**ICIs:** Inhibidores de los puntos de control inmunitario

**IFN:** Interferón

**IgA:** Inmunoglobulina A

**IL:** Interleucina

**IMC:** Índice masa corporal

**IMS:** Inestabilidad de microsatélites

**LDA:** Análisis discriminante lineal

**LefSe:** Tamaño del efecto del análisis discriminante lineal

**LPS:** Lipopolisacárido

**MAMPs:** Patrones moleculares asociadas a microorganismos

**MMR:** Reparación de apareamiento erróneos

**NGS:** Secuenciación de nueva generación

**NLRs:** Receptores tipo Nod

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PAMPs:** Patrones moleculares asociadas a patógenos

**PD-1:** Proteína 1 de muerte programada

**PDHs:** Péptidos de defensa del huésped

**PD-L1:** Ligando de la proteína 1 de muerte programada

**PERMANOVA:** Análisis de varianza permutacional multivariado

**PRRs:** Receptores de reconocimiento de patrones

**PS:** Estado funcional

**RECIST:** Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos

**REDECAN:** Red Española de Registros de Cáncer

**RMN:** Resonancia magnética nuclear

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno

**rRNA:** Ácido ribonucleico ribosomal

**SG:** Supervivencia global

**SLP:** Supervivencia libre de progresión

**TAC:** Tomografía axial computarizada

**Th:** Células T *helper*

**TKI:** Inhibidores de tirosina kinasa

**TLRs:** Receptores tipo Toll

**TMB:** Carga mutacional tumoral

**TMF:** Trasplante de microbiota fecal

**TPS:** Score de proporción del tumor

**Tregs:** Células T reguladoras

**TCR:** Receptor de linfocitos T

**MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad

**NLM:** Nódulo linfático mesentérico

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las diez propiedades del cáncer propuestas por Hanahan y Weinberg .....	4
Figura 2. Tasas estimadas de incidencia y mortalidad del cáncer. ....	5
Figura 3. Incidencia y mortalidad estimadas para los principales tipos de cáncer según el sexo en el año 2021. ....	6
Figura 4. Evolución de la clasificación del CPNM de histológica a molecular. ....	9
Figura 5. Resumen de los fármacos utilizados en la terapia dirigida en cáncer, según las alteraciones moleculares. ....	11
Figura 6. Anticuerpos inhibidores de los puntos de control inmunitario. ....	12
Figura 7. Esquema conceptual del eje intestino-pulmón .....	23
Figura 8. Posibles mecanismos utilizados por la microbiota intestinal para modular el tratamiento del cáncer .....	30
Figura 9. Esquema del complejo ribosómico y del gen 16S rRNA .....	32
Figura 10. Componentes del <i>EasySampler-Complete Stool Collection Kit</i> . ....	41
Figura 11. Esquema del protocolo usado para la secuenciación de las regiones V3 y V4 del gen 16S rRNA. ....	44
Figura 12. Accesorio de placa <i>TruSeq Index</i> . ....	46
Figura 13. Amplificación en puente y secuenciación por síntesis mediante terminadores reversibles según el método de <i>Illumina</i> ®. ....	50
Figura 14. Gráfico circular de la composición filogenética de los taxones más comunes a nivel de género en el global de las muestras del estudio. ....	63
Figura 15. Gráfico de barras de la composición filogenética de los taxones más comunes a nivel de género en cada paciente del estudio. ....	63
Figura 16. Curva de supervivencia Kaplan-Meier de SLP y SG de acuerdo a variables demográficas y clínico-patológicas. ....	69
Figura 17. Relación entre el índice de Chao 1 y la antibioticoterapia. ....	72
Figura 18. Análisis de componentes principales basado en la composición microbiana intestinal entre pacientes sin y con antibioticoterapia. ....	73

Figura 19. Análisis de LEfSe basado en la composición microbiana intestinal de acuerdo al uso de antibióticos previos a ICIs.....	74
Figura 20. Curva de supervivencia Kaplan-Meier de SLP y SG de acuerdo a la toxicidad relacionada con ICIs.....	80
Figura 21. Relación entre los índices de alfa-diversidad y la toxicidad dermatológica relacionada con ICIs.....	83
Figura 22. Análisis de componentes principales basado en la composición microbiana intestinal entre pacientes sin y con toxicidad dermatológica.....	83
Figura 23. Análisis de LEfSe basado en la composición microbiana intestinal según la presencia de toxicidad dermatológica.....	85
Figura 24. Relación entre los índices de alfa-diversidad y la respuesta a ICIs. ....	87
Figura 25. Relación entre los índices de alfa-diversidad y la respuesta según la línea de tratamiento con ICIs. ....	88
Figura 26. Análisis de componentes principales basado en la composición microbiana intestinal entre pacientes con BCD y no-BCD. ....	89
Figura 27. Análisis de componentes principales basado en la composición microbiana intestinal entre pacientes con BCD y no-BCD según la línea de tratamiento con ICIs.....	89
Figura 28. Diagrama de Venn basado en la composición microbiana intestinal según la respuesta a ICIs.....	92
Figura 29. Gráficos UpSet que ilustran la intersección cuantitativa de los microorganismos exclusivos para pacientes con BCD y no-BCD. ....	93
Figura 30. Análisis de LEfSe basado en la composición microbiana intestinal según la respuesta a ICIs.....	95
Figura 31. Relación entre la abundancia relativa de <i>Phascolarctobacterium</i> y <i>Dialister</i> con la respuesta a ICIs.....	96
Figura 32. Relación entre la abundancia relativa de <i>Phascolarctobacterium</i> y <i>Dialister</i> con la respuesta, según la línea de tratamiento con ICIs.....	97
Figura 33. Curva de supervivencia Kaplan-Meier para SLP y SG de acuerdo a la abundancia relativa de <i>Phascolarctobacterium</i> y <i>Dialister</i> . ....	99
Figura 34. Curva de supervivencia Kaplan-Meier para SLP y SG de acuerdo a la abundancia	

relativa de <i>Phascolarctobacterium</i> y <i>Dialister</i> según la línea de tratamiento con ICIs. ....	101
Figura 35. Resultado del modelo de regresión de Cox multivariante que incluye todas las variables significativas. ....	102
Figura 36. Resultado del modelo de regresión de Cox multivariante para los pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea. ....	103
Figura 37. Resultado del modelo de regresión de Cox multivariante para los pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea. ....	103
Figura 38. Características de la microbiota intestinal en los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico tratados con los inhibidores de los puntos de control inmunitario (ICIs). ....	107



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadificación del cáncer de pulmón según la octava edición del sistema de clasificación TNM .....	8
Tabla 2. Componentes de la reacción para amplificación V3 y V4. ....	45
Tabla 3. Programa de ciclado para la reacción de amplificación. ....	45
Tabla 4. Componentes de la reacción para la ligación. ....	47
Tabla 5. Programa de ciclado de amplificación de las reacciones de ligación. ....	47
Tabla 6. Características demográficas y clínico-patológicas de los pacientes. ....	58
Tabla 7. Eventos adversos órgano-específicos más frecuentes en la cohorte de estudio. ....	59
Tabla 8. Análisis de calidad de los datos de secuenciación. ....	60
Tabla 9. Datos de secuencias iniciales y tras la aplicación de filtros. ....	61
Tabla 10. Microorganismos dominantes de las diferentes categorías taxonómicas. ....	62
Tabla 11. Índices de alfa-diversidad. ....	64
Tabla 12. Correlación entre las características demográficas y clínico-patológicas con la respuesta a ICIs. ....	65
Tabla 13. Resultados del análisis de regresión de Cox según las variables clínico-patológicas. ....	67
Tabla 14. Relación entre los índices de alfa-diversidad y las características demográficas. ....	70
Tabla 15. Relación entre los índices de alfa-diversidad y las características clínico-patológicas. ....	71
Tabla 16. Relación entre los índices de alfa-diversidad y la frecuencia del consumo de alimento. ....	77
Tabla 17. Correlación entre la toxicidad relacionada con ICIs y la respuesta. ....	78
Tabla 18. Resultados del análisis de regresión Cox basado en la toxicidad relacionada con ICIs. ....	79
Tabla 19. Relación entre los índices de alfa-diversidad y las toxicidades relacionadas con ICIs. ....	81
Tabla 20. Resultados del análisis de regresión de Cox basado en índices de alfa-diversidad. ....	90
Tabla 21. Resultados del análisis de regresión de Cox basado en índices de alfa-diversidad	

según la línea de tratamiento con ICIs. ....	91
Tabla 22. Resultados del análisis de regresión de Cox basado en abundancia relativa de <i>Phascolarctobacterium</i> y <i>Dialister</i> . ....	98
Tabla 23. Resultados del análisis de regresión de Cox basado en la abundancia relativa de <i>Phascolarctobacterium</i> y <i>Dialister</i> según la línea de tratamiento con ICIs. ....	100
Tabla S1. Descriptores T, N, M en la octava edición del sistema de clasificación TNM. ....	139
Tabla S2. Correlación entre las principales características clínico-patológicas y la respuesta según la línea de tratamiento con ICIs. ....	140
Tabla S3. Resultados del análisis de regresión de Cox basado en variables clínico-patológicas según la línea de tratamiento con ICIs. ....	142



# I. INTRODUCCIÓN



# 1. Cáncer

Cáncer es el término genérico con el que se denomina a un conjunto de enfermedades relacionadas que se caracterizan por un crecimiento celular descontrolado y que puede afectar a cualquier parte del organismo.

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. A nivel global, se estiman 19,3 millones de nuevos casos de cáncer y casi 10,0 millones de muertes por cáncer en 2020 [1]. Según los datos de Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), la estimación del número de nuevos casos de cáncer en España para el año 2021 será de 276.239 (exceptuando cáncer de piel no melanoma), un número ligeramente superior al del año 2020.

## 1.1. Características del cáncer

En el año 2000, Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg publicaron un artículo definiendo seis características principales que presentan las células tumorales [2]. Posteriormente, en el año 2011, estos mismos autores publicaron una nueva revisión, a la que se sumaron otras cuatro características, en las que se incluyen la complejidad de la biología tumoral y la contribución del microambiente tumoral (**Figura 1**) [3]. A continuación se enumeran estas 10 propiedades del cáncer:

1. Independencia de señales de crecimiento
2. Insensibilidad a estímulos que inhiben el crecimiento
3. Evasión de la apoptosis
4. Capacidad de invasión y metástasis
5. Potencial replicativo ilimitado
6. Inducción de la angiogénesis
7. Reprogramación del metabolismo energético
8. Evasión de la vigilancia inmunológica

- 9. Inflamación sostenida
- 10. Inestabilidad genómica

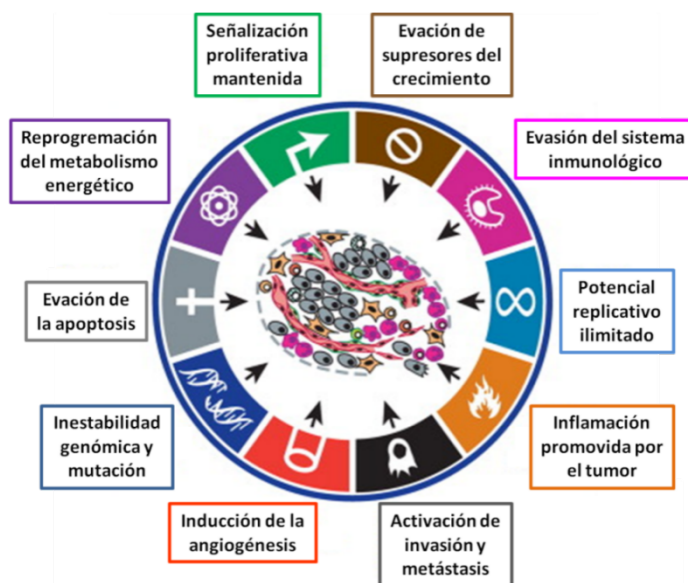
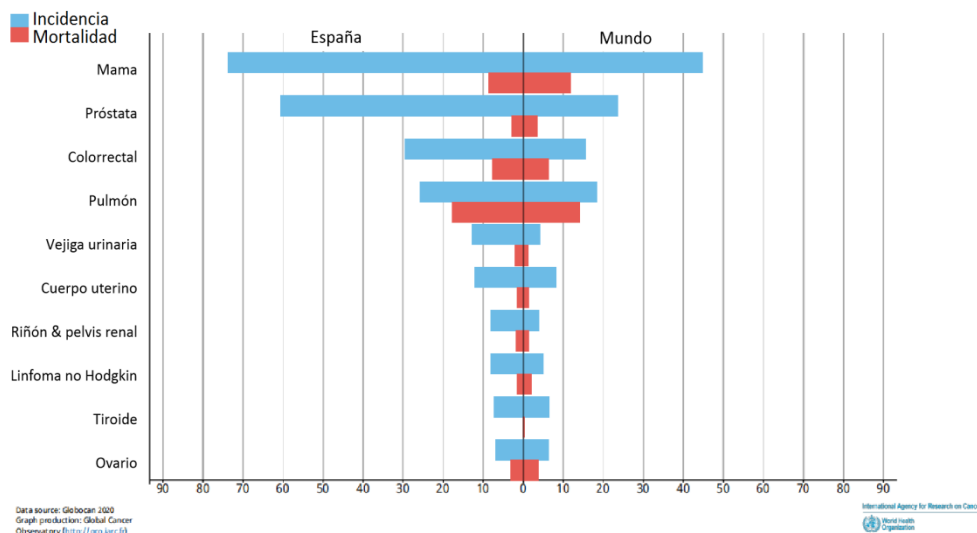


Figura 1. Las diez propiedades del cáncer propuestas por Hanahan y Weinberg (adaptado y traducido de [3]).

## 1.2. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es el tumor maligno con mayor mortalidad en ambos sexos, representando un problema importante de salud pública. Según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la tasa estimada de incidencia del cáncer de pulmón ocupa el cuarto lugar en España y el tercer lugar a nivel mundial, sin embargo, la tasa estimada de mortalidad lo sitúa en primer lugar tanto en España como en el mundo en el año 2020 [1] (Figura 2).





**Figura 2. Tasas estimadas de incidencia y mortalidad del cáncer.**

Fuente: GLOBOCAN 2020 (<http://gco.iarc.fr/>).

Con respecto al sexo, el cáncer del pulmón es el segundo en incidencia (**Figura 3A**) tanto para hombres como para mujeres aunque, como indicamos anteriormente, ocupa el primer lugar en mortalidad (**Figura 3B**) según las estimaciones para el año 2021 [4].

La etiología del cáncer de pulmón aún no ha sido totalmente elucidada. Sin embargo, el principal factor de riesgo para desarrollar cáncer de pulmón es el hábito tabáquico [5]. Más de 60 compuestos químicos del humo del tabaco presentan poder carcinogénico, entre ellos los hidrocarburos policíclicos aromáticos, N-nitrosaminas y aminas aromáticas son agentes que han demostrado ser mutagénicos, produciendo alteraciones en el ácido desoxirribonucleico (DNA) [6–8]. Aunque el tabaco es el factor etiológico más relevante, muchos casos de cáncer de pulmón ocurren en pacientes que nunca han sido fumadores, sugiriendo otros factores de riesgo. En este sentido, la exposición ambiental o laboral a contaminantes cancerígenos, así como la exposición involuntaria al humo de tabaco también representan factores etiológicos importantes [9–11]. Además, las enfermedades respiratorias preexistentes, el consumo frecuente de alcohol, la mala alimentación también son considerados como factores de riesgo [12].

**A**

Nuevos casos estimados						
			Hombre	Mujer		
Próstata	248,530	26%			Mama	281,550 30%
Pulmón & bronquios	119,100	12%			Pulmón & bronquios	116,660 13%
Colorrectal	79,520	8%			Colorrectal	69,980 8%
Vejiga urinaria	64,280	7%			Cuerpo uterino	66,570 7%
Melanoma	62,260	6%			Melanoma	43,850 5%
Riñón & pelvis renal	48,780	5%			Linfoma no Hodgkin	35,930 4%
Linfoma no Hodgkin	45,630	5%			Tiroides	32,130 3%
Cavidad oral & faringe	38,800	4%			Páncreas	28,480 3%
Leucemia	35,530	4%			Riñón & pelvis renal	27,300 3%
Páncreas	31,950	3%			Leucemia	25,560 3%
<b>Todos los sitios</b>	<b>970,250</b>	<b>100%</b>	<b>Todos los sitios</b>	<b>927,910</b>	<b>100%</b>	

**B**



Muertes estimadas						
			Hombre	Mujer		
Pulmón & bronquios	69,410	22%			Pulmón & bronquios	62,470 22%
Próstata	34,130	11%			Mama	43,600 15%
Colorrectal	28,520	9%			Colorrectal	24,460 8%
Páncreas	25,270	8%			Páncreas	22,950 8%
Hígado & vía biliar intrahepática	20,300	6%			Ovario	22,950 5%
Leucemia	13,900	4%			Cuerpo uterino	12,940 4%
Esófago	12,410	4%			Hígado & vía biliar intrahepática	9,930 3%
Vejiga urinaria	12,260	4%			Leucemia	9,760 3%
Linfoma no Hodgkin	12,170	4%			Linfoma no Hodgkin	8,550 3%
Cerebro & otro sistema nervioso	10,500	3%			Cerebro & otro sistema nervioso	8,100 3%
<b>Todos los sitios</b>	<b>319,420</b>	<b>100%</b>	<b>Todos los sitios</b>	<b>289,150</b>	<b>100%</b>	

Figura 3. Incidencia (A) y mortalidad (B) estimadas para los principales tipos de cáncer según el sexo en el año 2021 [4].

### 1.3. Diagnóstico y estadificación del cáncer de pulmón

En la práctica clínica, el diagnóstico del cáncer de pulmón en estadios tempranos representa un reto debido principalmente a la ausencia de síntomas iniciales específicos en los pacientes y, aproximadamente el 75% de los pacientes tienen una enfermedad avanzada en el momento del diagnóstico [13].

Los síntomas y signos iniciales más comunes del cáncer de pulmón son tos crónica (65,0%), seguido por esputo hemoptoico (33,0%) y dolor en el tórax (17,9%) [14]. Los exámenes complementarios más utilizados para el diagnóstico de cáncer de pulmón son diagnóstico por imagen [rayos X, tomografía axial computarizada (TAC) o resonancia magnética nuclear (RMN)] y las biopsias que se realizarán siguiendo diferentes estrategias

dependiendo del tamaño y localización de la posible lesión tumoral (fibrobroncoscopia, biopsia de ganglios linfáticos, punción pulmonar percutánea, mediastinoscopia, toracoscopia). Sin duda, el análisis histológico es el "patrón oro" para poder concluir con el proceso diagnóstico [15]. Además, el cáncer de pulmón es una enfermedad molecularmente heterogénea, y las alteraciones moleculares son parámetros fundamentales para completar un diagnóstico adecuado, por lo que un diagnóstico completo en este tipo de tumores debe ir acompañado siempre de un estudio molecular que permitirá luego tomar decisiones sobre el tipo de abordaje terapéutico que mejor se adapte a las características de cada paciente y de cada tumor [16].

En cuanto a la estadificación del cáncer de pulmón, el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer y la Unión Internacional para el Control del Cáncer a través de consensos que se van adaptando cada cierto tiempo, utilizan el sistema de estadificación TNM como el sistema para determinar el estadio de los diferentes tipos de cánceres [17]. El TNM consta de 3 parámetros, **T**: tamaño del tumor primario, **N**: infiltración de nódulos linfáticos, **M**: presencia de metástasis locales o a distancia. Para el cáncer de pulmón, la clasificación actualmente vigente de TNM es la octava edición (**Tabla S1**) y según la combinación de **T**, **N** y **M**, podemos categorizar clínicamente a este tumor en cuatro estadios principales que van del I al IV (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Estadificación del cáncer de pulmón según la octava edición del sistema de clasificación TNM [17].**

T y M	N0	N1	N2	N3
<b>T1a</b>	IA1	IIB	IIIA	IIIB
<b>T1b</b>	IA2	IIB	IIIA	IIIB
<b>T1c</b>	IA3	IIB	IIIA	IIIB
<b>T2a</b>	IB	IIB	IIIA	IIIB
<b>T2b</b>	IIA	IIB	IIIA	IIIB
<b>T3</b>	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
<b>T4</b>	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
<b>M1a</b>	IVA	IVA	IVA	IVA
<b>M1b</b>	IVA	IVA	IVA	IVA
<b>M1c</b>	IVB	IVB	IVB	IVB

Combinando los factores T (tamaño del tumor primario), N (infiltración de nódulos linfáticos) y M (presencia de metástasis), el cáncer se clasifica en estadios I, II, III o IV, los cuales se subdividen en A, B y C en algunos casos.

## 1.4. Clasificación del cáncer de pulmón

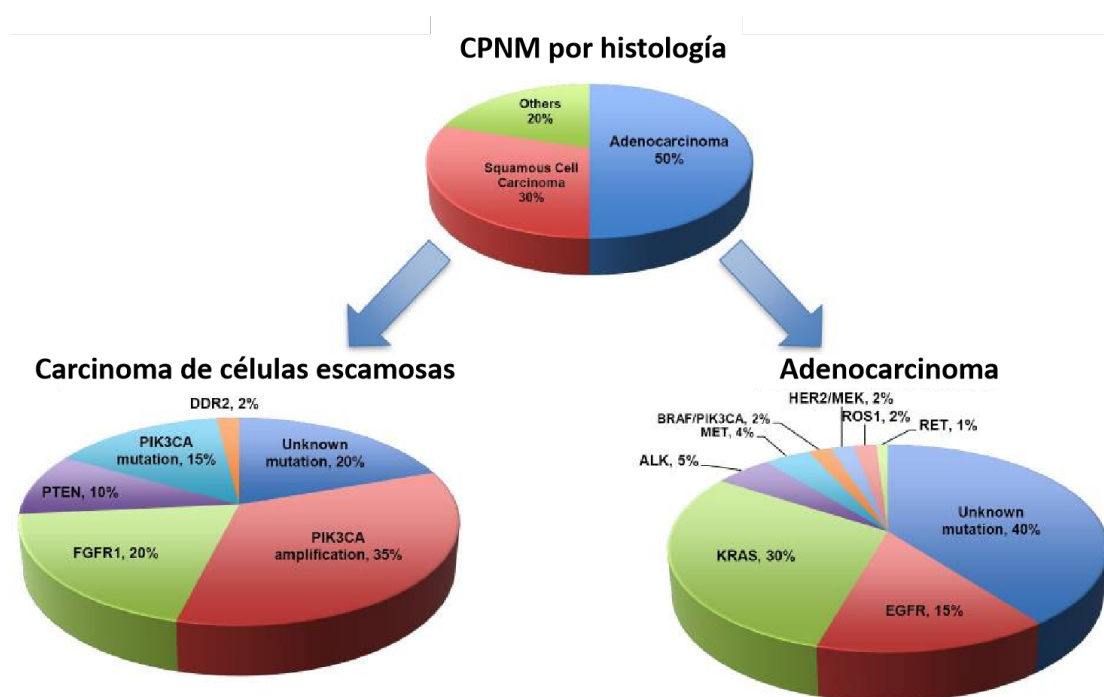
En la práctica el cáncer de pulmón se divide en 2 categorías principales [18]:

1. Cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (CPM), que representa el 15% de casos de cáncer de pulmón y se caracteriza por tener origen neuroendocrino.
2. Cáncer de pulmón de células no pequeñas, o no microcítico (CPNM), que representa el 85% de casos de cáncer de pulmón. Los subgrupos histológicos más frecuentes del CPNM son adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas o epidermoide.

En los últimos años, se han logrado grandes avances en la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares responsables de la iniciación, promoción y progresión



del cáncer de pulmón. Estos avances han llevado al descubrimiento de alteraciones moleculares específicas de subgrupos en CPNM. De esta manera, la clasificación del CPNM ha evolucionado desde una división basada en características histológicas hasta una clasificación molecular, basada en alteraciones genómicas que afectan genes implicados en la carcinogénesis (Figura 4). En adenocarcinoma, las alteraciones en los genes *KRAS* (30%), *EGFR* (15%) y *ALK* (5%) son las alteraciones moleculares más frecuentes. Por otra parte, las alteraciones más comunes en carcinoma de células escamosas son la amplificación de *PIK3CA* (35%) y alteraciones en *FGFR1* (20%) [19].



**Figura 4. Evolución de la clasificación del CPNM de histológica a molecular [18].**

CPNM: cáncer de pulmón no microcítico.

## 1.5. Tratamiento del cáncer de pulmón

En la actualidad, el tratamiento estándar del cáncer de pulmón generalmente incluye cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia y sus posibles combinaciones. La selección del tipo de tratamiento depende especialmente del tipo histológico, el estadio tumoral y el estado funcional (PS) del paciente, a lo que se debe añadir ahora el estudio de las alteraciones moleculares y características inmunológicas de cada

tumor.

La cirugía es aún el tratamiento estándar para pacientes con tumores en estadios tempranos (I-IIIa) y buen estado funcional. La extirpación quirúrgica completa del tumor es una elección importante para los estadios resecables, cuya intención es realizar un tratamiento curativo en estos pacientes, aunque algunos pacientes pueden desarrollar recurrencias. Sin embargo, en estadios avanzados cuando ya hay diseminación de la enfermedad, la cirugía no es el tratamiento más apropiado y se debe recurrir a terapias sistémicas. Por otra parte, la radioterapia del tipo estereotáctica es una opción en diferentes circunstancias médicas [20].

La quimioterapia es un tratamiento importante en CPNM y se recomienda para pacientes con CPNM en estadios avanzados sin alteraciones moleculares detectadas. Además, la quimioterapia puede utilizarse en adyuvancia y neoadyuvancia. La quimioterapia recomendada en cáncer de pulmón incluye agentes de platino, taxanos, etopósido, vinorelbina, pemetrexed y gemcitabina. Además, las combinaciones de estos medicamentos se han mostrado más eficaces que los agentes individuales [21,22].

Las terapias dirigidas contra dianas moleculares en el CPNM se empezaron a utilizar a finales de la década de 1990 con la introducción de los inhibidores de la actividad tirosina kinasa (TKI) específica de *EGFR*, marcando un cambio de paradigma en el tratamiento del CPNM. Los pacientes que se benefician de tratamientos con *EGFR*-TKIs son aquellos cuyos tumores presentan mutaciones activadoras en el gen *EGFR*. Desde entonces, el potencial de alteraciones genéticas en los genes diana como *EGFR*, *ALK*, *RET*, *HER2*, *PI3KCA*, *NTRK1*, *MET*, *ROS1*, *BRAF*, *MEK1* y *KRAS* han llevado al desarrollo de terapia dirigida. La siguiente figura muestra los fármacos actualmente disponibles (en diferentes fases de aprobación) para el tratamiento con dianas accionables (**Figura 5**).

<b>EGFR</b>	<b>ALK</b>	<b>RET</b>	<b>HER2</b>	<b>PIK3CA</b>
Gefitinib	Crizotinib	Cabozantinib	Neratinib+/-	LY3023414
Erlotinib	Alectinib	Vandetanib	Temsirolimus	PQR 3094
Afatinib	Ceritinib	Sunitinib	Afatinib	
Dacomitinib	Lorlatinib	Lenvetanib	Dacomatinib	
Osimertinib	Brigatinib	Alectinib	Poziotinib	<b>MEK1</b>
Nazartinib	Ensartinib	Ponatinib	Pyrotinib	Trametinib
Avimantanab		RXDX-105	TAK-788	Selumetinib
		Selpercatinib	Trastuzumab	Cobimetinib
		Pralsetinib	TDM-1	
			DS-8201a	
<b>NTRK1</b>	<b>MET</b>	<b>ROS1</b>	<b>BRAF</b>	<b>KRAS (G12C)</b>
Entrectinib	Crizotinib	Crizotinib	Vemurafenib	AMG510
Larotrectinib	Cabozantinib	Ceritinib	Dabrafenib	MRTX849
Loxo-195	Capmatinib	Lorlatinib	Encorafenib	
Cabozantinib	Savolitinib	Cabozantinib		
DS-6051b	Tepotinib	Entrectinib		
Repotrectinib	Merestinib	Ropotrectinib		
	Glesatinib	DS-6051b		

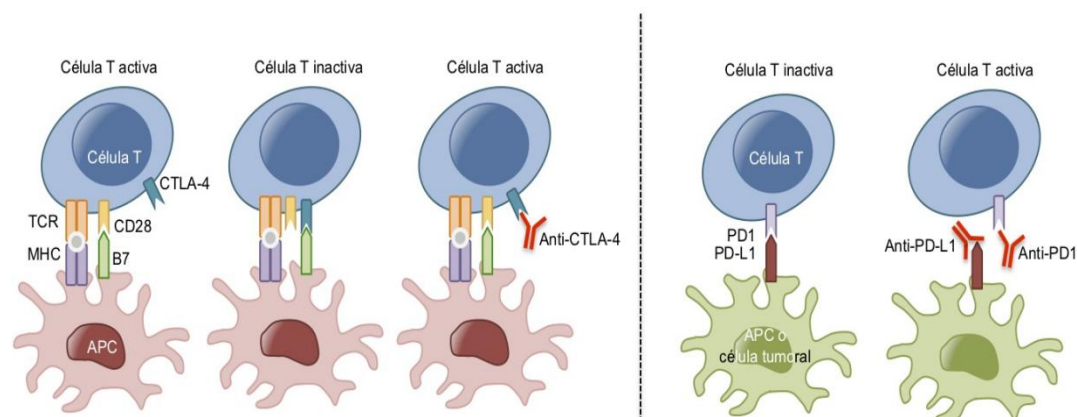
**Figura 5. Resumen de los fármacos utilizados en la terapia dirigida en cáncer, según las alteraciones moleculares.**

## 1.6. Inmunoterapia

En los últimos años, se han propuesto como puntos de intervención terapéutica varios mecanismos utilizados por las células tumorales para escapar del control inmunológico. En este sentido, se han desarrollado distintos tipos de inmunoterapia, como vacunas contra el cáncer, terapias con citocinas, anticuerpos monoclonales, virus oncolíticos, terapias con células CAR-T, etc. Además, entre las diferentes opciones terapéuticas, el bloqueo de los puntos de control inmunitario con anticuerpos monoclonales ha emergido como una estrategia prometedora para tratar el cáncer [23].

Los puntos de control inmunitario (CI) son una parte importante para el sistema inmunológico y regulan negativamente la duración y la magnitud de las respuestas inmunes para que no sean exacerbadas y conducir las nuevamente a la homeostasis tras su activación. Mediante la unión de las moléculas de puntos de CI y sus ligandos, se generan unas señales inhibitorias para frenar la activación de las células T. Por lo tanto, la inhibición de la señalización de estos receptores puede restablecer la inmunidad antitumoral. Actualmente, los inhibidores de los puntos de control inmunitario (ICIs) más relevantes son los anticuerpos contra el antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) y contra el eje proteína 1 de

muerte programada (PD-1) / ligando de la proteína 1 de muerte programada (PD-L1) (Figura 6).



**Figura 6. Anticuerpos inhibidores de los puntos de control inmunitario (Modificada de [24]).**

El antígeno presentado por el MHC en la APC es reconocido por TCR, cuando el MHC de la APC interactúa con el TCR se produce la activación de las células T, seguido por la interacción entre el CD28 y B7, segunda señal necesaria para la correcta activación de la célula T. CTLA-4 puede competir con CD28 por el receptor B7 y prevenir la activación de las células T. PD-1 interactúa con el ligando PD-L1 y bloquea la señal del TCR. El bloqueo de CTLA-4 o PD-1/PD-L1 con anticuerpos específicos podría activar las células T. CTLA-4: antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico; PD-1/PD-L1: proteína 1 de muerte programada/ ligando de la proteína 1 de muerte programada; TCR: receptor de linfocitos T; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; CD28: correceptor estimulador; B7: ligando de CD28; APC: célula presentadora de antígenos.

CTLA-4 es una proteína transmembrana de diferenciación de leucocitos que se expresa principalmente en linfocitos T activados. Tras la unión entre las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y los receptores de células T, se requiere una segunda señal co-estimuladora para que las células T se activen. Esta segunda señal corresponde a la unión entre el receptor co-estimulador CD28, expresado sobre la célula T, y su ligando B7, expresado en la superficie de la célula presentadora de antígeno (APC). CTLA-4, muy similar a CD28, puede unirse al ligando B7 de APC, inhibiendo tras su unión la activación del linfocito T [25]. En la etapa inicial de la respuesta inmunitaria predomina la unión entre CD28 y B7 debido al bajo nivel de expresión de CTLA-4. Sin embargo, con el aumento de la expresión de CTLA-4 en linfocitos T activados, la unión de CTLA-4 y B7 prevalece en la etapa tardía de la respuesta inmunitaria, resultando en la inhibición de la activación del linfocito T [26]. Ipilimumab, un anticuerpo monoclonal humano del tipo inmunoglobulina G1 dirigido a

CTLA-4, fue el primer ICI aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) para el tratamiento de melanoma metastásico [27].

PD-1, perteneciente a la familia de los receptores de tipo inmunoglobulina como CD28, se expresa principalmente en linfocitos T y B activados, y también en monocitos [28,29]. En condiciones normales, las señales inhibitorias inducidas por PD-1 tienen como objetivo impedir la sobreactivación de linfocitos T, evitando así la aparición de enfermedades autoinmunes. El aumento de expresión de PD-L1 se ha observado en muchos tumores malignos, incluyendo el CPNM [30], melanoma [31], tumores de próstata [32], de mama [33] o carcinoma de células renales [34]. Basados en el conocimiento de ésta vía y su importancia para la respuesta inmune antitumoral se desarrollaron bloqueantes tanto para PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) como para PD-L1 (atezolizumab y durvalumab). Desde 2019, la FDA ha aprobado pembrolizumab para el tratamiento en primera línea de pacientes con CPNM en estadios avanzados que no son candidatos a resección quirúrgica o quimiorradiación definitiva, desde entonces, los anti-CTLA-4 y anti-PD-1/PD-L1 han dado resultados excelentes en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, incluido el CPNM [35]. Además, el porcentaje estimado de pacientes con cáncer tratados con ICIs ha aumentado del 1,54 % en el año 2011 al 43,63 % en el año 2018 [36].

Aunque la aplicación de la inmunoterapia basada en ICIs ha logrado importantes beneficios clínicos, la toxicidad relacionada con este tipo de terapias es un evento que no puede ser ignorado. Los ICIs no se dirigen selectiva y específicamente a las células T infiltradas en los tumores, esto conlleva el riesgo de que la respuesta antitumoral deseada pueda ir acompañada de la activación involuntaria de respuestas inmunitarias no específicas de tumores contra autoantígenos expresados en las células sanas.

El perfil de toxicidad inmunomediada es muy distinto al de la quimioterapia convencional. Un metaanálisis comparativo entre quimioterapia y agentes anti-PD-1/PD-L1 en cáncer de pulmón y melanoma ha revelado que los pacientes tratados con quimioterapia presentan mayor incidencia de efectos secundarios (82,9% vs 67,6%) y efectos secundarios graves (35,7% vs 11,4%) que los pacientes tratados con ICIs. Entre los efectos secundarios

adversos de la quimioterapia se encuentran la astenia, diarrea, neuropatía y toxicidad hematológica [37]. En cuanto a las toxicidades de los agentes anti-PD-1/PD-L1, una revisión sistemática de pacientes con CPNM tratados con este tipo de anticuerpos muestra una incidencia global de eventos adversos del 64% con agentes anti-PD-1 y 66% con agentes anti-PD-L1, siendo la fatiga más común dentro de la toxicidad general y la toxicidad endocrina más común dentro de la toxicidad relacionada con ICIs del tipo órgano específico en ambas cohortes de pacientes [38]. Y los fármacos anti-CTLA-4 se asocian con tasas más altas de la toxicidad gastrointestinal y dermatológica, mientras, los fármacos anti-PD-1/PD-L1 se relacionan con un mayor riesgo de vitíligo y la toxicidad endocrina [39].

A pesar de los avances que se han producido en la inmunoterapia del cáncer, las respuestas al tratamiento con ICIs son muy heterogéneas y la tasa de respuesta global para el CPNM avanzado es alrededor del 20% [40–44]. El hecho de que todavía sean numerosos los pacientes que no responden a este tipo de terapia y de la posible aparición de efectos tóxicos graves en aquellos que responden ponen en evidencia la necesidad de identificar biomarcadores que mejoren la comprensión de las complejas interacciones entre el sistema inmune y el tumor, y que permitan una mejor selección de los pacientes que van a beneficiarse de estas intervenciones terapéuticas.

## 1.7. Búsqueda de biomarcadores

Un biomarcador es una característica que puede medirse y evaluarse de manera objetiva como un indicador de un proceso biológico normal, patológico o como respuesta a una intervención terapéutica. En oncología, un biomarcador puede ser un distintivo biológico producido por una respuesta específica del cuerpo humano a la presencia del cáncer o producido por el mismo tumor [45,46]. Los biomarcadores más empleados en oncología incluyen los biomarcadores de cribado, que identifican pacientes con mayor riesgo de desarrollar cáncer; los biomarcadores de diagnóstico, que alertan sobre la aparición de la enfermedad; los biomarcadores predictivos, que permiten evaluar la probabilidad de eficacia de una intervención terapéutica específica; y los biomarcadores pronóstico que

permiten evaluar la probabilidad de recurrencia o riesgo de progresión en un paciente, independientemente del tratamiento.

Con el desarrollo de la inmunoterapia, la identificación de biomarcadores predictivos y pronósticos en inmuno-oncología ha emergido como un área muy importante de investigación. En concreto, la investigación en el campo de los biomarcadores indaga sobre la caracterización de la relación entre el tumor y su microambiente, el sistema inmune, y las características del huésped.

Entre los biomarcadores identificados en inmuno-oncología, el nivel de expresión de PD-L1 es un biomarcador aprobado por la FDA en el año 2017 que presenta actualmente un uso generalizado para dirigir el uso de ICIs en algunos tipos tumorales [47]. Además, en el mismo año, la agencia europea de medicamento (EMA) reconoció también su aplicación como biomarcador para la inmunoterapia con pembrolizumab en primera y segunda línea para CPNM [48]. Diversos estudios han demostrado que la expresión de PD-L1, determinada por prueba de inmunohistoquímica, en células tumorales y/o células inmunes infiltradas en el tumor se asocia con la respuesta a los ICIs [49–51]. Sin embargo, aunque en la mayoría de ensayos existe una relación directa entre el nivel de expresión de PD-L1 y la probabilidad de respuesta a un ICI, todavía hay pacientes con PD-L1 indetectable o bajos niveles de expresión que también presentan beneficio clínico, y viceversa, pacientes con niveles elevados de expresión de PD-L1 que no presentan respuesta a terapias basadas en el uso de ICIs [52,53]. De hecho, el uso de este biomarcador todavía presenta varias limitaciones como la heterogeneidad temporal y espacial de la expresión de PD-L1, así como la variabilidad en los puntos de corte dentro y entre diferentes tipos de tumores [53,54].

Por otra parte, la carga mutacional tumoral (TMB), definida como el número de mutaciones no sinónimas identificadas en el genoma tumoral, también ha emergido como un biomarcador predictivo para identificar pacientes que se benefician de los tratamientos con ICIs en diferentes tipos de tumores sólidos [55]. Otros biomarcadores recientemente aprobados son: la determinación de la inestabilidad de microsatélites (IMS) y el análisis de defectos en el sistema reparación de apareamiento erróneos (MMR) que también se han

relacionado con un mayor beneficio clínico en cánceres metastásicos tratados con anti-PD-1 [56]. Sin embargo, estos biomarcadores también presentan limitaciones. Concretamente, para la TMB se requieren mejoras en cuanto a la estandarización de los puntos de cortes entre diferentes histologías tumorales. Además también está el hecho de que no todos los pacientes que presentan una alta TMB se beneficien de los ICIs, indicando que este biomarcador por sí solo no es el predictor perfecto para la selección de pacientes a tratarse con inmunoterapia [57]. En cuanto a la IMS/MMR, su correlación con inmunoterapia se informó por primera vez en cáncer colorrectal y después se han observado resultados similares en otros tipos de cáncer. Sin embargo, también hace falta un esfuerzo en la armonización de diferentes metodologías para la determinación del estado de IMS/MMR (PCR, secuenciación de nueva generación e inmunohistoquímica) ya que en algunos casos se han visto resultados discordantes [58].

Debido a los problemas de sensibilidad y especificidad de los biomarcadores existentes, la identificación de nuevos biomarcadores que permitan una mejor selección de pacientes y proporcionen indicaciones de eficacia y/o toxicidad de las terapias basadas en ICIs es una prioridad. En este sentido, estudios recientes sobre el uso potencial de la microbiota intestinal como biomarcador para la respuesta a la inmunoterapia abre nuevas puertas en la búsqueda de biomarcadores en inmuno-oncología.

## 2. Microbiota

### 2.1. Concepto de microbiota

El término de microbiota humana se refiere al conjunto de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que viven en el cuerpo humano, mientras que el término microbioma se refiere al conjunto de genomas o información genética de estos microorganismos [59,60]. El intestino humano alberga la comunidad microbiana más



compleja, la cual juega un importante papel tanto en el metabolismo como en la modulación del sistema inmunitario del individuo. La microbiota intestinal es heterogénea y se estima que puede estar integrada por más de 1000 especies bacterianas distintas. La cantidad de microorganismos en el lumen intestinal alcanza un número de  $10^{13}$ - $10^{14}$ , que es 10 veces mayor que el número de células humanas, y el número de genes que contiene esta comunidad de microorganismos es 100 veces superior al número de genes en el genoma humano. Estos microorganismos representan alrededor de 1 kg del peso corporal. Por lo tanto, la microbiota intestinal podría ser considerada como un “nuevo órgano” del cuerpo humano [61–63].

## 2.2. Microbiota y cáncer

Es bien sabido que muchos microorganismos están estrechamente relacionados con la aparición y el desarrollo de tumores. De hecho, las infecciones crónicas pueden llevar a la liberación continua de mediadores inflamatorios, de metabolitos potencialmente mutagénicos o de moduladores del ciclo celular, aumentando el riesgo de transformación celular y carcinogénesis. La relación entre determinados microorganismos con carcinogénesis en diferentes órganos, como el colon, el hígado y el pulmón, viene respaldada por numerosos estudios en modelos animales libres de gérmenes o tratados con antibióticos [64]. Así por ejemplo, estudios en modelos murinos de cáncer colorrectal han demostrado que los ratones libres de gérmenes presentan una reducción significativa en la carga tumoral intestinal [65]. En cuanto al cáncer gástrico, el modelo murino de gastritis y cáncer gástrico infectado con *Helicobacter pylori* muestra un menor número de lesiones gástricas cuando es tratado con antibióticos [66]. En cáncer de pulmón, un estudio en un modelo murino de adenocarcinoma pulmonar muestra que los ratones libres de gérmenes o tratados con antibióticos presentan una mayor protección a desarrollar cáncer de pulmón inducido por la mutación en *KRAS* y la pérdida de función de p53 [67].

La primera bacteria clasificada como carcinogénica por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer fue *Helicobacter pylori*, demostrándose que individuos

infectados con esta bacteria presentan un riesgo significativamente mayor de desarrollar cáncer gástrico cuando se compara con un grupo control libre de *Helicobacter pylori* [68,69]. Otros ejemplos incluyen la infección por *Salmonella typhi*, que aumenta significativamente el riesgo de cáncer de la vesícula biliar [70], la infección con la cepa genotóxica *Escherichia coli* positiva presenta la relación con cáncer colorrectal [71], *Fusobacterium nucleatum* considerada etiológicamente relacionada con el cáncer colorrectal [72], y *Porphyromonas gingivalis*, que está estrechamente relacionada con la aparición de carcinoma de células escamosas en la cavidad oral [73].

Sin duda, el mayor volumen de información sobre la relación entre microbiota intestinal y cáncer está centrada en tumores del tracto digestivo. La microbiota intestinal juega un papel importante manteniendo la función fisiológica del huésped y, cuando la composición y la función de la microbiota se altera, puede llevar al desarrollo de inflamación crónica que está íntimamente relacionada con los procesos de transformación maligna de las células.

Mediante la secuenciación del gen ácido ribonucleico ribosomal 16S (16S rRNA), se han descubierto diferencias significativas en la estructura de la comunidad microbiana intestinal de los pacientes con cáncer colorrectal en comparación con la de personas sanas [74]. La tasa de detección de *Bacteroides* en heces en pacientes con cáncer colorrectal es significativamente más alta que en población sana; además, la abundancia de *Bacteroides* se correlaciona con la gravedad de esta enfermedad [75]. Estudios genómicos de múltiples cohortes han revelado un enriquecimiento de *Fusobacterium nucleatum* en pacientes con cáncer de colon [76]. Además, estudios previos han sugerido que una mayor abundancia de *Fusobacterium nucleatum* se correlaciona con una menor infiltración de células T y una peor supervivencia [77,78]. Asimismo, un estudio reciente ha mostrado que los pacientes con cáncer colorrectal con una alta carga de *Fusobacterium* presentan una mayor probabilidad de desarrollar recurrencia después de tratamiento con quimioradioterapia neoadyuvante [79].

Con respecto a la asociación entre microbiota y cáncer de pulmón, se hipotetiza que una microbiota alterada y una inflamación crónica también pueden contribuir a la

carcinogénesis en el pulmón. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es un factor determinante del cáncer de pulmón al aumentar el estrés oxidativo, el daño resultante en el DNA y la exposición crónica a citocinas proinflamatorias. Un estudio ha revelado que la microbiota del tracto respiratorio está relacionada estrechamente con la EPOC [80]. Además, se ha demostrado que los pacientes con cáncer de pulmón presentan una abundancia significativamente alta de *Capnocytophaga* y *Veillonella* en la saliva en comparación con las personas sanas [81]. En cuanto a la relación entre la microbiota intestinal y el cáncer de pulmón, se ha encontrado que la administración de antibióticos en ratones con cáncer de pulmón acorta la mediana de supervivencia y conduce a la formación de tumores de mayor tamaño [82]. Los resultados de un estudio reciente muestran 47 taxones bacterianos con diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con cáncer de pulmón y personas sanas, y entre estos taxones, *Actinobacteria*, *Bifidobacteriaceae* y *Coriobacteriaceae* se identifican como los marcadores más relevantes en controles sanos, mientras *Enterococcaceae*, *Erysipelatoclostridium* y *Ruminococcaceae* UCG-004 son los más significativos en los pacientes con cáncer de pulmón. Además, en este mismo estudio se observa que los pacientes con cáncer de pulmón presentan una disminución de la función normal de la microbiota intestinal [83].

## 2.3. Microbiota e inmunidad

La microbiota intestinal tiene un impacto significativo en el sistema inmunitario y tanto la composición como los metabolitos derivados de ésta promueven el desarrollo y la regulación del sistema inmunitario del huésped.

La microbiota intestinal puede inducir la producción de inmunoglobulina A (IgA), que juega un papel crítico en el control de la población microbiana intestinal en humanos [84]. Los microorganismos comensales pueden ser eliminados rápidamente por macrófagos y mantenidos en un número relativamente bajo por acción de las células dendríticas (CDs) intestinales que estimulan la producción de IgA por los linfocitos B. Las CDs intestinales que han reconocido los microorganismos comensales se localizan en los ganglios linfáticos

mesentéricos, asegurando que las respuestas inmunitarias a la microbiota intestinal se induzcan localmente, sin inducir respuestas inmunes sistémicas [85–88].

La homeostasis intestinal depende de la compleja interacción entre la microbiota, el epitelio intestinal y el sistema inmunitario del huésped. Las células T CD4+, que incluyen las células T *helper* 1 (Th1), células T *helper* 17 (Th17) y las células T reguladoras (Tregs), son fundamentales para mantener la homeostasis del entorno inmune intestinal en presencia de microorganismos simbióticos no patógenos [89–91]. La composición de la microbiota intestinal regula el equilibrio de la población de células T, lo que influye en la inmunidad intestinal, la tolerancia y la susceptibilidad a la inflamación [92,93]. Las células Th17 son abundantes en los tejidos linfoides asociados al intestino y pueden ser inducidas por componentes específicos de la microbiota comensal [93]. Por otro lado, las células Tregs (CD4+, CD25+, FOXP3+) son clave para mantener la autotolerancia y evitar respuestas inflamatorias excesivas. Se ha observado que una combinación de 46 cepas diferentes de *Clostridia* puede aumentar el número y la función de las Tregs en la lámina propia, atenuando los síntomas de diarrea experimental y colitis en ratones [94]. Un estudio comparativo de ratones libres de gérmenes y ratones colonizados con una combinación de comensales definida como benigna resulta en la activación de células Treg intestinales, que a su vez es clave para mantener la homeostasis y función de las células T CD4+ y el mutualismo entre los microorganismos intestinales y las células T [95].

El sistema inmunitario del huésped está modulado por moléculas de patrones moleculares asociadas a patógenos o microorganismos (PAMPs o MAMPs, respectivamente) y antígenos derivados de microorganismos, cuyo reconocimiento regula los brazos efectores y supresores de la inmunidad [64,96,97]. Un tipo de PAMPs muy conocido es el lipopolisacárido (LPS), que se encuentra en la pared celular externa de las bacterias Gram-negativas. Los PAMPs son detectados por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que monitorizan el estado microbiano, la integridad de la barrera intestinal y desempeñan un papel crucial en las respuestas inmunes innatas. Los PRRs incluyen receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo Nod (NLRs) y lectinas de tipo C [98,99].

La interacción entre la microbiota intestinal y los TLRs tiene implicaciones en la regulación del sistema inmunológico. Así por ejemplo, el reconocimiento del polisacárido A de *Bacteroides fragilis* por TLR2 induce respuestas antiinflamatorias, activación de las CD plasmocitoides y la producción de interleucina (IL)-10 por parte de células T CD4+ [100,101]. TLR4 reconoce principalmente el LPS del componente de la pared celular bacteriana y puede inducir la activación de la vía dependiente de MyD88, que regula la activación temprana de NF- $\kappa$ B y la producción de citocinas proinflamatorias [102]. La vía de señalización de TLR5 puede relacionarse con la respuesta antiinflamatoria induciendo la secreción de antagonista del receptor de IL-1 y disminuyendo la actividad de IL-1 $\beta$  y del inflamasoma [103].

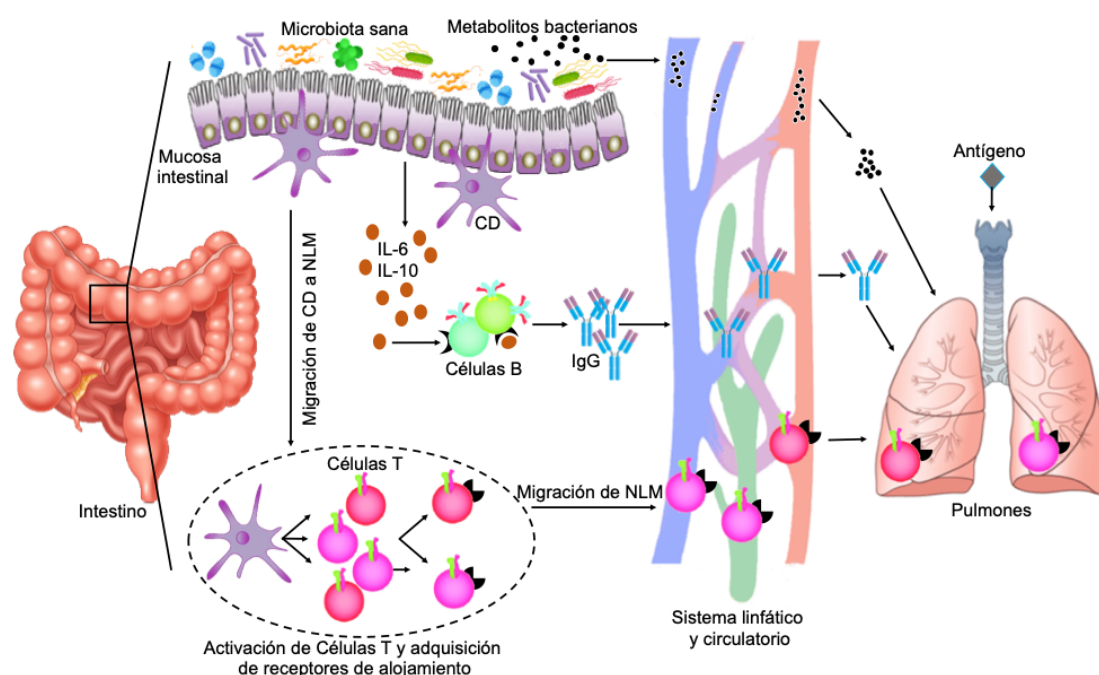
Los NLRs son sensores intracelulares, que pueden cooperar con los TLRs para regular las respuestas inflamatorias y apoptóticas. Se ha demostrado que ratones deficientes en NOD2 (una subfamilia de NLRs) y pacientes con mutaciones en NOD2 pueden presentar alteraciones en la microbiota intestinal [104,105]. Además, distintos estudios han demostrado que la expresión de NOD2 en las células epiteliales intestinales protege frente al desarrollo de inflamación y de la carcinogénesis asociada, y una deficiencia de NOD2 aumenta la susceptibilidad al cáncer colorrectal en modelos murinos [105–107]. Por otra parte, se ha sugerido un vínculo entre variantes de NOD2 y susceptibilidad a la enfermedad de Crohn. Entre los mecanismos que explican esta relación se incluyen una alteración del reconocimiento bacteriano y la eliminación y desregulación de la señalización de TLRs, que conduce a una mayor inflamación [108]. Por otro lado, algunas proteínas NLRs pueden ensamblarse en un complejo multiproteico llamado inflamasoma, que provoca la activación de caspasa 1 y el procesamiento de pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL-18, responsables de la activación de las respuestas inmunes. NLRP6 es uno de los componentes del inflamasoma, y su señalización podría estar implicada en la construcción del nicho de colonización intestinal a través de la secreción de moco y péptidos de defensa del huésped (PDHs) [109]. Por lo tanto, las alteraciones en estos mecanismos podrían facilitar el desarrollo de disbiosis o alteraciones de la microbiota intestinal [110].

Además de los PAMPs, el sistema inmunológico del huésped también puede verse

modulado por metabolitos derivados de microorganismos intestinales. Estos metabolitos pueden afectar la respuesta inmune del huésped tanto dentro como fuera del intestino. Se sabe que algunos de los metabolitos producidos por los microorganismos presentes en la flora intestinal tienen efectos beneficiosos. De particular interés son los ácidos grasos de cadena corta (AGCCs). La fermentación de la fibra dietética por la microbiota intestinal conduce a la producción de AGCCs que están inversamente relacionados con el riesgo de cáncer [111]. Los AGCCs incluyen principalmente ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, que son moléculas producidas por las bacterias anaeróbicas cuando fermentan los componentes de los alimentos (esencialmente la fibra, un hidrato de carbono no digerible) en el colon [112]. Los AGCCs microbianos ejercen efectos positivos sobre la mucosa del intestino grueso, representando una fuente de energía primaria para las células que recubren el epitelio del intestino y manteniendo la homeostasis intestinal a través de acciones antiinflamatorias. Además, los AGCCs muestran efectos inmunomoduladores importantes, entre ellos regulan la diferenciación de células T, promueven la generación de células T efectoras, mejoran la función de la barrera intestinal y de la inmunidad innata, y aumentan el metabolismo celular de las células B [113–116]. En relación a esta última función, los AGCCs proporcionan energía y componentes básicos para la activación de las células B, su diferenciación y la producción de anticuerpos [117–119].

En cuanto a la relación entre la microbiota intestinal y el cáncer de pulmón, la hipótesis del eje "intestino-pulmón", que apoya la importancia de una microbiota intestinal sana para producir respuestas inmunes efectivas en el pulmón, se viene planteando desde hace aproximadamente dos décadas [120,121] (**Figura 7**). La microbiota intestinal juega un papel muy importante en el cáncer de pulmón, y por ejemplo, diferentes factores derivados del intestino pueden llegar al pulmón a través del sistema linfático y del sistema circulatorio. Sobre esta base, se propone que los antígenos producidos en la mucosa de una determinada ubicación del cuerpo afectarán a la migración de las células linfoides a otras ubicaciones lejanas al sitio de exposición original. En este sentido, la microbiota intestinal y/o los metabolitos derivados son capturados/reconocidos por las CDs, ya sea directamente del lumen del intestino o después de su translocación, mediada por células M (células epiteliales

especializadas en el transporte de antígenos), desde el lumen hasta el tejido linfoide asociado al intestino. La combinación de señales liberadas por las bacterias produce cambios fenotípicos en las CDs y su migración a los ganglios linfáticos mesentéricos, donde promoverán la activación de diversas subpoblaciones de células T [121,122]. Curiosamente, el análisis de la respuesta inmune sistémica mediante citometría de flujo revela que los pacientes con CPNM que presentan una alta diversidad de la microbiota intestinal tienen una mayor frecuencia de subgrupos únicos de células T CD8+ de memoria y células asesinas naturales en sangre periférica en respuesta a la terapia con anti-PD-1 [123].



**Figura 7. Esquema conceptual del eje intestino-pulmón (Modificada de [124]).**

Algunos microorganismos del intestino son capturados por CDs. La combinación de señales liberadas por estos microorganismos conduce a cambios fenotípicos en las CDs y su migración hacia a los nódulos linfáticos mesentéricos donde promueven la activación de subpoblaciones de células inmunes. Los metabolitos bacterianos (por ejemplo, ácidos grasos de cadena corta) y las citocinas también afectan al eje intestino-pulmón y regulan el nivel de inflamación y la respuesta inmune. CD: célula dendrítica; IL: interleucina; IgG: inmunoglobulina G; NLM: nódulo linfático mesentérico.

## 2.4. Factores que modifican la comunidad microbiana

La disbiosis se define como una alteración de la composición y la función de la comunidad microbiana que puede producirse por factores ambientales y/o factores

relacionados con el huésped. Puede manifestarse de tres formas diferentes: aumento de microorganismos patógenos, pérdida de comensales y pérdida de diversidad [110]. Entre los factores que afectan la composición y función de la microbiota podemos destacar:

- Dieta y antibióticos. La dieta influye considerablemente la composición de la microbiota intestinal [125,126] y el uso de antibióticos puede llegar a inducir una perturbación notable en la comunidad microbiana intestinal. De hecho, se ha demostrado que la antibioticoterapia puede llegar a afectar hasta el 30% de los microorganismos intestinales [127–130].

- Infección. La disbiosis puede observarse en modelos murinos infectados con *Citrobacter rodentium* [131]. En humanos, las infecciones mixtas virales-bacterianas con rotavirus, norovirus y algunas bacterias patógenas como la cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa y enteropatógena influyen significativamente en la comunidad de microbiota intestinal [132].

- Genética del huésped. La genética del huésped puede influenciar la composición por varios mecanismos. Se ha observado que la composición microbiana es más similar entre gemelos en comparación con individuos no relacionados, es más, los gemelos monocigóticos tienen mayor similitud en la composición microbiana intestinal que gemelos dicigóticos [133]. Además, también se ha reportado que la etnia puede influenciar la composición de la microbiota intestinal [134,135].

- Tipo de parto. La diversidad y el patrón de colonización de la microbiota intestinal durante los primeros tres meses de vida se asocian significativamente con el tipo de parto. La cesárea se relaciona con una menor abundancia y diversidad de los filos de *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*, y una mayor abundancia y diversidad del filo de *Firmicutes*, mientras que los géneros *Bifidobacterium* y *Bacteroides* son más frecuentes en los recién nacidos por vía vaginal [136].



## 2.5. Microbiota y su relación con las terapias oncológicas

El papel de la microbiota como un factor capaz de modular la respuesta terapéutica se ha estado estudiando desde hace tiempo. El trasplante de microbiota fecal (TMF) se remonta incluso a la antigua China [137]. La microbiota intestinal se ha relacionado con el tratamiento de diferentes enfermedades del sistema digestivo como la enfermedad inflamatoria intestinal y el síndrome del colon irritable [138–142], pero también en otro tipo de patologías como enfermedades metabólicas [143–145], enfermedades cardiovasculares [146] o trastornos mentales (enfermedad de Parkinson, autismo y trastornos de ansiedad) [147–151]. A continuación se detalla la influencia de la microbiota en la respuesta a diversos tratamientos oncológicos.

### Quimioterapia

La ciclofosfamida es un agente alquilante de DNA, comúnmente utilizado para tratar el cáncer y algunas patologías del sistema inmunológico. Estudios recientes han demostrado que la microbiota intestinal es necesaria para que la ciclofosfamida ejerza sus efectos inmunomoduladores y antitumorales. Se ha reportado que la ciclofosfamida puede causar cambios en la composición y diversidad de la microbiota intestinal en ratones [152,153]. Este agente induce la translocación de determinadas especies de bacterias Gram-positivas, como *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus murinus* y *Enterococcus hirae*, a órganos linfoides secundarios, donde estimulan la generación de respuestas inmunes de células Th17 y de células de memoria Th1. Ratones portadores de tumores en condición libre de gérmenes o tratados con antibióticos específicos para bacterias Gram-positivas muestran una reducción en las respuestas de Th17, así como un pobre efecto antitumoral mediado por ciclofosfamida. En estos ratones, la transferencia adoptiva de células Th-17 restaura parcialmente la eficacia antitumoral de la ciclofosfamida [154].

En cuanto a los compuestos de platino, Gui y colaboradores estudiaron las funciones antitumorales de la microbiota intestinal en tres grupos de ratones con cáncer de pulmón:

tratados con cisplatino, con la combinación cisplatino más antibióticos o con la combinación cisplatino más *Lactobacillus*. El estudio demostró que los ratones que recibían cisplatino en monoterapia presentaban un menor tamaño tumoral y una alta tasa de supervivencia en comparación con los ratones tratados con la combinación de cisplatino y antibióticos. Además, los ratones que recibieron cisplatino combinado con *Lactobacillus* mostraban una mejor respuesta al tratamiento y una mayor supervivencia que los que recibieron cisplatino en monoterapia o cisplatino combinado con antibióticos [155].

### **Radioterapia**

La microbiota también se ha relacionado con la capacidad de respuesta a tratamientos radioterápicos. Existen datos que indican que la colonización microbiana intestinal aumenta la radiosensibilidad en ratones libres de gérmenes, debido a que la microbiota intestinal inhibe la expresión del factor adiposo inducido por el ayuno (FIAF), mientras que la pérdida de FIAF provoca un aumento de la radiosensibilidad intestinal [156]. Además, se ha encontrado que un polipéptido de *Salmonella flagellum* alivia los daños en el epitelio intestinal y prolonga la supervivencia de los ratones sin reducir la radiosensibilidad del tumor [157]. Algunos estudios describen una correlación entre la comunidad microbiana intestinal y la radiosensibilidad en modelos murinos tratados con antibióticos (vancomicina). En este sentido, la composición microbiana intestinal de los ratones tratados con antibióticos es significativamente diferente que los ratones no tratados, y la tasa de supervivencia de los ratones tratados es significativamente mayor después de la irradiación [158].

### **Tratamiento quirúrgico**

La resección quirúrgica sigue siendo el tratamiento principal en muchos tumores sólidos. Sin embargo, la literatura sobre el impacto de la microbiota en el tratamiento quirúrgico es realmente limitada. La fuga anastomótica (FA) es una complicación postoperatoria grave en la cirugía colorrectal. El desarrollo de FA se asocia con una baja diversidad microbiana y con una gran abundancia de los géneros *Bacteroides* y *Blautia* [159]. Una posible explicación de

esta mayor abundancia podría ser que ninguno de estos dos géneros produce ácido butírico, y niveles bajos de este AGCC podrían provocar la privación de energía e impedir la función normal de las células epiteliales del colon [159]. En este sentido, la suplementación con ácido butírico intestinal postoperatorio mejora la anastomosis en un modelo de rata [160]. Además, un previo estudio ha demostrado que la alta abundancia de *Fusobacterium nucleatum* en el tejido tumoral colorrectal está asociada con el peor resultado del tratamiento quirúrgico [161].

### **Inmunoterapia basada en ICIs**

En los últimos años, numerosos estudios han analizado la relación entre la microbiota intestinal y la inmunoterapia. Los ICIs (CTLA-4, PD-1 y PD-L1) son reguladores de la respuesta inmune y tienen una función importante en el mantenimiento de la homeostasis y tolerancia inmunológica, en este sentido, la inhibición de los ICIs ha creado un nuevo estándar de tratamiento para pacientes con cáncer, ya que su bloqueo puede eliminar la inmunosupresión y activar las respuestas inmunitarias antitumorales [162]. Sin embargo, a pesar de los avances en la clínica, la realidad es que todavía son muchos los pacientes que no responden a este tipo de tratamiento. Además de la genómica tumoral otros factores relacionados con el huésped y la microbiota intestinal también pueden influir en las respuestas terapéuticas. La diferente composición de la microbiota se ha estudiado recientemente como una de las variables que explican la heterogeneidad en las respuestas a los ICIs que se observa entre los pacientes [163–165]. Diferencias en la diversidad y composición microbiana intestinal entre los pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento con ICIs se han evidenciado en varios estudios, siendo de gran relevancia los trabajos publicados en la revista *Science* por Vetizou, Gopalakrishnan, Matson [164,166,167]. Así por ejemplo, en uno de estos trabajos, Vetizou y colaboradores mostraron que el bloqueo de CTLA-4 en ratones portadores de tumores era ineficaz en la condición libre de gérmenes. En su estudio observaron que *Bacteroides fragilis* estaba asociada con mayor eficacia de la terapia con anti-CTLA-4. De esta manera, tanto la suplementación alimentaria de esta bacteria, la inmunización con polisacáridos específicos de *Bacteroides fragilis* o la

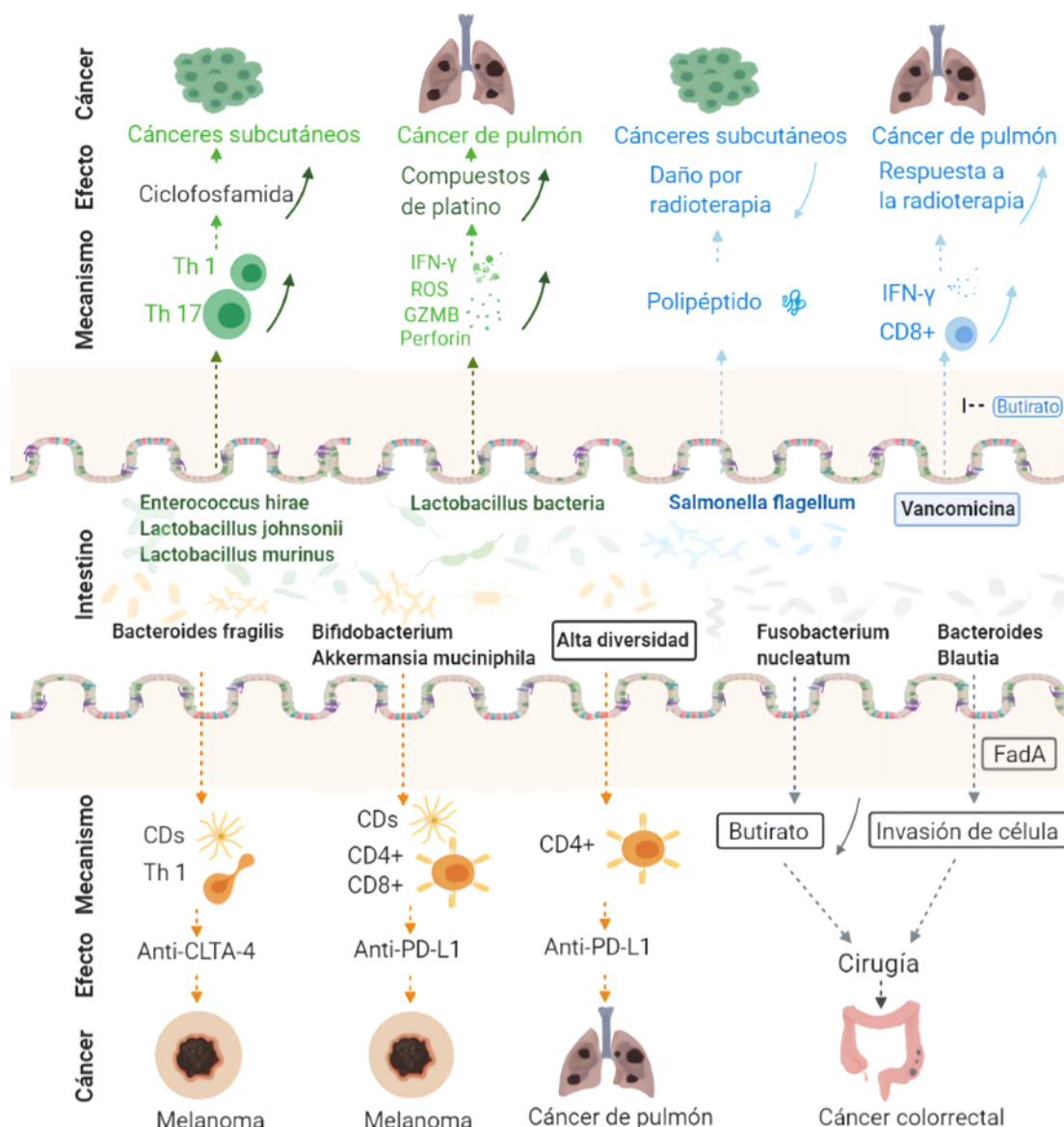
transferencia adoptiva de células T específicas para *Bacteroides fragilis* fueron capaces de rescatar la eficacia del tratamiento con anti-CTLA en ratones portadores de tumores previamente tratados con antibióticos o crecidos en condiciones libres de gérmenes, al inducir respuestas inmunes Th1 y promover la maduración de CD8 intratumorales. Además, Frankel y colaboradores reportaron un enriquecimiento de *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Faecalibacterium prausnitzii* y *Holdemania filiformis* en muestras fecales de pacientes con melanoma metastásico que respondían a tratamiento con ICIs [168]. Otro estudio ha demostrado que una alta diversidad de la microbiota intestinal y una alta abundancia de *Ruminococcaceae* y *Faecalibacterium* mejoran las respuestas inmunes sistémicas y antitumorales mediadas por una mejora en la presentación de antígenos y en la función de las células T efectoras tanto en la periferia como en el microambiente tumoral [166]. También se han encontrado diferencias de composición microbiana entre pacientes con CPNM respondedores y no respondedores a nivolumab. Los pacientes respondedores presentan un enriquecimiento de *Alistipes putredinis*, *Bifidobacterium longum* y *Prevotella copri*, mientras que *Ruminococcus* prevalece en pacientes no respondedores [123]. Cabe destacar que estudios con TMF de muestras fecales procedentes de pacientes respondedores resultan en un mejor control de la enfermedad en ratones portadores de tumores y mayor eficacia del tratamiento con anti-PD-1/PD-L1. Entre los mecanismos posibles, se ha demostrado un aumento del número de células T citotóxicas CD8+ y un menor número de células mieloides supresoras y Tregs en el interior de los tumores de los ratones trasplantados [166,167]. *Akkermansia muciniphila* es otra bacteria cuya mayor abundancia ha sido asociada con resultados clínicos favorables en pacientes con CPNM tratados con anti-PD-1 [163]. Las evidencias anteriores apoyan la importancia de mantener una flora intestinal saludable que ayude a modular la inmunoterapia en el cáncer de una manera eficaz.

Además, diversas cepas bacterianas han mostrado potencial bioterapéutico. Sivan y colaboradores demostraron que la tasa de crecimiento tumoral podría diferir dependiendo de la composición de las bacterias comensales [169]. Mediante la secuenciación del gen 16S rRNA, estos autores vieron que *Bifidobacterium* se asociaba con un mejor control del

crecimiento tumoral. Además, la administración oral de *Bifidobacterium* resultaba en una reducción del tamaño del tumor del mismo nivel que la que se conseguía con un tratamiento anti-PD-L1, y que la combinación conducía a una eliminación completa del tumor. *Bifidobacterium* es capaz de potenciar la función de las células dendríticas, activar células T CD8+ y promover la acumulación de estos linfocitos T citotóxicos en el microambiente tumoral, aumentando la respuesta inmune antitumoral. De la misma manera, Tanoue y colaboradores aislaron una combinación de 11 cepas bacterianas de muestras fecales de individuos sanos capaces de inducir células T CD8+ productoras de Interferón (IFN)- $\gamma$  en el intestino y observaron que la colonización de ratones con esta combinación de bacterias resultaba en una mayor eficacia terapéutica de los ICIs [170].

En línea con los hallazgos comentados previamente, se ha visto que una alteración general de la diversidad y de la composición de la microbiota intestinal por el uso de antibióticos puede afectar la eficacia de los ICIs. Diversos estudios demuestran que la condición libre de gérmenes o el tratamiento antibiótico en ratones portadores de tumores muestra efectos antitumorales comprometidos para los ICIs [163,164]. En concordancia con estos datos, los resultados de ensayos en pacientes indican que el tratamiento de antibióticos se asocia con una disminución en el beneficio clínico aportado por los ICIs en diferentes tipos de tumores [171–173]. De hecho, el uso de antibióticos también se correlaciona con una menor supervivencia en pacientes con melanoma y CPNM que reciben tratamiento con ICIs en comparación con los no tratados con antibióticos [172,173]. Sin embargo, aunque el efecto negativo en el tratamiento con ICIs ha sido ampliamente demostrado, algunos estudios muestran resultados opuestos. Huemer y colaboradores no observaron la influencia negativa del uso de antibióticos en la terapia con ICIs en un estudio bicéntrico en pacientes con CPNM [174]. Asimismo, otros estudios también reportan resultados clínicos similares para la inmunoterapia en pacientes de CPNM avanzado tratados y no tratados con antibióticos [123,175]. Debido a la incertidumbre de los efectos sobre el tratamiento con ICIs, la relación entre antibióticos y la efectividad de los ICIs debe ser un área de investigación prioritaria.

En la **Figura 8** se intenta resumir los resultados previamente mencionados.



**Figura 8. Posibles mecanismos utilizados por la microbiota intestinal para modular el tratamiento del cáncer** (fuente: elaboración propia).

*Enterococcus hirae*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus murinus* y *Lactobacillus bacteria* influyen a la quimioterapia [154,155]; *Salmonella flagellum* y el uso de vancomicina relacionan con la radioterapia [157,158]; *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium*, *Akkermansia muciniphila* y la alta diversidad microbiana presentan relación con la inmunoterapia [123,163,164,167]; *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides* y *Blautia* presentan la relación con cirugía [159,161]. Th: células T *helper*; CTLA-4: antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico; PD-1/PD-L1: proteína 1 de muerte programada/ ligando de la proteína 1 de muerte programada; IFN-γ: Interferón-γ; ROS: Especies reactivas de oxígeno; GZMB: granzima B.

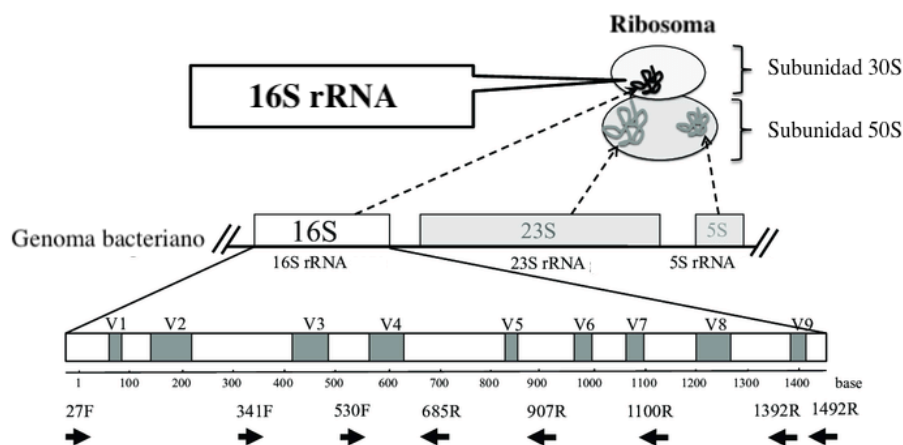
## 2.6. Metodologías para el análisis de la microbiota

La identificación de los microorganismos que componen la comunidad microbiana presente en el intestino depende de los métodos utilizados para su estudio. Los métodos de identificación tradicional se basan principalmente en el cultivo de microorganismos. Actualmente, el cultivo de microorganismos se utiliza principalmente para el aislamiento microbiano, el estudio de las funciones metabólicas, la evaluación de la susceptibilidad a los antibióticos y la patogenicidad. Este método es laborioso, consume tiempo y presenta poca sensibilidad, ya que un gran porcentaje de microorganismos intestinales no se pueden cultivar en un entorno de laboratorio [176].

En 1998, Handelsman y colaboradores propusieron el concepto de metagenómica para estudiar todo el genoma microbiano en el medio ambiente y disponer de una información exhaustiva de las características de toda la población, su diversidad, actividad funcional, interrelación e impacto ambiental [177]. Actualmente, para estudiar la microbiota, la tecnología más utilizada es la secuenciación de nueva generación (NGS), que permite aumentar la eficacia, economizando costes. Para secuenciar el microbioma, se utilizan principalmente dos métodos principales basados en la NGS: la secuenciación dirigida del gen 16S rRNA o la secuenciación del genoma completo.

Actualmente, la secuenciación del gen 16S rRNA es un método ampliamente usado para el análisis de la composición de la microbiota. Este gen está compuesto por una región conservada y una región variable (**Figura 9**). La región conservada es común en todos los microorganismos, mientras que la región variable, formada por 9 regiones hipervariables (V1-V9), se modifica según el grado de parentesco entre los microorganismos y su análisis permite identificar de forma específica cada tipo de microorganismos. Mediante el análisis de la región variable o de la secuencia completa y la comparación de homología de las secuencias, se puede calcular incluso la distancia en la evolución genética de diferentes bacterias. En los últimos años, con el desarrollo de las tecnologías de secuenciación, la base de datos donde se incluyen las secuencias del gen 16S rRNA de diferentes microorganismos

se ha enriquecido enormemente [178–180]. Además, como el estudio de un solo gen es más económico y más fácil en su ejecución que la secuenciación del genoma bacteriano completo, la secuenciación del gen 16S rRNA se ha convertido en un método ampliamente utilizado.



**Figura 9. Esquema del complejo ribosómico y del gen 16S rRNA (Modificada de [181]).**

Los recuadros grises y blancos indican las regiones hipervariables (V1-V9) y las regiones conservadas, respectivamente. Las flechas muestran las posiciones aproximadas de los cebadores universales en la secuencia del gen 16S rRNA de *Escherichia coli*.

Por todo lo expuesto, y dada la elevada mortalidad del cáncer de pulmón y el elevado porcentaje de pacientes que no responden a los tratamientos con ICIs, se hace necesaria la identificación de nuevos biomarcadores más eficaces en este contexto clínico. En los últimos años la composición de la microbiota intestinal se ha empezado a relacionar con el cáncer y su modificación se ha propuesto como alternativa para su tratamiento. Pero como hemos mencionado, la comunidad microbiana intestinal se ve afectada por muchos factores y distintos experimentos han revelado que diferentes microorganismos intestinales juegan un papel importante en el tratamiento con ICIs. Por este motivo, en la presente tesis doctoral se plantea avanzar en el análisis de la microbiota intestinal y su relación con las características clínico-patológicas, la respuesta al tratamiento con ICIs y el pronóstico en pacientes con CPNM en estadios avanzados.



## **II. OBJETIVOS**



## 1. Objetivo principal

El objetivo principal de este trabajo de tesis doctoral es caracterizar de forma exhaustiva la microbiota intestinal en pacientes con CPNM en estadios avanzados tratados con ICIs mediante NGS, evaluando el papel que puede tener como posible nuevo biomarcador predictivo y/o pronóstico trasladable a la práctica clínica.

## 2. Objetivos específicos

1. Analizar la composición de la microbiota intestinal en pacientes con CPNM en estadios avanzados que recibirán tratamiento con ICIs mediante la tecnología de NGS.
2. Analizar la relación entre la composición y diversidad de la microbiota intestinal y las características demográficas, clínico-patológicas, hábitos alimentarios y uso de antibióticos de la población en estudio.
3. Evaluar las posibles diferencias en la diversidad y la composición microbiana intestinal en función de la respuesta al tratamiento y efectos adversos inmunorelacionados con ICIs.
4. Correlacionar la microbiota intestinal con variables pronósticas en pacientes con CPNM tratados con ICIs.
5. Determinar la posible utilidad de microbiota intestinal como biomarcador para el tratamiento con ICIs en pacientes con CPNM avanzado.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



# 1. Pacientes y muestras

## 1.1. Pacientes

Un total de 69 pacientes con CPNM avanzado fueron incluidos en este estudio de forma prospectiva entre febrero de 2017 y noviembre de 2019. Todos los pacientes provinieron del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, y tenían confirmación diagnóstica de CPNM en estadios avanzados según la 8ª edición del sistema de estadificación TNM [17]. El Comité de Ética e Investigación Clínica de la institución aprobó este proyecto de investigación previo al inicio del mismo (Ver Anexo 2). El estudio se llevó a cabo de acuerdo a la Declaración de Helsinki y a los requisitos regulatorios a nivel nacional. Todos los pacientes fueron informados sobre los objetivos del proyecto y firmaron el correspondiente consentimiento para el uso de sus muestras biológicas con fines de investigación (Ver Anexo 3).

Los pacientes seleccionados fueron aquellos candidatos a recibir tratamiento con ICIs durante el tiempo que duró el reclutamiento. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: pacientes con trastorno gastrointestinal activo previo al tratamiento con ICIs, pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, pacientes con enfermedad autoinmune grave y/o activa.

Todos los pacientes recibieron tratamiento estándar en monoterapia con ICIs: i) pembrolizumab en primera línea (2 mg / kg, cada 3 semanas; n= 37), ii) nivolumab en segunda o tercera línea (3 mg / kg, cada 2 semanas; n= 20), o iii) atezolizumab en segunda o tercera línea (1200 mg, cada 3 semanas; n= 12).

## 1.2. Variables demográficas y clínico-patológicas

Las características demográficas como el sexo, fecha de nacimiento, hábito de fumar y el uso de antibióticos en 3 meses previo al tratamiento, etc., así como las clínico-patológicas

que incluyen el subtipo histológico, estado funcional, estadio tumoral, expresión de PD-L1, tamaño tumoral, presencia de metástasis, respuesta al tratamiento, toxicidades relacionadas con la inmunoterapia y fecha de progresión o exitus de cada paciente se recogieron en las historias clínicas debidamente anonimizadas. Además, se recogieron los datos de hábitos alimentarios mediante un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (ver Anexo 4), que consiste en una lista encerrada de alimentos para determinar la frecuencia habitual (nunca, diaria, semanal, mensual o anual) de consumo de cada uno de los alimentos en el último año.

Los criterios de *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors version 1,1* (RECIST 1,1) [182], se utilizó para determinar la tasa de respuestas objetivas, y las respuestas se clasificaron en respuesta completa (RC), respuesta parcial (RP), enfermedad estable (EE) y progresión de enfermedad (PE). De acuerdo a la respuesta objetiva, los pacientes se estratificaron en dos grupos: grupo de beneficio clínico duradero (BCD) que agrupa los pacientes con RC, RP o EE durante más de 6 meses, y grupo no beneficio clínico duradero (no-BCD) definido como PE dentro de los 6 meses después del inicio de tratamiento.

Los datos de las toxicidades relacionadas con la inmunoterapia se obtuvieron de las historias clínicas de los pacientes, clasificándose en diferentes tipos de eventos adversos órgano-específicos: endocrinopatía (hipofisitis, alteraciones tiroideas e insuficiencia adrenal), dermatológicas (erupción cutánea, prurito, vitíligo, etc.), gastrointestinales (diarrea y colitis), pulmonar (neumonitis), renal (deterioro de la función renal), hepatotoxicidad (alteraciones de las enzimas hepáticas).

Las variables pronósticas, tales como la supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG), se estimaron desde el inicio del tratamiento hasta la fecha de progresión (siguiendo los criterios de *RECIST 1,1*) o exitus, respectivamente. En los casos no censurados, la fecha considerada para los cálculos fue la última evaluación registrada.



### 1.3. Muestras

Las muestras de material fecal se recogieron previo al inicio de tratamiento con inmunoterapia, mediante el uso del kit *EasySampler-Complete Stool Collection* (ALPCO). En la **Figura 10** se muestran los materiales necesarios previstos en el kit para la toma y preservación de la muestra hasta su traslado al laboratorio.



**Figura 10. Componentes del *EasySampler-Complete Stool Collection Kit*.**

Cada kit contiene 1 tubo de plástico con tapón de rosca, 1 papel de recogida *EasySampler*®, 2 cucharas de papel colectoras y 2 guantes.

Una vez tomada la muestra pueden darse diversas situaciones:

- Si la muestra se obtuvo en casa del paciente en un período inferior a las 6 horas hasta su traslado al laboratorio, se debía guardar en nevera a +4°C y el traslado al laboratorio se realizaba en frío, con un acumulador de frío provisto en el kit de recolección de muestra.
- Si la muestra se obtuvo en casa del paciente por un período superior a las 6 horas, se debía guardar en el congelador (-20°C) y el traslado al laboratorio se realizaba también con el acumulador de frío.

Una vez recepcionadas las muestras en el laboratorio, éstas fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

## 2. Extracción del DNA

El procedimiento de preparación de las muestras y el protocolo para aislar DNA fueron realizados de acuerdo a las instrucciones del fabricante con el kit comercial *QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen)*. A continuación se describen en detalle los pasos que deben realizarse de forma secuencial:

- Pesar 100 mg de muestra en un tubo de microcentrífuga de 2 ml y colocar el tubo en hielo.
- Agregar 1 ml de *InhibitEX Buffer* a cada muestra. Agitar en vórtex continuamente hasta que la muestra de heces esté completamente homogeneizada.
- Calentar la suspensión durante 10 minutos a 99°C.
- Centrifugar la muestra a 16.100 g durante 1 minuto en una microcentrífuga (*Eppendorf 5415R Centrifuge, Eppendorf*) para sedimentar las partículas de heces.
- Añadir 30 µl de proteinasa K en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y agregar a esta solución 400 µl de sobrenadante del tubo de heces.
- Añadir 400 µl de *Buffer AL* y agitar en vórtex durante 15 segundos. Incubar a 70°C durante 10 minutos.
- Agregar 400 µl de etanol (96–100%) al lisado y mezclar por vórtex.
- Aplicar cuidadosamente 600 µl de lisado del paso anterior a una columna *QIAamp*. Centrifugar a 16.100 g durante 1 minuto.
- Realizar un lavado de la columna con 500 µl de *Buffer AW1* y luego con 500 µl de *Buffer AW2*. Colocar la columna de centrifugación *QIAamp* en un nuevo tubo de recolección de 2 ml. Centrifugar a 16.100 g durante 3 minutos, para eliminar cualquier resto de las soluciones de lavado.
- Transferir la columna de centrifugación *QIAamp* a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml etiquetado y pipetear 60 µl de agua directamente sobre la membrana *QIAamp*. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, y después centrifugar a 16.100 g durante 1 minuto para eluir el DNA.

La determinación de la concentración del DNA se realizó mediante la lectura de fluorescencia emitida por la muestra al añadirle una enzima y sustrato (*Qubit dsDNA HS Assay Kit*) mediante un Qubit® 3,0 Fluorometer (*Thermo Scientific*).

Las muestras se deben llevar a una concentración de 5 ng/ul para la preparación de librerías y su posterior secuenciación. La secuenciación se realizó en el laboratorio del Servicio de Secuenciación y Bioinformática de Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO).

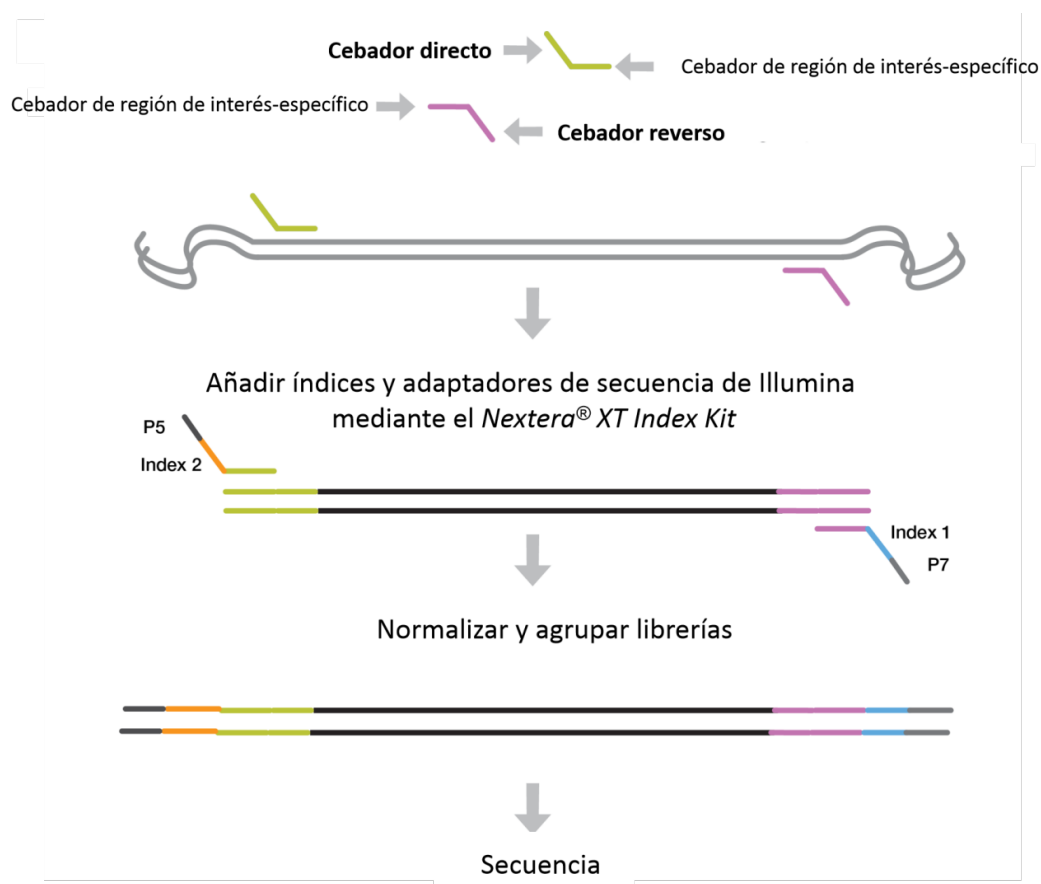
## 3. Secuenciación de nueva generación (NGS)

### 3.1. Preparación de librería

Para proceder a la secuenciación, se prepararon librerías de las regiones hipervariables V3 y V4 del gen que codifica para el 16S rRNA (**Figura 11**). Se obtuvieron fragmentos amplificados de un tamaño de aproximadamente 460 pb mediante el uso de cebadores con adaptador. Las secuencias correspondientes al adaptador- cebador directo (*forward*) para la región V3 y al reverso (*reverse*) que mapea en la región V4 son las siguientes:

*Forward*: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'

*Reverse*: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'



**Figura 11. Esquema del protocolo usado para la secuenciación de las regiones V3 y V4 del gen 16S rRNA.**

Adaptado de *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation, Illumina.*

### 3.1.1. Amplificación de fragmentos V3 y V4

El primer paso de la preparación de las librerías consiste en una amplificación de los segmentos a secuenciar, usando los adaptadores-primers listados en el apartado anterior. Para la reacción de amplificación se utilizaron placas de PCR de 96 pocillos y se preparó una mezcla conteniendo el DNA de cada muestra y los reactivos que se detallan en la [Tabla 2](#).

A continuación, se selló la placa y se realizó la PCR en un termociclador *Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)* utilizando el programa descrito en la [Tabla 3](#).

Tabla 2. Componentes de la reacción para amplificación V3 y V4.

Reactivo	Volumen
<i>DNA extraído de heces (5 ng/μl)</i>	2,5 μl
<i>Amplicon PCR Forward Primer 1 μM</i>	5 μl
<i>Amplicon PCR Reverse Primer 1 μM</i>	5 μl
<i>2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix</i>	12,5 μl
<b>Total</b>	<b>25 μl</b>

Tabla 3. Programa de ciclado para la reacción de amplificación.

Temperatura	Tiempo
<b>95°C</b>	3 minutos
<b>25 ciclos de:</b>	
<b>95°C</b>	30 segundos
<b>55°C</b>	30 segundos
<b>72°C</b>	30 segundos
<b>72°C</b>	5 minutos
<b>4°C</b>	∞

### 3.1.2. Limpieza de amplicones

Para la limpieza de los amplicones y eliminación de restos de cebadores, nucleótidos y enzimas se utilizó el *Agencourt™ AMPure™ XP Reagent (Beckman Coulter)* que consta de unas partículas magnéticas (*beads*) capaces de unir DNA. Brevemente, se centrifugó la placa de PCR a 1000 g para recoger la condensación. Se homogenizaron las *beads AMPure XP* mediante una agitación durante 30 segundos y se añadieron 20 μl a cada pocillo, seguido de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente.

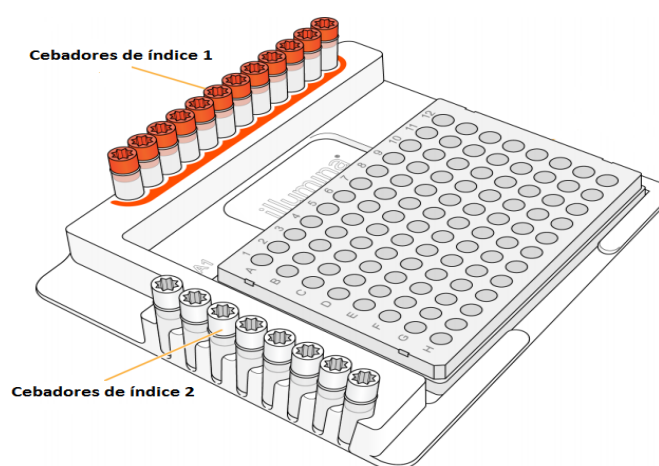
Posteriormente, se colocó la placa en un soporte magnético, y tras la precipitación

magnética se desechó el sobrenadante con una pipeta multicanal. Seguidamente, se realizaron dos lavados con etanol al 80%. Tras los lavados, se retiró la placa del soporte magnético y se le agregó 52,5  $\mu$ l de *Tris* 10 mM pH 8,5 a cada pocillo, permitiendo la liberación de los fragmentos de DNA de las beads.

A continuación, se volvió a colocar la placa en el soporte magnético y se recogieron 50  $\mu$ l del sobrenadante que se pasaron a una nueva placa para su uso posterior.

### 3.1.3. Ligación de índices a amplicones

Para la ligación de los índices necesarios para la identificación de cada muestra se realizó una nueva PCR. En este caso, se usaron los índices del kit *Nextera XT Index Kit (Illumina)*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se transfirieron 5  $\mu$ l del DNA amplificado de la reacción anterior a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Seguidamente se dispusieron los cebadores de índice 1 y 2 en la placa *TruSeq Index Plate Fixture (Illumina)*, según la disposición que se muestra en la **Figura 12**, y se colocó la placa conteniendo los 5  $\mu$ l de DNA del producto de PCR en el soporte *TruSeq Index Plate Fixture*.



**Figura 12. Accesorio de placa *TruSeq Index*.**

Adaptado de *16S Metagenomic Sequencing Library Preparation, Illumina*.

Posteriormente, se añadieron los componentes de la mezcla de reacción como se indica en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Componentes de la reacción para la ligación.

Reactivo	Volumen
DNA (proveniente de la reacción de amplificación previa)	5 $\mu$ l
<i>Nextera XT Index Primer 1 (N7xx)</i>	5 $\mu$ l
<i>Nextera XT Index Primer 2 (S5xx)</i>	5 $\mu$ l
<i>2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix</i>	25 $\mu$ l
<i>H<sub>2</sub>O</i>	10 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>50 <math>\mu</math>l</b>

A continuación, la placa se selló y se centrifugó a 1000 g durante 1 minuto. Seguidamente, se realizó la PCR en un termociclador *Veriti Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific)* utilizando el programa descrito en la [Tabla 5](#).

Tabla 5. Programa de ciclado de amplificación de las reacciones de ligación.

Temperatura	Tiempo
95°C	3 minutos
<b>8 ciclos de:</b>	
95°C	30 segundos
55°C	30 segundos
72°C	30 segundos
72°C	5 minutos
4°C	$\infty$

### 3.1.4. Segunda limpieza de amplicones

Se realizó una segunda limpieza de forma análoga a la del punto “3.1.2. Limpieza de amplicones”, con 56  $\mu$ l de *Agencourt™ AMPure™ XP Reagent (Beckman Coulter)*. Se obtuvieron 25  $\mu$ l de DNA resuspendido en *Tris* 10 mM pH 8,5.

### 3.1.5. Validación de librerías

Después de la segunda limpieza de amplicones, se tomó 1 µl de una dilución 1:50 de la librería preparada para analizar la calidad y el tamaño de los fragmentos de la misma en un bioanalizador (*Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer*), usando el dispositivo específico para DNA *Bioanalyzer DNA 1000 (Agilent)*. De esta forma se puede conocer con mayor exactitud el tamaño de los fragmentos amplificados y la posible degradación de los mismos. El tamaño esperado es de ~ 550 bp.

### 3.1.6. Cuantificación, normalización y combinación de librerías

Para poder realizar una normalización de las librerías preparadas, se realizó una cuantificación de las librerías mediante métodos fluorométricos, usando el fluorómetro *Qubit® 2,0*. Se calculó la concentración de DNA en nM, teniendo en cuenta el tamaño de los amplicones, determinado previamente por el bioanalizador, mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Concentración en ng/}\mu\text{l}}{660 \text{ g/mol} \times \text{tamaño medio de la librería}} \times 10^6 = \text{Concentración en nM}$$

Todas las muestras fueron llevadas a una concentración de 4 nM y se cogieron 5 µl de cada una para realizar una mezcla o combinación de librerías con índices únicos.

### 3.1.7. Desnaturalización y carga de librerías para secuenciar

Previamente a la secuenciación, la mezcla de librerías se desnaturalizó con una solución de NaOH 0,2 N en proporción 1:1. Posteriormente, las librerías desnaturalizadas se diluyeron 1:100 en el tampón de hibridación. Seguidamente, se realizó otra dilución 1:5 para tener una concentración final de 4 pM. Paralelamente, se desnaturalizó el control PhiX de 4 nM con NaOH 0,2 N en proporción 1:1, y se realizaron los mismos pasos hechos para el resto de librerías. Finalmente, se mezclaron 570 µl de la dilución de librerías desnaturalizadas y 30 µl de la dilución del control PhiX desnaturalizada a la misma concentración y estos 600 µl son

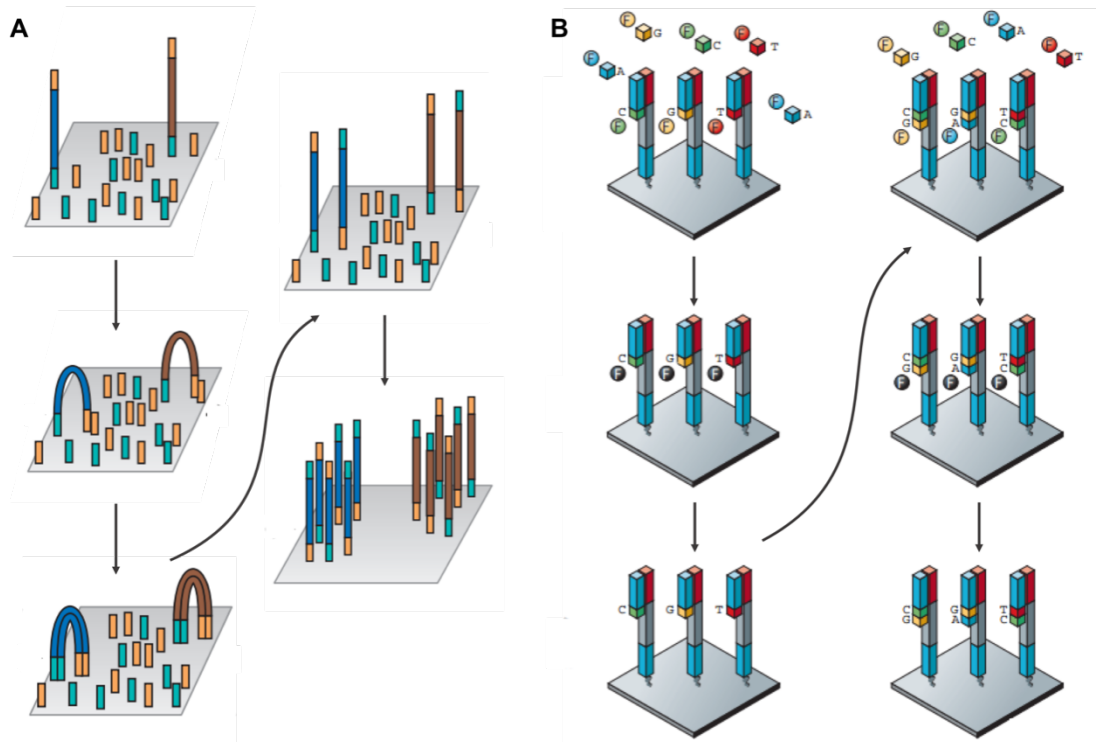


los que se cargaron en la celda (*flow cell*) para realizar la secuenciación.

## 3.2. Secuenciación

Las librerías generadas fueron secuenciadas en el laboratorio del Servicio de Secuenciación y Bioinformática de FISABIO. Para la realización de la secuenciación, se utilizó el secuenciador *MiSeq* (*Illumina*). Brevemente, las cadenas molde de DNA son fijadas en la superficie de unas celdillas, asegurando una alta estabilidad de los moldes ligados. Cada fragmento es amplificado y la amplificación en fase sólida crea hasta 1000 copias idénticas de cada molde. La amplificación se lleva a cabo mediante una PCR en puente (**Figura 13A**), es decir, los fragmentos se amplifican a partir de unos cebadores unidos a una superficie sólida. A las cadenas sencillas se añade un cebador para la secuenciación y, para el DNA de doble cadena, se elimina la cadena original, dejando la cadena complementaria como molde para la segunda secuenciación [183].

Las cadenas molde de DNA se secuencian por ciclos repetidos, donde cada uno de los cuatro terminadores reversibles utilizados está marcado con un fluoróforo diferente, para que se detecte cada base cuando es incorporada a las cadenas moldes de DNA (**Figura 13B**). Una vez ligados los cuatro terminadores, se bloquea la polimerización, por lo que la enzima polimerasa sólo puede añadir una base a cada cadena sintetizada. Debido a que los nucleótidos se añaden simultáneamente, existe una competencia natural y se minimizan los errores de incorporación. Tras cada ciclo, se eliminan los terminadores no incorporados. Además, las secuencias de DNA producidas en el proceso de secuenciación son de longitud uniforme porque las bases individuales se añaden a todos los moldes en una forma equitativa. De esta forma, la secuenciación consigue alta sensibilidad, eliminando virtualmente los errores específicos de la secuencia, permitiendo asignaciones de regiones de secuencias repetidas y homopolímeros, y favoreciendo la secuenciación de los millones de clústeres de la superficie de la *flow cell* en la misma carrera.



**Figura 13. Amplificación en puente y secuenciación por síntesis mediante terminadores reversibles según el método de *Illumina*®.**

(A). La amplificación de los fragmentos de DNA se realiza mediante el método de PCR en puente. Brevemente, el fragmento de DNA se ancla a en una superficie de celdillas por medio de la unión de sus adaptadores a los oligonucleótidos complementarios. La polimerasa genera una hebra reversa complementaria y la hebra original es retirada. A continuación, la hebra reversa se pliega y queda en forma de puente, donde la polimerasa genera una hebra complementaria idéntica a la original. El proceso se repite masivamente. Al finalizar la amplificación clonal, se retiran todas las hebras reversas, quedando únicamente las hebras idénticas a las originales. (B). Durante la secuenciación por síntesis, se introducen nucleótidos modificados con etiquetas fluorescentes específicas para cada tipo. Los nucleótidos utilizados presentan una modificación química (terminadores reversibles) que evita la unión de más de un nucleótido marcado en cada sitio de reacción, de tal manera que se puede ubicar el que corresponde a cada punto en la secuencia y se disminuye el riesgo de errores en la secuenciación. Cada vez que una base se adhiere emite una fluorescencia propia que permite su identificación. La etiqueta se elimina antes de la colocación del siguiente nucleótido para evitar que dos bases emitan señal a la vez.

La determinación de la identidad de la base insertada se realiza por la excitación inducida por un láser de los fluoróforos con los que estaban marcadas cada una de las bases que se incorporan durante la reacción de síntesis. Al final, las bases se asignan de acuerdo al fluoróforo y a la intensidad de señal obtenida durante cada ciclo.

### 3.3. Procesamiento de las secuencias

De cada muestra analizada mediante el equipo *MiSeq*, se obtuvo un archivo en formato *FASTQ* que contiene la secuencia de bases de cada fragmento amplificado de la región V3-V4.

En primer lugar, la evaluación de la calidad de las secuencias se llevó a cabo mediante el programa *FastQC*. Para el análisis de la calidad de la secuencia por base se recogieron los siguientes parámetros: el contenido de cada nucleótido por secuencia (incluido el contenido de guanina y citosina y de nucleótidos sin base asignada), la longitud de las secuencias o el contenido de adaptadores se recogen. A continuación, se realizó la filtración por calidad y longitud de las secuencias obtenidas mediante el uso del programa *prinseq-lite* [184]. Para ello, se aplicaron los siguientes filtros: longitud mínima de 50 bases, la ausencia de bases sin asignar y los extremos de secuencias que no llegan a la calidad de Q20. El índice de calidad Phred (Q) se otorga de forma individual a cada nucleótido, reflejando la probabilidad de que ese determinado nucleótido sea erróneo (P), y se calcula como:  $Q = -10 \log_{10} P$ . Posteriormente, se empalmaron las secuencias directa y reversa con un solapamiento de 20 bases o más y un porcentaje de diferencias menor del 25% mediante el programa *FLASH* [185].

El análisis de metataxonomía de las secuencias obtenidas se realizó usando la plataforma bioinformática *Qiime 2*, originalmente citada en el estudio de Caporaso y col [186]. La *DADA2* se utilizó para la eliminación del ruido, unión de extremos y eliminación de quimeras [187]. Las secuencias que presentaron identidad iguales o superiores al 97% se asignaron en las afiliaciones taxonómicas mediante el programa *Naive Bayesian classifier* de la plataforma *Qiime 2*. La base de datos utilizada para esta asignación taxonómica fue *SILVA release 132* [188]. La composición taxonómica de la microbiota intestinal se generó por niveles: reino, filo, clase, orden, familia, género y especie.

### 3.4. Análisis de resultados de secuenciación

En el estudio de la composición de la comunidad microbiana basada en la taxonomía del gen 16S rRNA de cada reino, filo, clase, orden, familia, género o especie se informó el número de lecturas identificadas en el proceso de secuenciación. Además, se calculó la abundancia relativa en base al número de lecturas totales reportadas para cada muestra.

Con la finalidad de estudiar las características globales de la microbiota intestinal, se analizó la biodiversidad de tipo alfa y beta. La alfa-diversidad consiste en la estructura de una comunidad ecológica con respecto a su riqueza (número de grupos taxonómicos distintos), uniformidad (distribución de las abundancias de los grupos), o ambos [189]; mientras que la beta-diversidad refiere al grado de diferencia de la composición microbiana entre distintos individuos o comunidades, también definida como el cambio biótico a través de gradientes ambientales [190], y utilizó el análisis de componentes principales (ACP) para describir la beta-diversidad en nuestro estudio.

Los parámetros de alfa-diversidad más utilizados son:

- **Índice de Chao 1:** estimador basado en abundancia de riqueza de microbiota, calculada como:

$$Chao\ 1 = S + \frac{a^2}{2b}$$

Donde  $S$  indica cantidad de especies únicas en una muestra,  $a$  indica la cantidad de especies únicas,  $b$  indica la cantidad de especies representadas por exactamente dos individuos en la muestra.

- **Índice de Shannon:** estimador basado de la riqueza de microbiota y distribución de uniformidad sobre microbiota, calculada como:

$$H = - \sum_{i=1}^s p_i \log p_i$$

Donde  $S$  indica la cantidad de especies,  $p_i$  indica la proporción de individuos de la especie respecto al total de individuos.

- **Índice de *inverse* Simpson:** otro estimador basado de la riqueza de microbiota y distribución de uniformidad sobre microbiota, calculada como:

$$\text{inverse Simpson} = \frac{1}{1 - \sum_{i=0}^S p_i^2}$$

Donde  $S$  indica la cantidad de especies,  $p_i$  indica la proporción de individuos de la especie respecto al total de individuos. En particular, el índice de Shannon se basa en la aleatoriedad presente en un sitio y considera tanto la riqueza de especies como la equidad en la distribución en una muestra; mientras que el índice de *inverse* Simpson se considera más como un índice de dominancia, ya que representa la proporción de especies en una muestra [191,192].

## 4. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versión 24.0 (IBM Corp), *GraphPad Prism 6.0* (GraphPad Software), *Microsoft Office Excel 2007* (Microsoft) y el programa *R* v.4.0.3 (R Foundation for Statistical Computing).

La estadística utilizada fue no-paramétrica, dado que algunas variables no seguían la distribución normal. Para las correlaciones entre variables continuas y categóricas se utilizaron las pruebas  $U$  de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis, y para las correlaciones entre variables categóricas se usó el test de Chi-cuadrado.

El ACP y el análisis de varianza permutacional multivariado (PERMANOVA) se realizaron en el programa *R* para representar gráficamente la similitud o diferencia entre las comunidades de muestras y correlaciones entre las variables.

El análisis de tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LEfSe) se realizó a

través de la plataforma *Galaxy/Hutlab* [193]. LEfSe es una herramienta para definir las principales diferencias de la composición microbiana capaces de discriminar entre dos grupos de muestras [193]. Brevemente, LEfSe compara por pares la abundancia de todos los taxones entre grupos utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, lo que requiere que todas esas pruebas sean estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Los vectores resultantes de la comparación de abundancias entre grupos se utilizan como entrada para el análisis discriminante lineal (LDA), que calcula el tamaño del efecto.

Las gráficas de diagramas de Venn y UpSet se utilizaron para ilustrar relaciones entre dos grupos de pacientes.

Los análisis de supervivencia (SLP y SG) se llevaron a cabo mediante el método de regresión de Cox univariante. Las curvas de supervivencia (SLP y SG) se construyeron utilizando el método de Kaplan-Meier y el estadístico de contraste usado fue log-rango. Se realizó un análisis de regresión de Cox multivariante con todas las variables que resultaron significativas en el análisis univariante para identificar factores de pronóstico independientes asociados con SLP y SG.

Se consideró un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo para todos los análisis.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





## 1. Análisis descriptivo de las características clínico-patológicas de la población

Los 69 pacientes incluidos del estudio tenían un diagnóstico confirmado de CPNM en estadios avanzados. La edad mediana de los pacientes fue de 66 años y, la mayoría eran hombres (71%). Un total de 45 pacientes (65,2%) eran fumadores activos, 33 (47,8%) presentaron un índice de masa corporal (IMC) <25, 16 pacientes (23,2%) recibieron antibioticoterapia en un período de entre 0 y 3 meses antes del inicio del tratamiento con inmunoterapia. La histología predominante fue adenocarcinoma (46,4%) y, 46 (66,6%) pacientes presentaron células tumorales con expresión de PD-L1 positiva [Score de proporción del tumor (TPS)  $\geq 1\%$ ].

Los tratamientos de inmunoterapia administrados fueron de acuerdo al estándar de tratamiento en el momento de la recolección de las muestras, a saber, 37 pacientes recibieron pembrolizumab en monoterapia, 20 pacientes recibieron nivolumab en segunda o tercera línea y 12 pacientes recibieron atezolizumab en segunda o tercera línea.

Un total de 33 pacientes (47,8%) de esta cohorte se catalogaron como BCD, mientras que el 52,2% restante presentaron progresión de la enfermedad en menos de seis meses de seguimiento, por lo que se clasificaron como no-BCD (**Tabla 6**).

Tabla 6. Características demográficas y clínico-patológicas de los pacientes.

Características		N	%
<b>Sexo</b>	Hombre	49	71,0
	Mujer	20	29,0
<b>Edad</b>	≤66	34	49,3
	>66	35	50,7
<b>Hábito tabáquico</b>	Fumador	45	65,2
	Exfumador	17	24,6
	Nunca fumador	7	10,1
<b>Índice masa corporal</b>	<25	33	47,8
	≥25	32	46,4
	NR	4	5,8
<b>Tratamiento antibiótico previo</b>	Sí	16	23,2
	No	53	76,8
<b>Histología</b>	Adenocarcinoma	32	46,4
	Epidermoide	27	39,1
	Células grandes	3	4,3
	Pobrementemente diferenciado	7	10,1
<b>Estado funcional</b>	0-1	59	85,5
	2	6	8,7
	NR	4	5,8
<b>Estadio</b>	III	12	17,4
	IV	57	82,6
<b>PD-L1</b>	TPS <1%	21	30,4
	TPS =1-49%	6	8,7
	TPS ≥50%	40	58,0
	NR	2	2,9
<b>Tratamiento</b>	Pembrolizumab	37	53,6
	Nivolumab	20	29,0
	Atezolizumab	12	17,4
<b>Línea de tratamiento</b>	1ra	37	53,6
	2da/3ra	32	46,4
<b>Tamaño tumoral</b>	≤5 cm	20	29,0
	>5 cm	49	71,0
<b>Nº localizaciones metastásicas</b>	≤2	27	39,1
	>2	42	60,9
<b>Respuesta al tratamiento</b>	BCD	33	47,8
	No-BCD	36	52,2

El índice masa corporal (IMC) se calculó como el peso en kilogramos dividido por la altura (estatura) al cuadrado (kg/m<sup>2</sup>). TPS: score de proporción de tumor. BCD: beneficio clínico duradero, incluye los pacientes con respuesta completa o parcial y enfermedad estable durante más de seis meses. No-BCD: no beneficio clínico duradero, incluye los pacientes con progresión de enfermedad dentro de seis meses. NR: no reportado.

En nuestra cohorte, 26 pacientes (37,7%) tuvieron uno o más efectos secundarios, siendo los más frecuentes las endocrinopatías (18,8%) seguidas de las toxicidades hepáticas (14,5%), y dermatológicos (10,1%) (Tabla 7).

**Tabla 7. Eventos adversos órgano-específicos más frecuentes en la cohorte de estudio.**

Toxicidades órgano-específicas	N	%
<b>Toxicidad relacionada con ICIs</b>		
Sí	26	37,7
No	43	62,3
<b>Toxicidad endocrina</b>		
Sí	13	18,8
No	56	81,2
<b>Toxicidad hepática</b>		
Sí	10	14,5
No	59	85,5
<b>Toxicidad dermatológica</b>		
Sí	7	10,1
No	62	89,9
<b>Toxicidad gastrointestinal</b>		
Sí	7	10,1
No	62	89,9
<b>Toxicidad renal</b>		
Sí	7	10,1
No	62	89,9
<b>Toxicidad pulmonar (Neumonitis)</b>		
Sí	3	4,3
No	66	95,7

Las toxicidades relacionadas con ICIs son toxicidades discretas causadas por la activación no específica del sistema inmunológico y pueden afectar a casi cualquier sistema u órgano del cuerpo, siendo más comunes las afectaciones de la piel, el colon, los órganos endocrinos, el hígado y los pulmones [194]. En cuanto a los pacientes con CPNM tratados con los ICIs dirigidos a anti-PD-1/PD-L1, la toxicidad endocrina es la toxicidad órgano-específica más común, siendo de alrededor del 20% [195], que está en concordancia con nuestros resultados.

## 2. Análisis descriptivo de la microbiota intestinal de la población

### 2.1. Análisis de los datos de secuenciación

El DNA aislado a partir de un total de 69 muestras de heces de los pacientes incluidos del estudio se cuantificó, obteniéndose concentraciones entre 14,4 y 34,6 ng/ $\mu$ l, con una mediana de 25,1 ng/ $\mu$ l. Estos datos indican que las muestras de DNA fueron satisfactorias para su posterior secuenciación.

Se obtuvo un total de 69 librerías 16S. En la **Tabla 8** se detallan los datos obtenidos de la secuenciación, incluyendo la cantidad de lecturas, la longitud mediana de los fragmentos secuenciados y las desviaciones estándar de longitud de las lecturas directas (*forward*) R1 y reversas (*reverse*) R2, de todas las librerías analizadas. Los valores de la cantidad de lecturas R1 y R2 fueron iguales para cada librería, mientras que la longitud mediana y las desviaciones estándar de longitud fueron similares, indicando que las muestras analizadas presentaban la misma calidad en ambos sentidos de secuenciación.

**Tabla 8. Análisis de calidad de los datos de secuenciación.**

Métricas	Mediana	Rango
<b>Cantidad de lecturas (R1)</b>	145.987	62.898-540.654
<b>Longitud mediana (R1)</b>	298,42	297,30-299,57
<b>Desviaciones estándar de longitud (R1)</b>	3,95	1,97-13,40
<b>Cantidad de lecturas (R2)</b>	145.987	62.898-540.654
<b>Longitud mediana (R2)</b>	298,95	298,19-299,12
<b>Desviaciones estándar de longitud (R2)</b>	3,58	1,31-13,21

R1: lecturas directas (*forward*); R2: lecturas reversas (*reverse*).

Para las 69 muestras analizadas se obtuvieron 10.553.396 lecturas totales iniciales, que quedaron en 7.435.908 lecturas limpias finales tras aplicar los filtros para eliminar ruido,

unión de extremos y quimeras. Estas 7.435.908 lecturas, un 70,46% del total, fueron utilizadas para la posterior asignación de la taxonomía (**Tabla 9**).

**Tabla 9. Datos de secuencias iniciales y tras la aplicación de filtros.**

Lectura	Mediana	Rango	Total (%)
<b>Secuencias totales</b>	145.987	62.898-540.654	10.553.396 (100%)
<b>Eliminación del ruido</b>	121.103	43.813-428.816	8.387.300 (79,47%)
<b>Unión de extremos</b>	117.402	41.877-416.975	8.092.710 (76,68%)
<b>Eliminación de quimera</b>	106.472	39.680-395.618	7.461.201 (70,70%)
<b>Secuencias para análisis taxonómico</b>	106.425	39.672-395.132	7.435.908 (70,46%)

## 2.2. Análisis de la composición microbiana intestinal

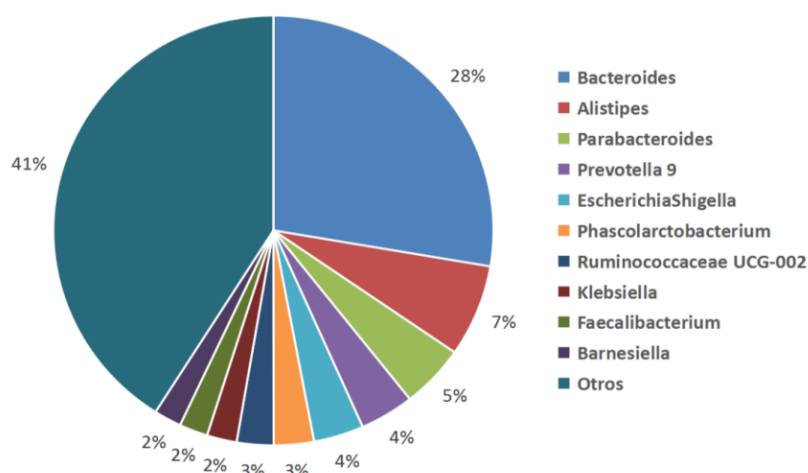
La asignación taxonómica se realizó a partir de las secuencias que pasaron los filtros, un total de 7.435.908, como se indicó en el apartado anterior. Los resultados del análisis taxonómico se agruparon en diferentes niveles. La categoría taxonómica fundamental es la especie, ya que ofrece el taxón discreto de tamaño más pequeño. Para la asignación de especies se espera una similitud mínima de 97% de identidad genética entre las secuencias, mientras que el género está integrado por un grupo de microorganismos que presentan una homología igual o mayor a 95% [196]. Un grupo de géneros estrechamente relacionados o parecidos constituyen una familia. Por lo tanto, según la homología, las categorías ordenadas en rango taxonómico descendente son las siguientes: reino, filo clase, orden, familia, género y especie.

A la vista de nuestros resultados, dentro del reino de *Bacteria* se encontraron 16 filos, 25 clases, 43 órdenes, 97 familias, 357 géneros y 851 especies. Los microorganismos más frecuentes de cada nivel se muestran en la **Tabla 10**.

**Tabla 10. Microorganismos dominantes de las diferentes categorías taxonómicas.**

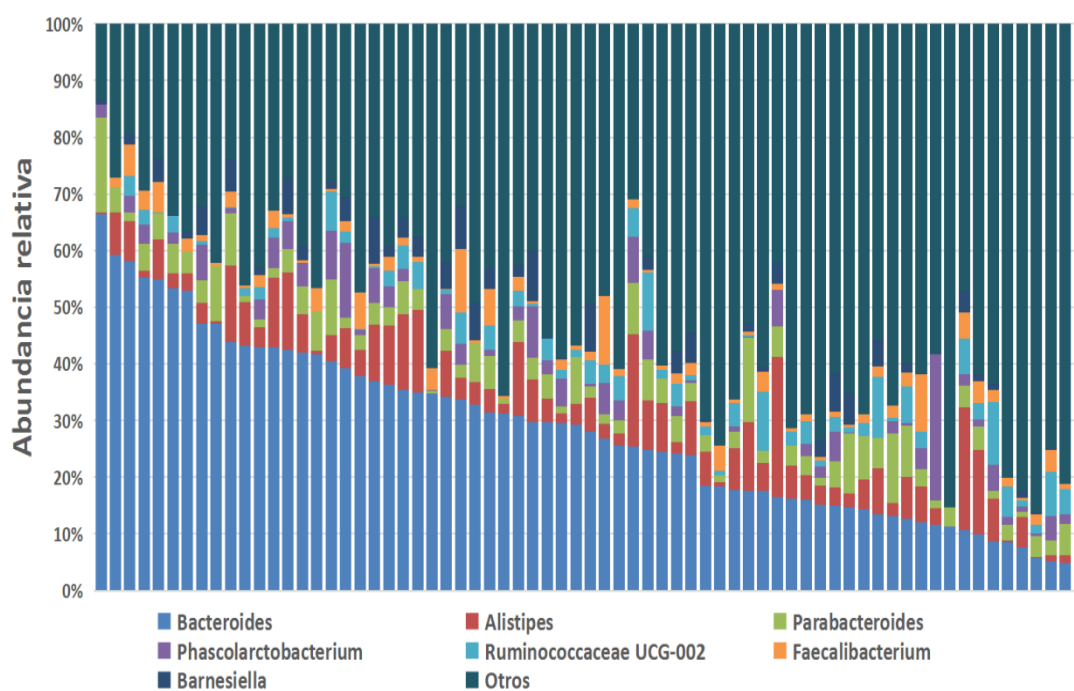
Nivel	Microorganismos más frecuentes (%)
<b>Reino</b>	<i>Bacteria</i> (100,00%)
<b>Filo</b>	<i>Bacteroidetes</i> (53,40%) <i>Firmicutes</i> (32,16 %) <i>Proteobacteria</i> (10,53%)
<b>Clase</b>	<i>Bacteroidia</i> (52,68%) <i>Clostridia</i> (24,73%) <i>Gammaproteobacteria</i> (9,05%)
<b>Orden</b>	<i>Bacteroidales</i> (52,69%) <i>Clostridiales</i> (24,66%) <i>Enterobacteriales</i> (6,49%)
<b>Familia</b>	<i>Bacteroidaceae</i> (28,39%) <i>Ruminococcaceae</i> (14,36%) <i>Lachnospiraceae</i> (8,43%)
<b>Género</b>	<i>Bacteroides</i> (28,39%) <i>Alistipes</i> (7,25%) <i>Parabacteroides</i> (4,89%)
<b>Especie</b>	<i>Bacteroides uniformis</i> (5,44%) <i>Bacteroides unclassified</i> (4,93%) <i>Bacteroides dorei</i> (4,45%)

En esta cohorte, se han detectado 357 géneros distintos, entre ellos, *Bacteroides* es el género más frecuente, representando de forma conjunta el 28%. Los siguientes géneros más abundantes corresponden a *Alistipes* y *Parabacteroides*, los cuales representan un 7 % y un 5%, respectivamente, en los pacientes con CPNM (**Figura 14**). Calculando la abundancia relativa de cada género por paciente, se observan 7 con una mediana mayor al 1%: *Bacteroides*, *Alistipes*, *Parabacteroides*, *Phascolarctobacterium*, *Ruminococcaceae* UCG-002, *Faecalibacterium*, *Barnesiella* (**Figura 15**).



**Figura 14. Gráfico circular de la composición filogenética de los taxones más comunes a nivel de género en el global de las muestras del estudio.**

En la figura se muestran los 10 géneros más frecuentes de un total de 357 géneros identificados.



**Figura 15. Gráfico de barras de la composición filogenética de los taxones más comunes a nivel de género en cada paciente del estudio.**

Un total de 357 géneros fueron identificados, de los cuales sólo 7 de ellos presentaron una abundancia relativa mayor al 1%. En el gráfico sólo se muestran los géneros con una abundancia mayor al 1%.

Nuestros resultados están de acuerdo con un estudio previamente publicado, en el cual ha encontrado que *Bacteroides* es el género más abundante en muestras fecales de pacientes con cáncer de pulmón; además, la abundancia relativa de este género es

significativamente más alta en los pacientes que en los controles sanos [197]. *Bacteroides* es una bacteria Gram-negativa en forma de bacilo, la cual pertenece al filo *Bacteroidetes*. El colon humano alberga la población más grande y compleja de bacterias en el cuerpo, y alrededor del 25% pertenece al género *Bacteroides* [198], un porcentaje muy similar al que obtenemos en nuestro estudio (28%).

Por otro lado, se analizó la alfa-diversidad basada en los índices Chao 1, Shannon e *inverse* Simpson. El índice de Chao 1 es el estimador para describir la riqueza microbiana intestinal, la mediana de Chao 1 fue 167 con un rango de 43-274. Los índices de Shannon e *inverse* Simpson son estimadores que permiten describir la diversidad, es decir, tanto la riqueza como la distribución. Las medianas de Shannon e *inverse* Simpson en los 69 pacientes incluidos en este estudio fueron 3,40 y 14,25, respectivamente. Cada uno de los índices fue calculado en la muestra pretratamiento, y en base a estos resultados, es posible evaluar y correlacionar la diversidad microbiana intestinal con las características clínico-patológicas y la respuesta al tratamiento con ICIs. La mediana y el rango de los índices son recogidos en **Tabla 11**.

**Tabla 11. Índices de alfa-diversidad.**

Alfa diversidad	Chao 1	Shannon	<i>Inverse</i> Simpson
<b>Mediana</b>	167	3,40	14,25
<b>Rango</b>	43-274	1,78-4,30	3,32-42,93



### 3. Análisis de las características de microbiota intestinal en pacientes con CPNM avanzado tratados con ICIs

#### 3.1. Características clínico-patológicas

##### 3.1.1. Correlación con la evolución clínica

En función de la respuesta a ICIs, 33 (47,8%) pacientes fueron clasificados en el grupo BCD, mientras que 36 (52,2%) pacientes presentaron no-BCD. Las diferentes características demográficas y clínico-patológicas fueron correlacionadas con la respuesta a ICIs. Para el análisis de correlación se realizó la prueba Chi-cuadrado y, como se muestra en la **Tabla 12**, el sexo, el índice de masa corporal y la expresión de PD-L1 correlacionaron de manera significativa con la respuesta a ICIs.

**Tabla 12. Correlación entre las características demográficas y clínico-patológicas con la respuesta a ICIs.**

Características	BCD	No-BCD	P valor
<b>Edad</b>			
≤66 años	14 (42,4%)	20 (55,6%)	0,276
>66 años	19 (57,6%)	16 (44,4%)	
<b>Sexo</b>			
Hombre	28 (84,8%)	21 (58,3%)	<b>0,015*</b>
Mujer	5 (15,2%)	15 (41,7%)	
<b>Tabaquismo</b>			
Fumador	22 (66,7%)	25 (69,4%)	0,805
No fumador	11 (33,3%)	11 (30,6%)	
<b>Índice de masa corporal</b>			
≥25	20 (60,6%)	12 (33,3%)	<b>0,035*</b>
<25	12 (36,4%)	21 (58,3%)	
Sin especificar	1 (3,0%)	3 (8,4%)	

<b>Antibióticos previos</b>			
Sí	7 (21,2%)	9 (25,0%)	0,710
No	26 (78,8%)	27 (75,0%)	
<b>Estado funcional</b>			
0-1	32 (97,0%)	31 (86,1%)	0,110
≥2	1 (3,0%)	5 (13,9%)	
<b>Histología</b>			
Adenocarcinoma	14 (42,4%)	18 (50,0%)	0,528
No adenocarcinoma	19 (57,6%)	18 (50,0%)	
<b>Estadio</b>			
III	8 (24,2%)	4 (11,1%)	0,151
IV	25 (75,8%)	32 (88,9%)	
<b>PD-L1</b>			
Positivo (TPS ≥1%)	26 (78,8%)	20 (55,6%)	<b>0,034*</b>
Negativo (TPS < 1%)	6 (18,2%)	15 (41,7%)	
Sin especificar	1 (3,0%)	1 (2,8%)	
<b>Línea de tratamiento</b>			
1ra	20 (60,6%)	17 (47,2%)	0,265
2da/3ra	13 (39,4%)	19 (52,8%)	
<b>Tamaño tumoral</b>			
≤5 cm	11 (33,3%)	9 (25,0%)	0,446
>5 cm	22 (66,7%)	27 (75,0%)	
<b>Nº localizaciones metastásicas</b>			
≤2	16 (48,5%)	11 (30,6%)	0,127
>2	17 (51,5%)	25 (69,4%)	

BCD: beneficio clínico duradero. No fumador: exfumador más de 1 año y nunca fumador. *P* valores se obtuvieron usando el test chi-cuadrado. \**p* < 0,05.

En nuestro estudio, los 37 pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea de tratamiento presentaron PD-L1 TPS >50%; mientras que los 32 pacientes tratados con nivolumab o atezolizumab en segunda o tercera línea de tratamiento recibieron quimioterapia previa. El valor predictivo de las características demográficas y clínico-patológicas también se evaluó en relación a la línea de tratamiento. En el subgrupo de pacientes tratados con pembrolizumab, el sexo y el índice de masa corporal fueron factores relacionados con la respuesta. En cuanto al subgrupo de pacientes tratados con nivolumab o atezolizumab en segunda o tercera línea de tratamiento, no se revelaron características

relacionadas estadísticamente con la respuesta (**Tabla S2**).

En nuestro estudio, la mediana de seguimiento fue de 14,3 meses (rango: 0,6-32,3 meses). Durante el período de seguimiento, un 79,7% de los pacientes progresaron y se registraron un 59,4% de exitus.

El valor pronóstico de las principales características se evaluó mediante el método de regresión de Cox univariante para la SLP y la SG. Los resultados de estos análisis se muestran en la **Tabla 13**. El sexo, el estado funcional y la expresión de PD-L1 fueron factores pronósticos para la SLP, mientras que el IMC lo fue para la SG. En función de las diferentes líneas de tratamiento, solamente el IMC se asoció con SLP y SG en los pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea de tratamiento (**Tabla S3**).

**Tabla 13. Resultados del análisis de regresión de Cox según las variables clínico-patológicas.**

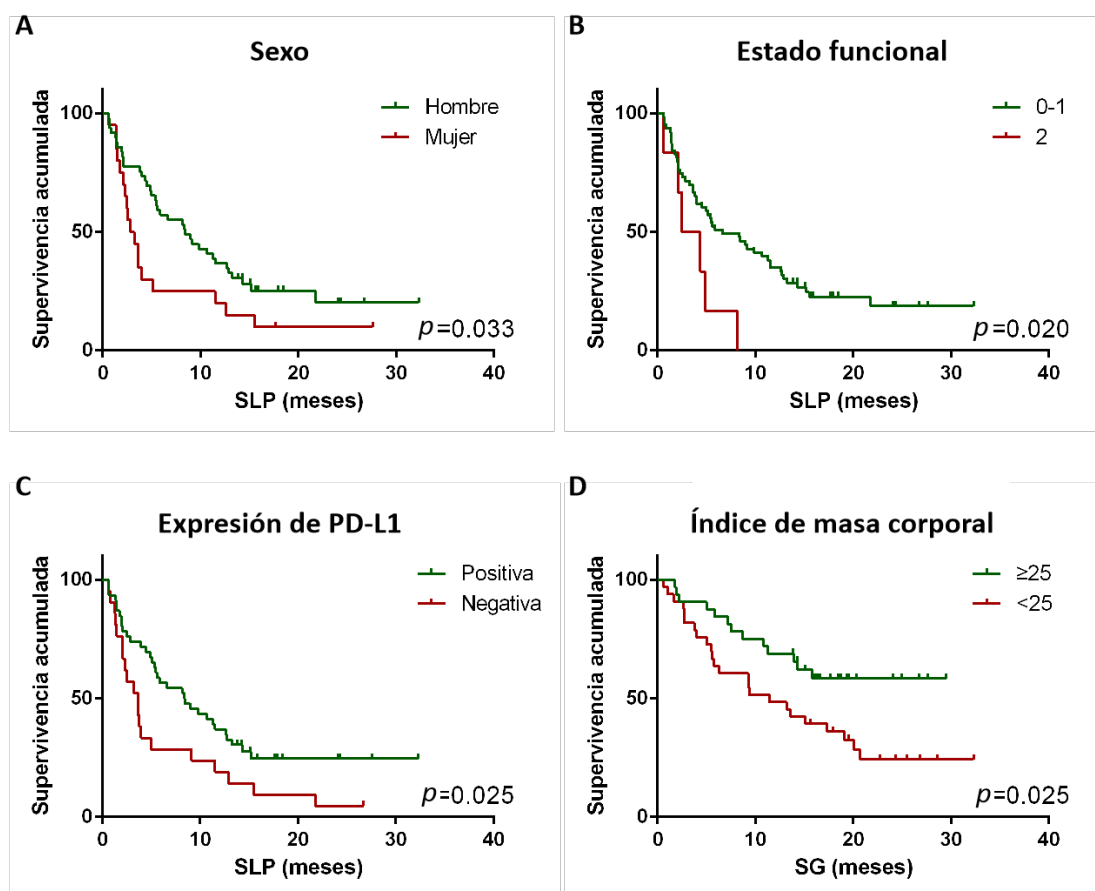
Variables	SLP			SG		
	HR	IC 95%	P valor	HR	IC 95%	P valor
<b>Sexo</b>						
Hombre vs. Mujer	0,544	0,307-0,962	<b>0,036*</b>	0,800	0,414-1,547	0,508
<b>Edad</b>						
≤66 vs. >66	1,081	0,637-1,836	0,772	0,969	0,525-1,788	0,920
<b>Hábito tabáquico</b>						
Fumador vs. No fumador	1,174	0,665-2,103	0,590	0,771	0,403-1,477	0,434
<b>IMC</b>						
< 25 vs. ≥ 25	1,439	0,829-2,497	0,196	2,132	1,083-4,197	<b>0,028*</b>
<b>Estadio</b>						
III vs. IV	0,811	0,408-1,611	0,550	0,654	0,275-1,577	0,338
<b>Antibióticos previos</b>						
Sí vs. No	0,813	0,443-1,495	0,506	0,836	0,410-1,708	0,624
<b>Estado funcional</b>						
0-1 vs. 2	0,370	0,153-0,891	<b>0,027*</b>	0,414	0,159-1,075	0,070
<b>Histología</b>						
ADC vs. No-ADC	1,085	0,638-1,847	0,763	0,897	0,483-1,666	0,731
<b>PD-L1</b>						
Positivo vs. Negativo	0,534	0,306-0,933	<b>0,028*</b>	0,590	0,310-1,123	0,108

<b>Línea de tratamiento</b>						
1ra vs. 2da/3ra	0,635	0,373-1,080	0,094	0,635	0,343-1,176	0,149
<b>Tamaño tumoral</b>						
≤ 5cm vs. > 5cm	0,729	0,383-1,386	0,335	0,431	0,180-1,030	0,058
<b>Nº localizaciones metastásicas</b>						
≤ 2 vs. >2	0,780	0,451-1,347	0,373	0,768	0,406-1,451	0,416

No-fumador: incluye exfumadores de más de 1 año y nunca fumadores; IMC: Índice de masa corporal; ADC: Adenocarcinoma; PD-L1 positivo: TPS≥1%; PD-L1 negativo: TPS<1%. HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confianza. Los *p* valores se obtuvieron usando el método de regresión de Cox univariante. \**p* < 0,05.

En función del sexo, los pacientes hombres presentaron una SLP más larga en comparación con las mujeres (SLP mediana: 8,4 vs. 2,8 meses, *p*= 0,033; **Figura 16A**). Generalmente las mujeres tienen un mejor pronóstico que los hombres [199]. Cabe señalar que más del doble de pacientes en nuestra cohorte son hombres (71% vs. 29%), por lo que nuestros resultados podrían estar sesgados en cierta manera. Como cabría esperar, los pacientes con mejor estado funcional (PS 0-1) presentaron una SLP más larga en comparación con los pacientes con PS 2 (SLP mediana: 6,6 vs. 2,5 meses, *p*= 0,020; **Figura 16B**). En cuanto a la expresión de PD-L1, aunque su valor como factor pronóstico para la supervivencia sigue siendo controvertido, en nuestra cohorte los pacientes con expresión de PD-L1 positiva (TPS≥1%) presentaron una SLP más prolongada en comparación con pacientes con tumores PD-L1 negativos (TPS<1%) (SLP mediana: 8,4 vs. 3,6 meses, *p*= 0,025; **Figura 16C**), de acuerdo con reportes previos [49,50,200]. Curiosamente, nuestros resultados mostraron una SG significativamente mayor en los pacientes con IMC ≥25 en comparación con los pacientes con IMC <25 (SG mediana: no alcanzado vs. 11,4 meses, *p*= 0,025; **Figura 16D**). El IMC es una fórmula matemática que asocia la masa y la talla de un individuo. Las personas con IMC ≥25 presentan sobrepeso, mientras que las personas con IMC <25 presentan un peso normal o bajo. Generalmente, la obesidad se considera como un factor de riesgo para el cáncer y se ha observado que la tasa de muerte aumenta significativamente en los pacientes con un IMC ≥40 en comparación con aquellos con IMC <40, según datos de un estudio prospectivo realizado en más de 900.000 adultos en Estados Unidos [201]. En nuestra cohorte, la mediana de IMC fue de 25,8 (rango: 14,4-37,9), bastante menor que la

utilizada en el estudio anteriormente mencionado, lo que podría explicar la diferencia de la correlación de la SG en función al IMC. En concordancia con nuestros resultados, otros análisis en cáncer de pulmón también han encontrado que un IMC  $\geq 25$  está asociado con una mayor SG [202,203]. Debido a la inconsistencia de los resultados, se requieren estudios más precisos para investigar la relación entre IMC y pronóstico en pacientes con CPNM tratados con ICIs.



**Figura 16. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de SLP y SG de acuerdo a variables demográficas y clínico-patológicas.**

(A). Sexo y SLP. La línea verde representa los pacientes hombres, la línea roja representa las pacientes mujeres. (B). Estado funcional y SLP. La línea verde representa los pacientes con estado funcional PS 0-1, la línea roja representa los pacientes con estado funcional de PS 2. (C). Expresión de PD-L1 y SLP. La línea verde representa los pacientes con expresión positiva de PD-L1, la línea roja representa los pacientes con expresión negativa de PD-L1. (D). Índice de masa corporal y SG. La línea verde representa los pacientes con índice de masa corporal  $\geq 25$ , la línea roja representa los pacientes con índice de masa corporal  $< 25$ . SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global. *P* valores se obtuvieron usando el test de log-rango.

### 3.1.2. Correlación con la microbiota intestinal

A continuación, se indagó sobre las posibles relaciones entre la diversidad de la microbiota intestinal, estimada mediante los índices de alfa-diversidad Chao 1, Shannon e *inverse* Simpson, y las distintas características demográficas (Tabla 14) y clínico-patológicas (Tabla 15) en nuestra cohorte de estudio, utilizando la prueba *U* de Mann-Whitney.

**Tabla 14. Relación entre los índices de alfa-diversidad y las características demográficas.**

Índices	Características demográficas		
	Sexo		
	Hombre	Mujer	P valor
Chao 1	167,0 (42,0-274,0)	158,0 (78,0-263,0)	0,175
Shannon	3,46 (1,78-4,24)	3,27 (2,21-4,30)	0,315
<i>Inverse</i> Simpson	16,37 (3,32-42,93)	13,70 (4,32-41,16)	0,412
	Edad		
	≤66	>66	P valor
Chao 1	164,5 (42,0-274,0)	170,0 (79,0-252,0)	0,183
Shannon	3,39 (1,78-4,30)	3,40 (2,12-4,22)	0,334
<i>Inverse</i> Simpson	14,2 (3,32-42,93)	14,34 (3,83-33,99)	0,683
	Hábito tabáquico		
	Fumador	No fumador	P valor
Chao 1	169,0 (84,0-274,0)	165,5 (42,0-225,0)	0,075
Shannon	3,43 (2,42-4,30)	3,26 (1,78-3,88)	0,074
<i>Inverse</i> Simpson	14,51 (3,83-42,93)	14,04 (3,32-30,28)	0,127
	Índice de masa corporal		
	<25	≥25	P valor
Chao 1	166,0 (84,0-274,0)	170,0 (42,0-263,0)	0,890
Shannon	3,44 (2,42-4,30)	3,31 (1,78-4,24)	0,499
<i>Inverse</i> Simpson	14,25 (3,83-41,16)	13,92 (3,32-42,93)	0,573

No-fumador: exfumador de más de 1 año y nunca fumador. Los valores corresponden a la mediana para cada índice, según las características demográficas, y los valores entre paréntesis corresponden al rango. *P* valores se obtuvieron usando la prueba *U* de Mann-Whitney. \**p* < 0,05.

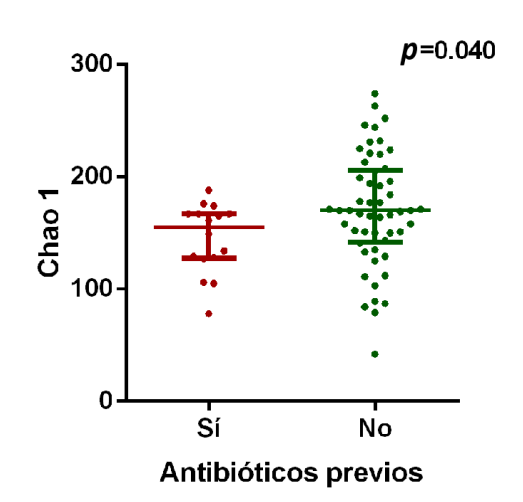
**Tabla 15. Relación entre los índices de alfa-diversidad y las características clínico-patológicas.**

Índices	Características clínico-patológicas		
	Histología		
	Adenocarcinoma	No adenocarcinoma	P valor
Chao 1	164,5 (78,0-232,0)	170,0 (42,0-274,0)	0,166
Shannon	3,32 (2,42-4,24)	3,44 (1,78-4,30)	0,290
<i>Inverse Simpson</i>	14,03 (3,83-42,93)	14,34 (3,32-41,16)	0,086
Estado funcional			
	0-1	≥2	P valor
Chao 1	167,0 (42,0-274,0)	162,5 (78,0-263,0)	0,692
Shannon	3,40 (1,78-4,30)	3,55 (2,81-4,05)	0,511
<i>Inverse Simpson</i>	14,19 (3,32-42,93)	19,11 (9,71-27,88)	0,213
Línea de tratamiento			
	1ra	2da/3ra	P valor
Chao 1	165,0 (42,0-232,0)	167,0 (106,0-274,0)	0,156
Shannon	3,30 (1,78-4,24)	3,46 (2,42-4,30)	0,234
<i>Inverse Simpson</i>	14,19 (3,32-42,93)	15,60 (3,83-41,16)	0,330
Antibiótico previo			
	Sí	No	P valor
Chao 1	155,0 (78,0-188,0)	170,0 (42,0-274,0)	<b>0,040*</b>
Shannon	3,22 (2,67-3,80)	3,44 (1,78-4,30)	0,074
<i>Inverse Simpson</i>	13,12 (5,52-25,06)	14,51 (3,32-42,93)	0,143
Estadio			
	III	IV	P valor
Chao 1	164,5 (129,0-225,0)	167,0 (42,0-274,0)	0,982
Shannon	3,50 (3,18-3,88)	3,38 (1,78-4,30)	0,519
<i>Inverse Simpson</i>	17,32 (12,04-30,28)	14,19 (3,32-42,93)	0,416
Tamaño tumoral			
	≤5 cm	>5 cm	P valor
Chao 1	157,5 (42,0-274,0)	167,0 (78,0-263,0)	0,227
Shannon	3,27 (1,78-4,30)	3,46 (2,66-4,24)	0,113
<i>Inverse Simpson</i>	12,84 (3,32-41,16)	16,37 (5,29-42,93)	0,071

Expresión de PD-L1			
	Positiva	Negativa	P valor
Chao 1	166,0 (42,0-252,0)	170,0 (106,0-274,0)	0,262
Shannon	3,36 (1,78-4,24)	3,43 (2,66-4,30)	0,503
Inverse Simpson	14,23 (3,32-42,93)	13,87 (5,29-41,16)	0,525
Número de localizaciones metastásicas			
	≤2	>2	P valor
Chao 1	165,5 (78,0-252,0)	171,0 (42,0-274,0)	0,143
Shannon	3,37 (2,42-4,24)	3,50 (1,78-4,30)	0,363
Inverse Simpson	14,08 (3,83-42,93)	17,05 (3,32-41,16)	0,307

PD-L1 positiva: TPS≥1%; PD-L1 negativa: TPS<1%. Los valores corresponden a la mediana para cada índice según la característica clínico-patológicas, y entre paréntesis, el rango. P valores se obtuvieron usando la prueba U de Mann-Whitney.

En nuestra cohorte de estudio, 16 pacientes recibieron tratamiento antibiótico en los 3 meses previos al tratamiento con ICIs; como se esperaba, estos 16 pacientes presentaron un menor índice de riqueza (Chao 1,  $p=0,040$ ; [Tabla 14](#) y [Figura 17](#)) en comparación con el resto de pacientes. Este hallazgo indica que el uso de antibióticos tiene un claro impacto en la riqueza de la composición de la microbiota intestinal.

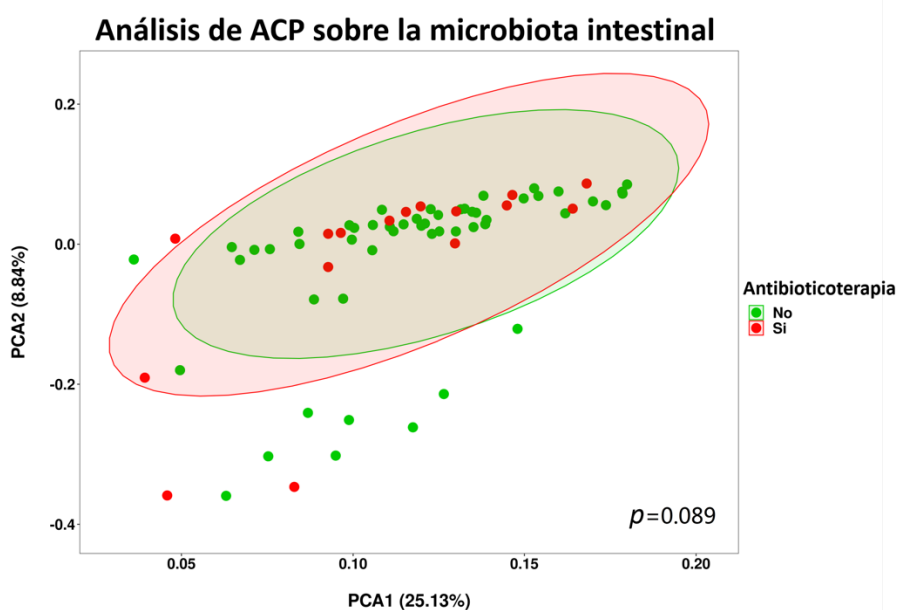


**Figura 17. Relación entre el índice de Chao 1 y la antibioticoterapia.**

P valor obtenido en la prueba U de Mann-Whitney. La línea central representa la mediana, mientras que las líneas superior e inferior muestran el rango intercuartil. Cada punto representa a un sujeto. Sí: pacientes con antibioticoterapia en un período de 0 a 3 meses antes del tratamiento con ICIs, en rojo; No: pacientes sin antibioticoterapia en los 3 meses anteriores al inicio del tratamiento con ICIs, en verde.



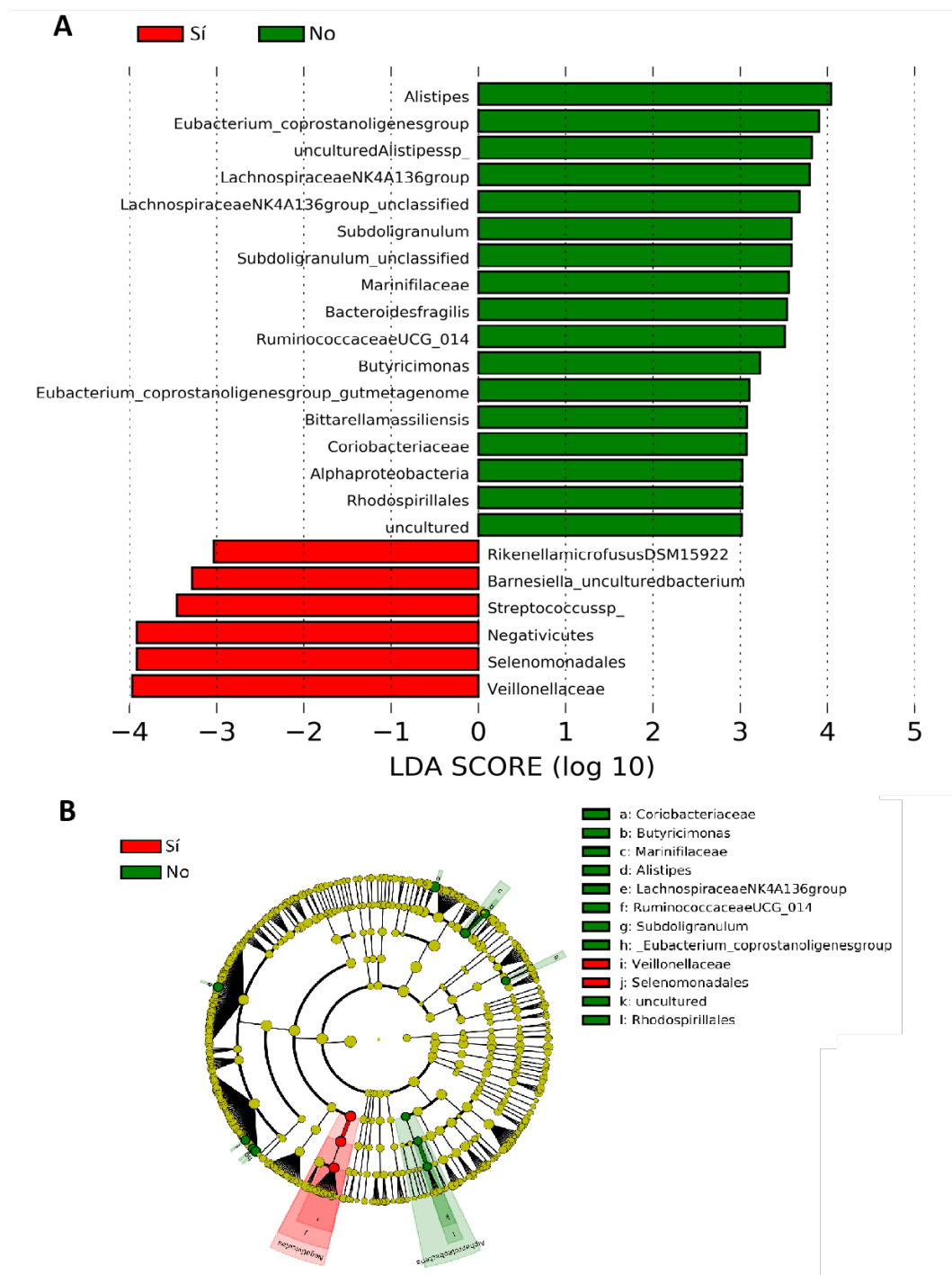
A continuación, se utilizó el análisis ACP para visualizar la diferencia de la composición microbiana intestinal entre los pacientes con y sin tratamiento antibiótico previo. En este análisis no se encontraron diferencias significativas, posiblemente debido al bajo número de pacientes incluidos en el estudio que han llevado tratamiento antibiótico previo, por lo que estos resultados deberían confirmarse en cohortes con mayor número de pacientes, ya que los análisis de ACP requieren de cohortes más extensas de datos (**Figura 18**).



**Figura 18. Análisis de componentes principales basado en la composición microbiana intestinal entre pacientes sin y con antibioticoterapia.**

Cada punto representa a un sujeto; los puntos rojos representan a los pacientes con antibioticoterapia en un período de 0 a 3 meses antes de ICIs (Sí); y los puntos verdes representan a los pacientes sin antibioticoterapia (No).  $P$  valor fue obtenido mediante el análisis de PERMANOVA.

Seguidamente, se realizó un análisis LEfSe para discriminar los microorganismos predominantes entre los dos grupos de pacientes (con y sin antibioticoterapia). Los resultados de este análisis mostraron un mayor número de microorganismos con un valor de LDA  $>3$ , es decir, estadísticamente significativos, en los pacientes sin tratamiento antibiótico. Entre los microorganismos encontrados, *Alistipes* fue el más predominante en los pacientes que no recibieron antibioticoterapia mientras que *Veillonellaceae* lo fue en los pacientes tratados con antibióticos previamente a la inmunoterapia (**Figura 19**).



**Figura 19. Análisis de LEfSe basado en la composición microbiana intestinal de acuerdo al uso de antibióticos previos a ICIs.**

(A). Histograma del análisis LEfSe. (B). Cladograma taxonómico del análisis LEfSe. Todos los microorganismos presentes en la figura tienen el  $p$  valor  $< 0,05$  mediante la prueba de Kruskal-Wallis, y una puntuación de LDA  $> 3$ . Sí (color rojo): pacientes con antibioticoterapia en un período de 0 a 3 meses antes de ICIs; No (color verde): pacientes sin antibioticoterapia; LEfSe: análisis del tamaño del efecto del análisis discriminante lineal; LDA: análisis discriminante lineal.

Actualmente, existe evidencia sustancial que apoya la fluctuación de la composición

microbiana intestinal en respuesta a factores externos, especialmente los antibióticos. La antibioticoterapia impone cambios profundos en la diversidad taxonómica del ecosistema microbiano del huésped, que puede llegar a afectar la abundancia de hasta un 30% de los microorganismos intestinales [130], disminuyendo la riqueza microbiana. Además, un estudio previo ha confirmado que el uso de antibióticos (incluidos la enrofloxacin y la vancomicina), se relaciona con un menor índice de Chao 1, lo que concuerda con nuestros resultados [204]. Nuestros resultados refuerzan el hecho de que los antibióticos alteran la microbiota intestinal, produciendo especialmente una disminución de la riqueza de las especies presentes.

En cuanto a la correlación entre el tratamiento antibiótico y la respuesta al tratamiento con ICIs, algunos informes publicados previamente señalan que el uso del antibiótico es un factor negativo en la efectividad de la inmunoterapia [163,171,205,206]. En el presente estudio, investigamos el uso del antibiótico dentro de los 3 meses antes de ICIs y no encontramos una relación significativa con los resultados clínicos (**Tabla 12** y **Tabla 13**). Existen algunos datos que pueden explicar el porqué de estos resultados. Se ha reportado que el cambio de la composición microbiana intestinal ocurre a los pocos días de la primera dosis de antibiótico y dura varias semanas después de completar el tratamiento [207,208]. Debido a la notable capacidad de la microbiota para restaurar su estado compositivo y funcional [209], la microbiota intestinal podría haberse recuperado durante el curso de la inmunoterapia. Respaldo nuestros resultados, Huemer y sus colaboradores tampoco observaron la influencia del tratamiento antibiótico en la eficacia de los tratamientos con ICIs en un análisis bicéntrico de pacientes con CPNM [174]. Otro estudio de un grupo asiático basado en pacientes con CPNM avanzado también mostró que el uso de antibióticos en los dos meses previos al tratamiento con ICIs no influyó en los resultados clínicos [123]. Kaderbhai y colaboradores, en un estudio llevado a cabo en Francia y registrando datos de forma análoga a los recogidos en el presente estudio (centrado en el uso de antibiótico en los 3 meses anteriores a la terapia con ICIs) encontraron una tasa de respuesta y una SLP similares para los pacientes con CPNM con y sin tratamiento antibiótico [175]. Diversos factores relacionados con el uso de antibióticos, como la vía de administración, el tipo de

antibióticos, el intervalo de tiempo exposición antes del tratamiento con ICIs, también podrían impactar en la composición de la comunidad microbiana intestinal, y por lo tanto para sacar conclusiones sobre su relación con la inmunoterapia, deberán diseñarse estudios de grandes cohortes donde se analicen de forma específica estos parámetros. Sobre todo el impacto de los antibióticos en el resultado clínico con ICIs debe aclararse y explorarse de forma más exhaustiva teniendo en cuenta que su uso suele ser frecuente en pacientes con cáncer de pulmón.

Por otra parte, también relacionamos la diversidad microbiana intestinal con el hábito alimentario en nuestra cohorte de estudio. Los pacientes fueron estratificados en 2 grupos según la mediana de la frecuencia del consumo de alimento. En este sentido, los pacientes del grupo “alto” fueron los pacientes con frecuencia mayor a la mediana, mientras, los pacientes del grupo denominado “bajo” fueron los pacientes con una frecuencia igual o menor a la mediana. Curiosamente, los 18 pacientes del grupo alto en consumo de carne procesada ( $\geq 2$  veces/semana) presentaron significativamente una menor diversidad microbiana intestinal en comparación con los 23 pacientes del grupo bajo, 20 pacientes de alto consumo de moluscos y crustáceos ( $\geq 0,5$  veces/semana) exhibieron baja diversidad en comparación con 23 pacientes de bajo consumo, además, 22 pacientes de alto consumo de berenjena ( $\geq 0,7$  veces/semana) también presentaron curiosamente una baja diversidad microbiana intestinal (**Tabla 16**).

**Tabla 16. Relación entre los índices de alfa-diversidad y la frecuencia del consumo de alimento.**

Índice	Frecuencia del consumo		
	Alto	Bajo	P valor
<b>Carne procesada</b>			
Chao 1	142,0 (78,0-231,0)	170,0 (87,0-263,0)	<b>0,011*</b>
Shannon	3,14 (2,12-3,74)	3,53 (2,89-4,24)	<b>0,001*</b>
<i>Inverse Simpson</i>	11,12 (3,83-22,42)	18,27 (9,56-42,93)	<b>0,001*</b>
<b>Moluscos y crustáceo</b>			
Chao 1	165,0 (78,0-231,0)	167,0 (79,0-263,0)	0,324
Shannon	3,26 (2,67-3,80)	3,53 (2,12-4,24)	<b>0,019*</b>
<i>Inverse Simpson</i>	13,21 (5,29-25,26)	17,75 (4,32-42,93)	<b>0,019*</b>
<b>Berenjena</b>			
Chao 1	151,0 (78,0-252,0)	168,5 (111,0-263,0)	0,092
Shannon	3,22 (2,12-4,22)	3,56 (2,42-4,30)	<b>0,022*</b>
<i>Inverse Simpson</i>	12,49 (4,32-33,99)	18,05 (3,83-42,93)	<b>0,025*</b>

Los valores corresponden a la mediana para cada índice según el consumo de alimento, y entre paréntesis, el rango. P valores se obtuvieron usando la prueba U de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$ .

La composición microbiana está influida por distintos factores externos y uno de los más importantes es la dieta [125,126]. La carne procesada es un producto en cuya composición se incluyen diversos aditivos alimentarios tales como carboximetilcelulosa, monolaurato de glicerol, etc., compuestos que podrían influir en la composición microbiana intestinal [210]. La berenjena, una especie vegetal de la familia de las solanáceas, es una fuente natural de solanina. La solanina tiene propiedades pesticidas, es una de las defensas naturales de la planta y pertenece a la familia química de las saponinas. Varios estudios revelaron que la solanina exhibía la función de inducir el proceso de apoptosis en organismos multicelulares [211]. Así, la berenjena podría influir en la diversidad microbiana mediante la función de la solanina. Nuestro estudio tiene limitaciones principalmente relacionadas con el tamaño de muestra, pero incluye un grupo homogéneo de pacientes, todos los pacientes incluidos

residen en Valencia y no hay una gran diferencia en sus hábitos alimenticios. Aún con estas limitaciones, el presente estudio pone de manifiesto la relación entre algunos componentes de la dieta y posibles modificaciones en la composición de la microbiota intestinal, hallazgo que debería validarse en futuros estudios.

## 3.2. Toxicidad relacionada con ICIs

### 3.2.1. Correlación con el resultado clínico

Como la toxicidad relacionada con ICIs es un evento importante en el curso de la inmunoterapia y 26 pacientes de nuestra cohorte presentaron uno o más tipos de toxicidad relacionada con los tratamientos inmunoterápicos, a continuación, analizamos la relación entre la presencia de toxicidades y el resultado clínico. Según el resultado de la prueba Chi-cuadrado, la presencia de toxicidades se relacionaba con mejor respuesta tanto en la cohorte global, como en el subgrupo de pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea (Tabla 17).

**Tabla 17. Correlación entre la toxicidad relacionada con ICIs y la respuesta.**

Toxicidad	BCD	No-BCD	P valor
<b>Cohorte global</b>			
<b>Toxicidad relacionada con ICIs</b>			
Sí	18 (54,5%)	8 (22,2%)	
No	15 (45,5%)	28 (77,8%)	<b>0,006*</b>
<b>Pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea</b>			
<b>Toxicidad relacionada con ICIs</b>			
Sí	13 (65,0%)	2 (11,8%)	
No	7 (35,0%)	15 (88,2%)	<b>0,001*</b>
<b>Pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea</b>			
<b>Toxicidad relacionada con ICIs</b>			
Sí	5 (38,5%)	6 (31,6%)	
No	8 (61,5%)	13 (68,4%)	0,687

P valores se obtuvieron usando el test chi-cuadrado. \* $p < 0,05$ .

El valor pronóstico de la presencia de la toxicidad también se evaluó mediante el

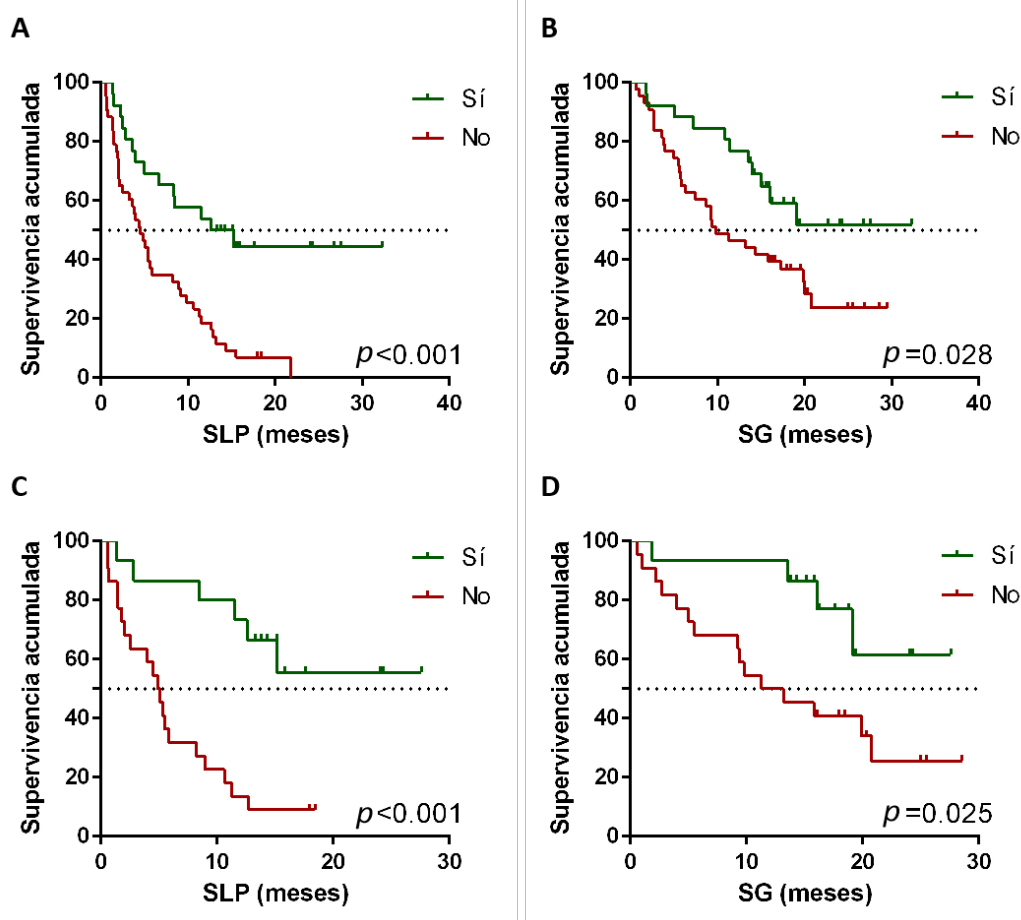
método de regresión de Cox univariante para SLP y SG. Los resultados se muestran en la **Tabla 18**, donde se indica que la presencia de toxicidad relacionada con ICIs fue factor pronóstico para SLP y SG en la cohorte global y en el subgrupo de pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea.

**Tabla 18. Resultados del análisis de regresión Cox basado en la toxicidad relacionada con ICIs.**

Toxicidad relacionada con ICIs	SLP			SG		
	HR	IC 95%	P valor	HR	IC 95%	P valor
<b>Cohorte global</b>						
Sí vs. No	0,326	0,176-0,606	<0,001*	0,469	0,234-0,938	<b>0,032*</b>
<b>Pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea</b>						
Sí vs. No	0,202	0,079-0,518	<b>0,001*</b>	0,302	0,100-0,914	<b>0,034*</b>
<b>Pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea</b>						
Sí vs. No	0,567	0,249-1,292	0,177	0,725	0,295-1,784	0,484

HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confianza. P valores se obtuvieron usando el método de regresión de Cox univariante. \* $p < 0,05$ .

Seguidamente, se analizaron estos datos mediante el método de Kaplan-Meier (estadístico log-rango) para obtener las curvas de supervivencia, las cuales muestran que los pacientes que manifestaron algún tipo de toxicidad son los que presentan SLP y SG más prolongadas (**Figura 20**).



**Figura 20. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de SLP y SG de acuerdo a la toxicidad relacionada con ICIs.**

(A) SLP y (B) SG de acuerdo con la presencia de toxicidades en la cohorte global; (C) SLP y (D) SG de acuerdo a la presencia de toxicidades en el subgrupo de pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea. La línea verde representa los pacientes con toxicidad relacionada con ICIs, la línea roja representa los pacientes sin toxicidad. SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global. *P* valores se obtuvieron usando el test de log-rango.

En cuanto a la toxicidad relacionada con ICIs, estudios anteriores han demostrado que la aparición de toxicidades, sobre todo inmunorelacionadas, se asocia significativamente con un mejor resultado de los tratamientos bloqueantes del eje PD-1/PD-L1, incluido el CPNM [195,212], hallazgos consistentes con nuestros resultados. En cuanto al mecanismo de acción de los inhibidores dirigidos al eje PD-1/PD-L1, mientras que activan las células T para destruir a las células cancerosas, el sistema inmunológico está sobreactivado y las células T activadas también pueden ejercer su efecto citotóxico sobre algunas células de tejidos normales (en particular las glándulas del sistema endocrino o la piel suelen ser un blanco muy frecuente) y causar efectos adversos inmunomediados. Desde un punto de vista patogénico, las



toxicidades surgen como consecuencia de una respuesta inmune exacerbada. En este sentido, cuando ocurre una reacción adversa, indica que el sistema inmunológico se ha activado efectivamente, lo que también confirma que el efecto del tratamiento es mejor cuando se objetiva algún tipo de reacción adversa [213,214].

### 3.2.2. Correlación con la microbiota intestinal

A continuación, intentamos relacionar los diferentes índices de alfa-diversidad con la toxicidad inmunomediada para estudiar el efecto de la microbiota intestinal sobre la toxicidad inmunomediada. La **Tabla 19** muestra los resultados obtenidos de la prueba *U* de Mann-Whitney.

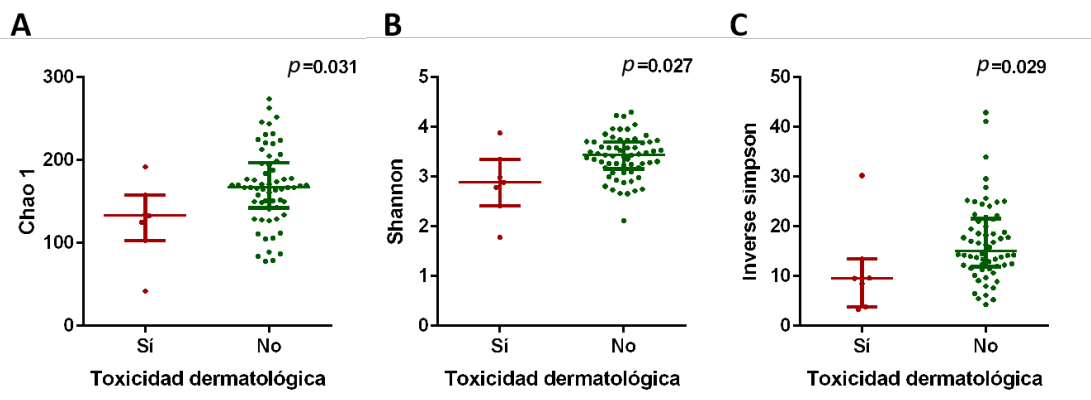
**Tabla 19. Relación entre los índices de alfa-diversidad y las toxicidades relacionadas con ICIs.**

Índice	Toxicidades relacionadas con ICIs		
	Sí	No	P valor
<b>Toxicidades relacionadas con ICIs</b>			
Chao 1	151,5 (42,0-263,0)	167,0 (78,0-274,0)	0,093
Shannon	3,33 (1,78-4,24)	3,46 (2,66-4,30)	0,211
<i>Inverse Simpson</i>	13,64 (3,32-42,93)	16,37 (5,29-41,16)	0,328
<b>Toxicidad endocrina</b>			
	Sí	No	P valor
Chao 1	171,0 (87,0-263,0)	165,0 (42,0-274,0)	0,504
Shannon	3,50 (2,75-4,05)	3,37 (1,78-4,30)	0,386
<i>Inverse Simpson</i>	17,05 (7,64-30,28)	14,20 (3,32-42,93)	0,341
<b>Toxicidad dermatológica</b>			
	Sí	No	P valor
Chao 1	133,0 (42,0-192,0)	167,0 (78,0-274,0)	<b>0,031*</b>
Shannon	2,89 (1,78-3,88)	3,44 (2,12-4,30)	<b>0,027*</b>
<i>Inverse Simpson</i>	9,56 (3,32-30,28)	15,16 (4,32-42,93)	<b>0,029*</b>

<b>Toxicidad gastrointestinal</b>			
	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>P valor</b>
Chao 1	151,0 (42,0-220,0)	167,0 (78,0-274,0)	0,387
Shannon	3,27 (1,78-4,24)	3,41 (2,12-4,30)	0,781
<i>Inverse Simpson</i>	13,97 (3,32-42,93)	14,30 (3,83-41,16)	0,984
<b>Toxicidad pulmonar (Neumonitis)</b>			
	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>P valor</b>
Chao 1	152,0 (151,0-176,0)	167,0 (42,0-274,0)	0,848
Shannon	3,38 (3,27-3,59)	3,41 (1,78-4,30)	0,918
<i>Inverse Simpson</i>	13,76 (1,36-18,86)	14,30 (3,32-42,93)	0,953
<b>Toxicidad renal</b>			
	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>P valor</b>
Chao 1	174,5 (79,0-192,0)	166,0 (42,0-274,0)	0,632
Shannon	3,49 (2,12-3,88)	3,38 (1,78-4,30)	0,741
<i>Inverse Simpson</i>	17,80 (4,32-30,28)	14,21 (3,32-42,93)	0,509
<b>Toxicidad hepática</b>			
	<b>Sí</b>	<b>No</b>	<b>P valor</b>
Chao 1	42,0 (42,0-192,0)	167,0 (78,0-274,0)	0,062
Shannon	3,13 (1,78-3,88)	3,43 (2,12-4,30)	0,160
<i>Inverse Simpson</i>	12,75 (3,32-30,28)	14,34 (3,83-42,93)	0,315

Los valores corresponden a la mediana para cada índice según la presencia de toxicidades, y entre paréntesis se muestra el rango de valores. *P* valores se obtuvieron usando la prueba *U* de Mann-Whitney. \**p* < 0,05.

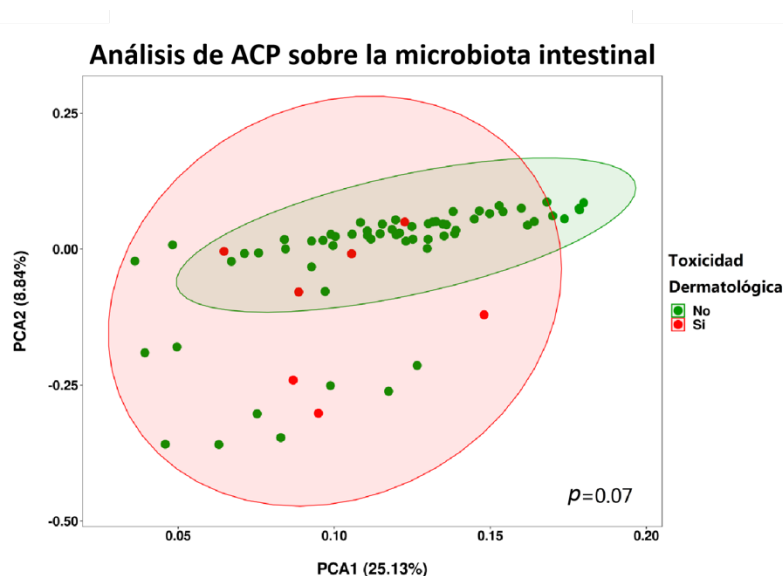
En nuestro estudio se objetiva que los pacientes con toxicidad dermatológica presentan una diversidad de la microbiota intestinal más baja, presentando menores valores de Chao 1, Shannon e *inverse Simpson* que los pacientes sin esta toxicidad (*p*= 0,031, *p*= 0,027, *p*= 0,029, respectivamente; **Tabla 19** y **Figura 21**).



**Figura 21. Relación entre los índices de alfa-diversidad y la toxicidad dermatológica relacionada con ICIs.**

(A). Índice de Chao 1. (B). Índice de Shannon. (C). Índice de *inverse* Simpson. *P* valores obtenidos en la prueba *U* de Mann-Whitney. La línea central representa la mediana, mientras que las líneas superior e inferior muestran el rango intercuartil. Cada punto representa a un sujeto. Sí: pacientes con toxicidad dermatológica, en rojo; No: pacientes sin toxicidad dermatológica, en verde.

Se utilizó el análisis de ACP para visualizar la diferencia de la composición microbiana intestinal entre los pacientes con toxicidad dermatológica y sin toxicidad dermatológica. Sin embargo, este análisis no reveló resultados significativos al realizar la comparación entre los dos grupos de pacientes (Figura 22).

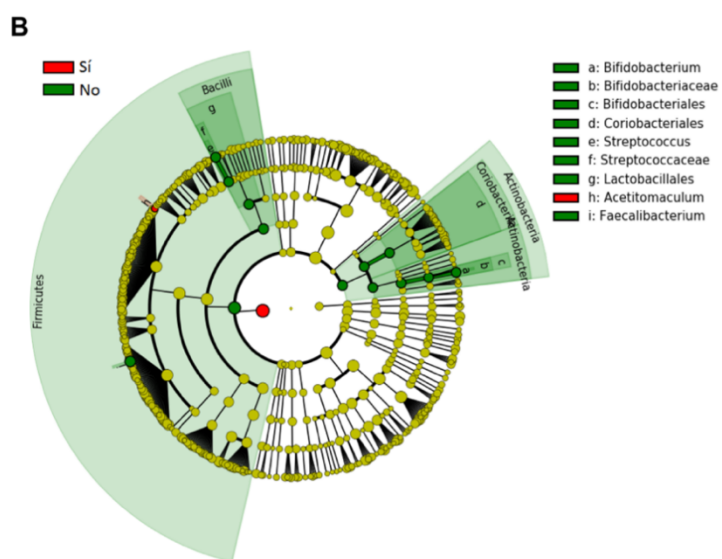
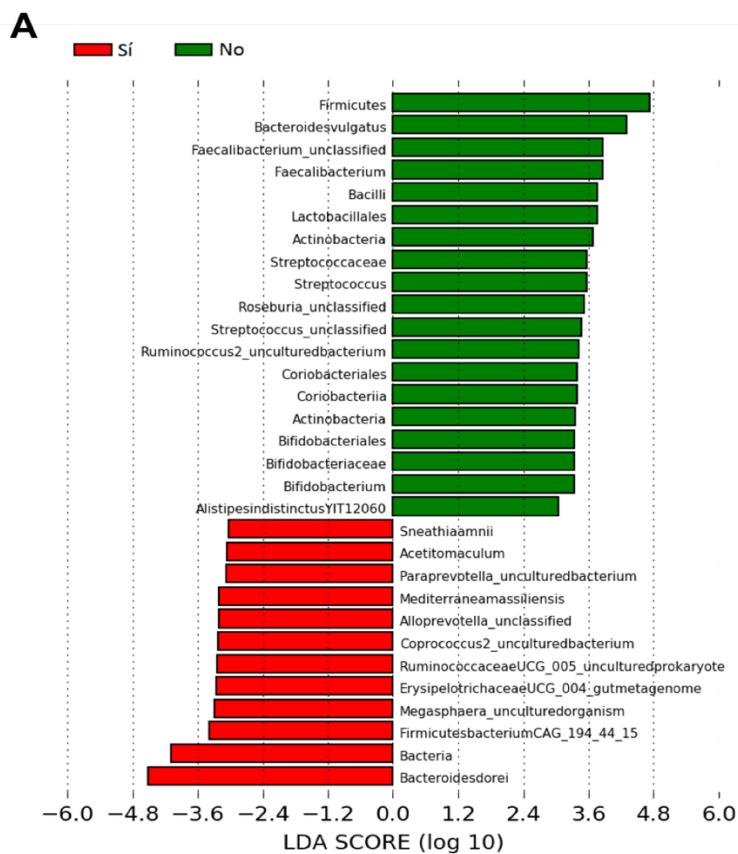


**Figura 22. Análisis de componentes principales basado en la composición microbiana intestinal entre pacientes sin y con toxicidad dermatológica.**

Cada punto representa a un sujeto, los puntos verdes representan a los pacientes sin toxicidad dermatológica (No), los puntos rojos representan a los pacientes con toxicidad dermatológica (Sí). *P* valor obtenido en el análisis de PERMANOVA.

Por otro lado, utilizamos el análisis LEfSe a nivel de microorganismos para ver cuáles de ellos se encontraban enriquecidos en los pacientes con toxicidad dermatológica. Entre los microorganismos encontrados, *Bacteroides dorei* fue el más frecuente en los pacientes que presentaron toxicidad dermatológica, mientras que *Firmicutes*, *Lactobacillales* y *Bifidobacterium* estaban dentro de los microorganismos dominantes en pacientes que no presentaron este tipo de toxicidades (**Figura 23**).

Las toxicidades dermatológicas son efectos adversos tempranos y frecuentes en los tratamientos con ICIs y varían desde la erupción cutánea o prurito hasta el vitiligo [215,216]. Nuestros resultados sugieren que la microbiota intestinal puede predecir la susceptibilidad a los eventos adversos dermatológicos asociados a la inmunoterapia debido, probablemente, a la existencia de un eje intestino-piel. El intestino y la piel son órganos densamente vascularizados y ricamente inervados con funciones inmunes y neuroendocrinas cruciales [217]. Se ha propuesto la existencia de un eje intestino-piel y se ha demostrado que la microbiota intestinal es un importante regulador del mismo [218]. La piel puede realizar sus funciones (protección, regulación de la temperatura, retención de agua y más) cuando se encuentra en un estado de homeostasis. Existe evidencia que indica que la microbiota intestinal puede afectar esta homeostasis de la piel, que parece estar relacionada con el efecto modulador de los comensales intestinales sobre la inmunidad sistémica, aunque los mecanismos aún no están explorados completamente [217]. Como se ha mencionado anteriormente, la microbiota intestinal tiene un papel muy importante en la inmunidad humana. Las bacterias y sus metabolitos pueden influir en la modulación de las funciones dermatológicas, relacionándose con las enfermedades inflamatorias de la piel [219,220]. Por otra parte, la microbiota intestinal presenta la capacidad de sintetizar moléculas que pueden acceder a la circulación y afectar localizaciones a distancia, por ejemplo, la piel [217]. Además, se ha informado que se puede encontrar DNA de origen intestinal bacteriano circulando en la sangre de pacientes con psoriasis, indicando que las bacterias intestinales pueden entrar en la circulación, posiblemente a través de una barrera intestinal alterada, y viajar a la piel [221].



**Figura 23. Análisis de LEfSe basado en la composición microbiana intestinal según la presencia de toxicidad dermatológica.**

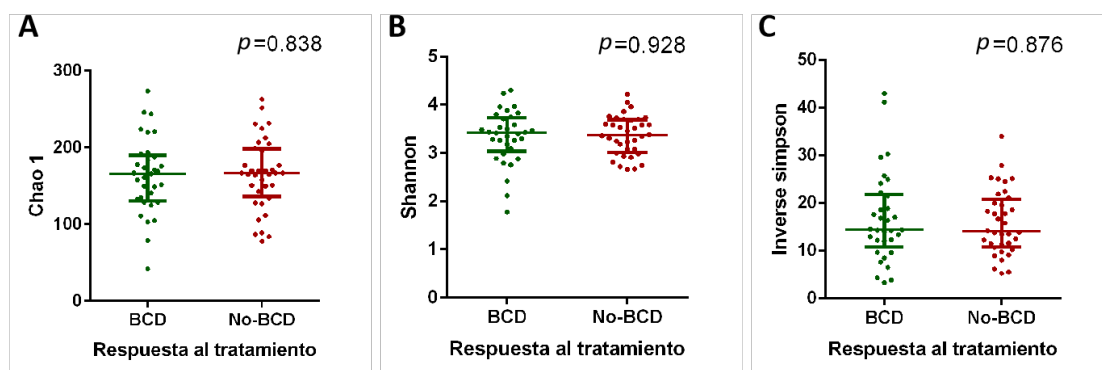
(A). Histograma del análisis LEfSe. (B). Cladograma taxonómico del análisis LEfSe. Todos los microorganismos presentes en la figura tienen el  $p$  valor menor a 0,05 mediante la prueba de Kruskal-Wallis y una puntuación de LDA mayor a 3. Sí (color rojo): pacientes con toxicidad dermatológica; No (color verde): pacientes sin toxicidad dermatológica. LEfSe: tamaño del efecto de análisis discriminante lineal; LDA: análisis discriminante lineal.

En nuestro estudio, el análisis de LEfSe revela que *Lactobacillales* y *Bifidobacterium* son algunas de las bacterias enriquecidas en pacientes sin toxicidad dermatológica relacionada con ICIs. Curiosamente, *Lactobacillus*, un género dentro del orden *Lactobacillales*, y *Bifidobacterium*, del orden *Bifidobacteriales*, son probióticos que han demostrado eficacia en el tratamiento de la dermatitis o enfermedades inflamatorias crónicas, como la psoriasis [222]. En este sentido, la suplementación oral con *Lactobacillus casei* en modelos de ratón ha demostrado reducir la inflamación de la piel inhibiendo la señalización de IFN- $\gamma$  y las células efectoras de hipersensibilidad T CD8+ [223], aumentando la secreción de IL-10 y activando el las células T reguladoras FoxP3+ en la piel [224]. Por otro lado, en humanos, se ha demostrado que la administración de especies de *Bifidobacterium* reduce los niveles de biomarcadores proinflamatorios sistémicos, incluida la proteína C reactiva y el TNF- $\alpha$  en pacientes con psoriasis [222], y la suplementación con una mezcla de las cepas de *Bifidobacterium* en mujeres embarazadas da como resultado una menor incidencia de eczemas en los lactantes [225]. En el presente estudio, destacamos la relación entre la microbiota intestinal y la toxicidad dermatológica relacionada con ICIs. Sin embargo, las bacterias y el mecanismo a través del cual la microbiota intestinal influye en la aparición de toxicidad dermatológica deben explorarse en profundidad, ya que podría proporcionar nuevos enfoques para el manejo de dicha toxicidad.

### 3.3. Microbiota intestinal y el resultado clínico

#### 3.3.1. Diversidad microbiana intestinal

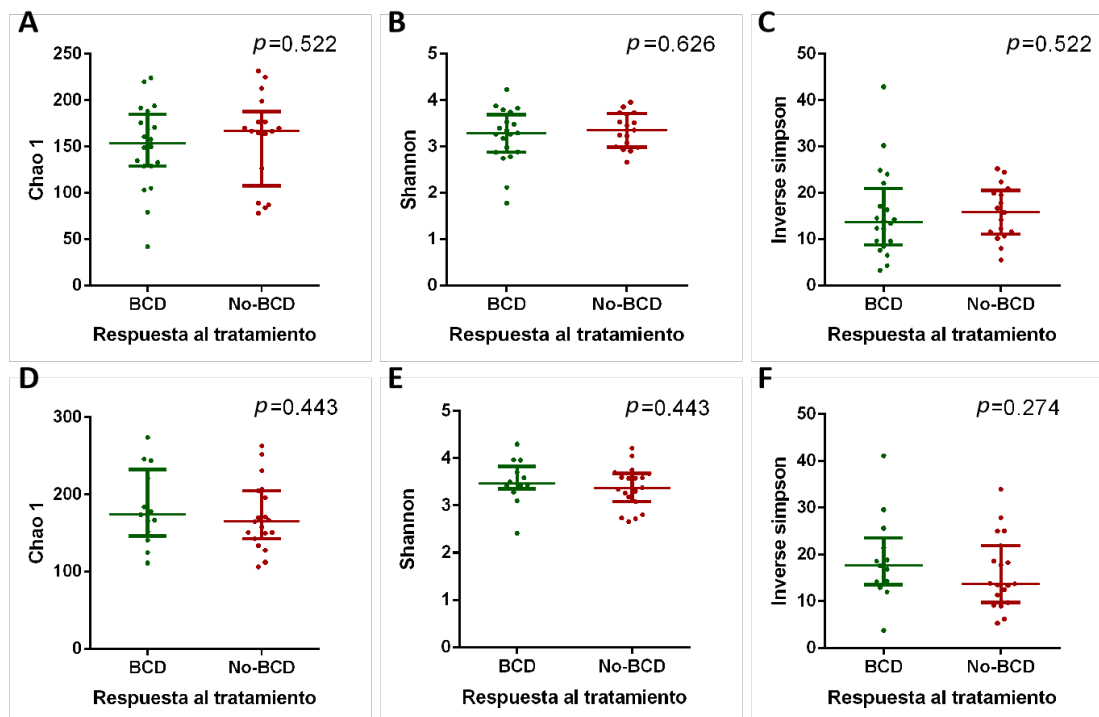
Para conocer el impacto de la microbiota intestinal sobre la respuesta al tratamiento con ICIs, primero comparamos la alfa-diversidad entre los pacientes con BCD y no-BCD utilizando la prueba *U* de Mann-Whitney para los índices de Chao 1, Shannon, *inverse* Simpson, no observándose diferencias significativas entre ambos grupos de respuesta (Figura 24).



**Figura 24. Relación entre los índices de alfa-diversidad y la respuesta a ICIs.**

(A). Índice de Chao 1. (B). Índice de Shannon. (C). Índice de *inverse* Simpson. *P* valores obtenidos en la prueba *U* de Mann-Whitney. La línea central representa la mediana, mientras que las líneas superior e inferior muestran el rango intercuartil. Cada punto representa a un sujeto. BCD: beneficio clínico duradero, en verde; No-BCD: no beneficio clínico duradero, en rojo.

A continuación, se validó el efecto de microbiota intestinal sobre la respuesta a la inmunoterapia de acuerdo al tipo de inmunoterapia (pembrolizumab en primera línea; nivolumab o atezolizumab en segunda o tercera línea de tratamiento). Como en la cohorte global, no se detectaron diferencias significativas de acuerdo a diferentes respuestas en los dos subgrupos (Figura 25).

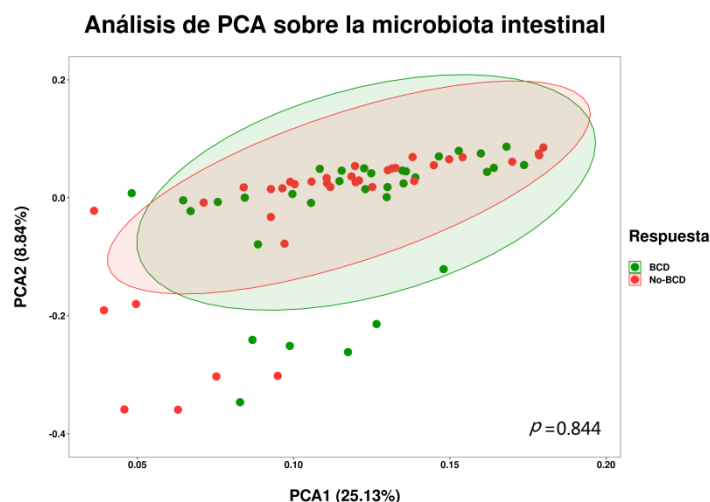


**Figura 25. Relación entre los índices de alfa-diversidad y la respuesta según la línea de tratamiento con ICIs.**

(A)-(C). Índice de Chao 1, Shannon e *inverse* Simpson, respectivamente, para los pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea. (D)-(F). Índice de Chao 1, Shannon e *inverse* Simpson, respectivamente, para los pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea. *P* valores obtenidos en la prueba *U* de Mann-Whitney. La línea central representa la mediana, mientras que las líneas superior e inferior muestran el rango intercuartil. Cada punto representa a un sujeto. BCD: beneficio clínico duradero, en verde; No-BCD: no beneficio clínico duradero, en rojo.

A continuación, se realizó el análisis de ACP para visualizar la similitud o diferencia de la composición microbiana para los pacientes con BCD y no-BCD al tratamiento con ICIs, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de pacientes (Figura 26).

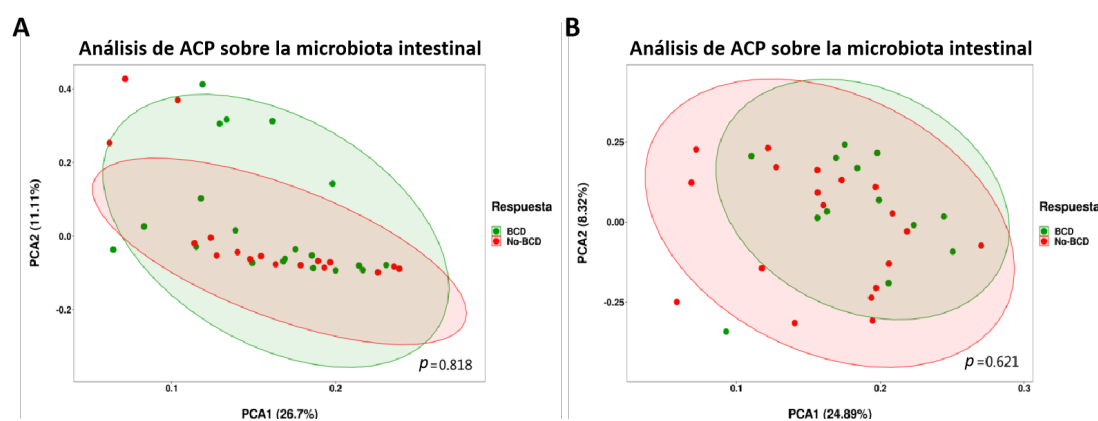




**Figura 26. Análisis de componentes principales basado en la composición microbiana intestinal entre pacientes con BCD y no-BCD.**

Cada punto representa a un sujeto, los puntos verdes representan a los pacientes con BCD (beneficio clínico duradero) al tratamiento con ICIs, los puntos rojos representan a los pacientes no-BCD.  $P$  valor obtenido en el análisis de PERMANOVA.

También, se realizó el análisis de ACP para visualizar posibles diferencias en la composición microbiana para los pacientes con diferentes respuestas a ICIs según la línea de tratamiento. No se observaron diferencias significativas entre los pacientes con BCD y no-BCD al tratamiento con ICIs tanto para pacientes tratados con pembrolizumab como para pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab ( $p= 0,818$ ,  $p= 0,621$ , respectivamente; **Figura 27**).



**Figura 27. Análisis de componentes principales basado en la composición microbiana intestinal entre pacientes con BCD y no-BCD según la línea de tratamiento con ICIs.**

(A). Subgrupo de pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea. (B). Subgrupo de pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea. Cada punto representa a un sujeto, los puntos verdes representan a los pacientes con BCD (beneficio clínico duradero) al tratamiento con ICIs, los puntos rojos representan a los pacientes no-BCD.  $P$  valores obtenidos en el análisis de PERMANOVA.

Para estudiar el valor pronóstico de los diferentes índices de alfa-diversidad, se realizó un análisis de regresión de Cox univariante para la SLP y la SG. Para ello, el primer paso fue dicotomizar las variables continuas para así poder clasificar los pacientes en dos grupos, de esta manera el grupo “alto” incluye los pacientes que tienen un índice igual o superior a la mediana y el grupo “bajo” es inferior a la mediana. En nuestra cohorte, la mediana del índice de Chao 1 fue 167, la mediana del índice Shannon fue 3,40 y la de *inverse* Simpson fue 14,25. En la **Tabla 20** se recogen los resultados para los diferentes índices y análisis estudiados en nuestra cohorte.

**Tabla 20. Resultados del análisis de regresión de Cox basado en índices de alfa-diversidad.**

Índices	SLP			SG		
	HR	IC 95%	P valor	HR	IC 95%	P valor
<b>Chao 1</b>						
Alto vs. Bajo	1,147	0,675-1,949	0,613	1,406	0,759-2,605	0,278
<b>Shannon</b>						
Alto vs. Bajo	1,066	0,627-1,811	0,814	0,931	0,504-1,719	0,819
<b><i>Inverse</i> Simpson</b>						
Alto vs. Bajo	1,080	0,635-1,836	0,776	0,717	0,386-1,330	0,291

El valor de corte es la mediana: 167 (Chao 1), 3,40 (Shannon), 14,25 (*inverse* Simpson). HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confianza. Los p valores se obtuvieron usando el método de regresión de Cox univariante.

El valor pronóstico de los índices de alfa-diversidad sobre la SLP y la SG también se evaluó según la línea de tratamiento con ICIs. En la siguiente tabla se recogen los resultados para los diferentes índices y análisis realizados en las dos cohortes, no existiendo diferencias estadísticamente significativas con la supervivencia en los 2 subgrupos de pacientes (**Tabla 21**).

**Tabla 21. Resultados del análisis de regresión de Cox basado en índices de alfa-diversidad según la línea de tratamiento con ICIs.**

Índices	SLP			SG		
	HR	IC 95%	P valor	HR	IC 95%	P valor
<b>Pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea</b>						
<b>Chao 1</b>						
Alto vs. Bajo	1,309	0,605-2,832	0,494	2,047	0,819-5,119	0,125
<b>Shannon</b>						
Alto vs. Bajo	1,414	0,650-3,073	0,383	1,331	0,540-3,284	0,534
<b>Inverse Simpson</b>						
Alto vs. Bajo	1,641	0,755-3,567	0,211	1,040	0,421-2,569	0,932
<b>Pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea</b>						
<b>Chao 1</b>						
Alto vs. Bajo	0,956	0,458-1,996	0,905	0,945	0,408-2,186	0,894
<b>Shannon</b>						
Alto vs. Bajo	0,628	0,296-1,331	0,225	0,560	0,241-1,302	0,178
<b>Inverse Simpson</b>						
Alto vs. Bajo	0,614	0,294-1,282	0,194	0,480	0,205-1,128	0,092

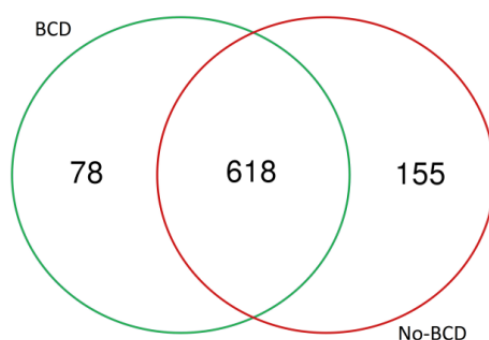
El valor de corte es la mediana: 167 (Chao 1), 3,40 (Shannon), 14,25 (*inverse Simpson*). HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confianza. Los *p* valores se obtuvieron usando el método de regresión de Cox univariante.

Hasta la fecha, existen estudios limitados que analizan el valor predictivo y pronóstico de la diversidad microbiana intestinal en el tratamiento con ICIs y, además, los resultados son inconsistentes y a veces contradictorios. Se ha visto que los pacientes con melanoma respondedores al tratamiento con ICIs presentan una alta mediana del índice de *inverse Simpson* en comparación con los pacientes no respondedores [166]. En CPNM, los pacientes respondedores a nivolumab presentan un alto de índice de Shannon e *inverse Simpson* en comparación con los pacientes no respondedores [123]. Sin embargo, un estudio en carcinoma de células renales metastásico y otro estudio en CPNM no mostraron diferencias significativas entre los pacientes respondedores y no respondedores a ICIs respecto a la

diversidad microbiana intestinal [226,227]. Además, en publicaciones recientes, la diversidad no se relaciona con la supervivencia global en los pacientes con CPNM tratados con ICIs [227,228]. Consistente con estos hallazgos, nuestro estudio no reveló relaciones significativas entre la diversidad y la respuesta a ICIs. Aunque el índice de alfa-diversidad es un indicador que refleja la composición de la microbiota, el ecosistema microbiano, la composición y el número de comunidades microbianas fluctúan en un equilibrio dinámico bajo la influencia de factores externos. La diferencia en las poblaciones de pacientes incluidos en los estudios, el uso de ICIs específicos y el tipo de cáncer pueden explicar porqué los resultados varían entre los distintos estudios realizados. Además, se debe tener en cuenta el limitado tamaño de muestra en nuestro estudio, ya que la relación entre la diversidad microbiana intestinal y el resultado clínico debería explorarse en una cohorte que incluya un mayor número de pacientes.

### 3.3.2. Composición microbiana intestinal

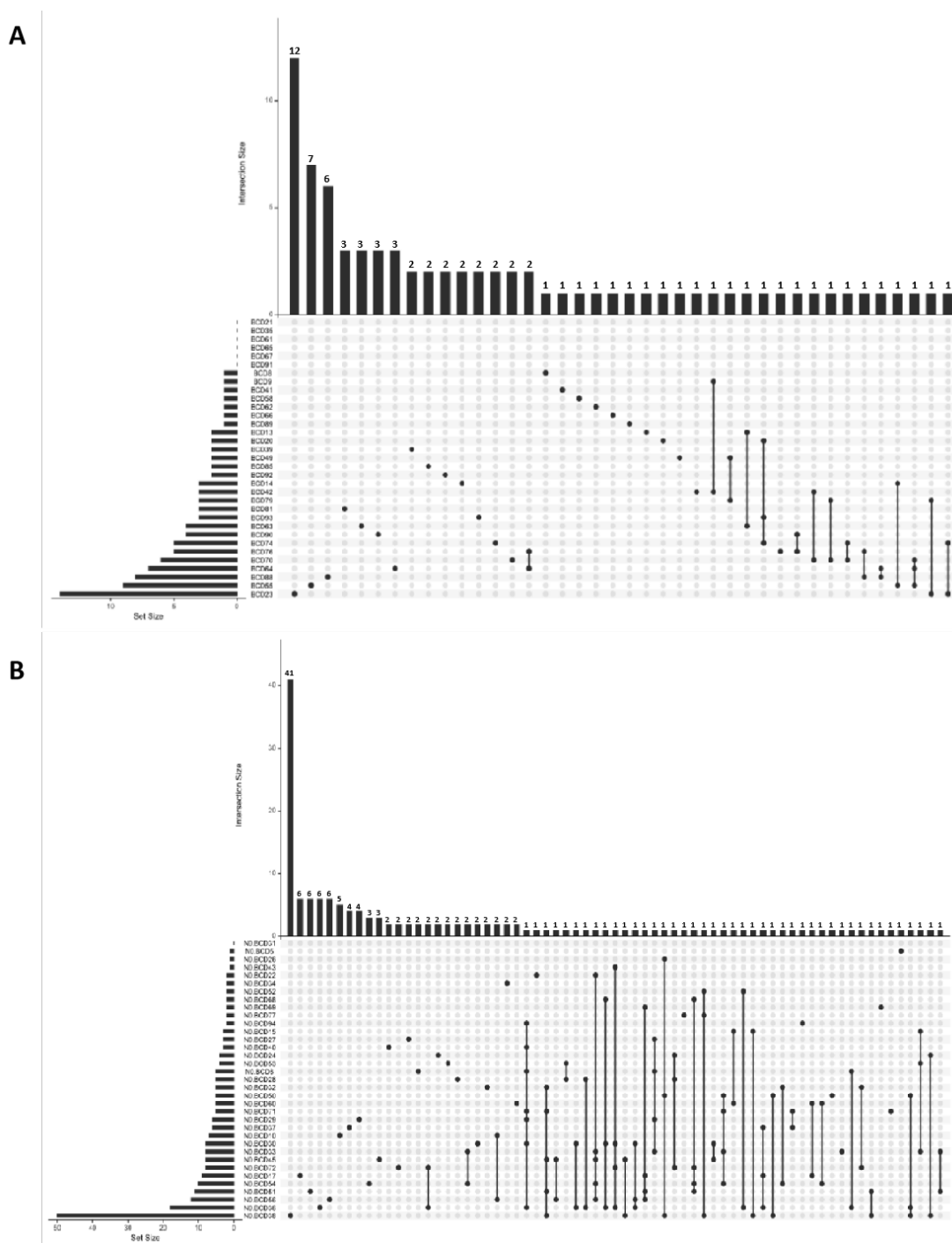
Para estudiar si la composición de la microbiota intestinal influenciaba el resultado clínico al tratamiento con ICIs, se analizó la composición de ésta en los pacientes BCD y no-BCD. Para ello, comparamos el número de taxones entre estos dos grupos mediante el diagrama de Venn, observando que de los 851 taxones obtenidos, 78 eran exclusivos para los pacientes con BCD y 155 eran exclusivos para los pacientes no-BCD (**Figura 28**).



**Figura 28. Diagrama de Venn basado en la composición microbiana intestinal según la respuesta a ICIs.**

Los números en cada parte del diagrama indican el número de microorganismos diferentes en cada sección. BCD: beneficio clínico duradero.

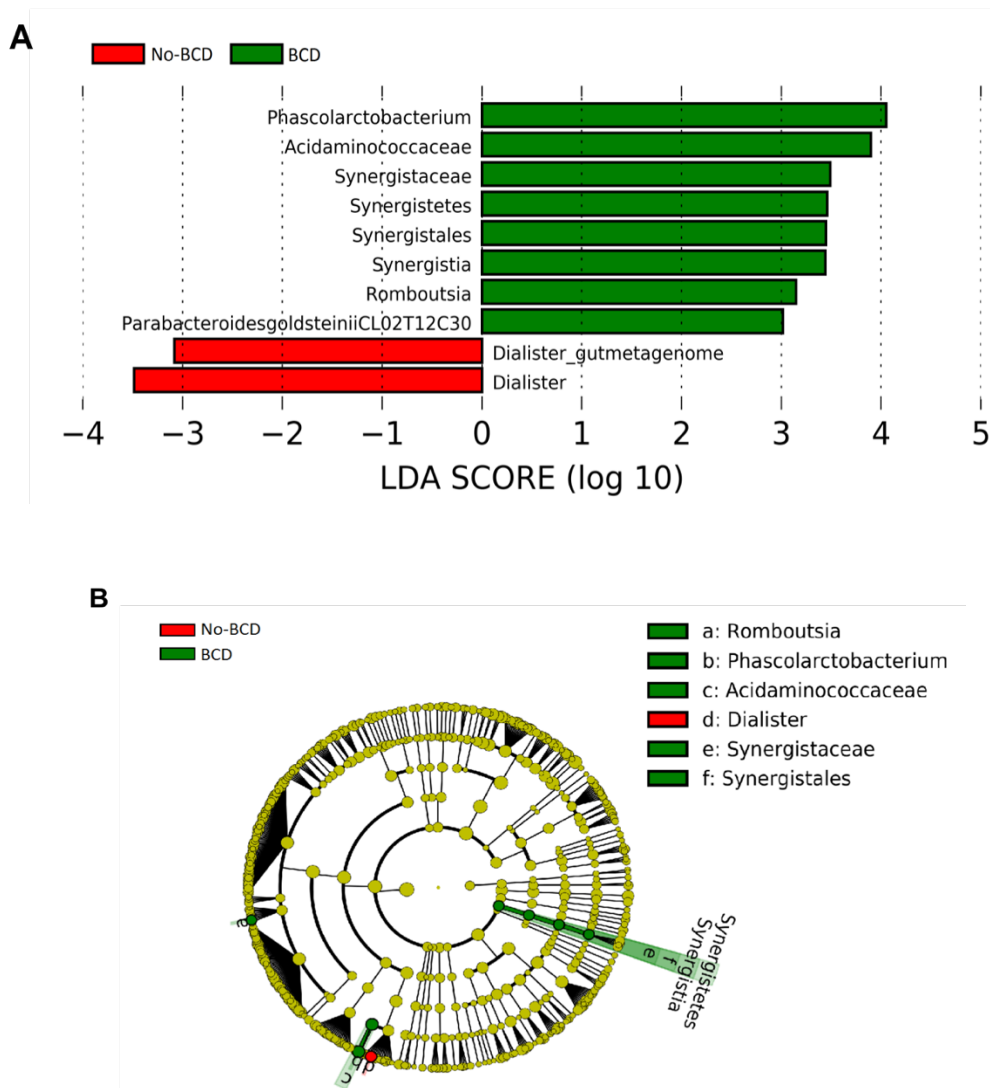
Sin embargo, mediante el uso de la versión avanzada del diagrama de Venn, gráfico UpSet, pudimos visualizar que estos taxones exclusivos de los grupos BCD y no-BCD no se distribuían homogéneamente en todos los pacientes BCD o no-BCD, sino que eran detectados en pocos pacientes de estos grupos, indicando variabilidad entre pacientes (Figura 29). Debido a esta variabilidad, el uso de los grupos de taxones exclusivos se evitó en los análisis posteriores.

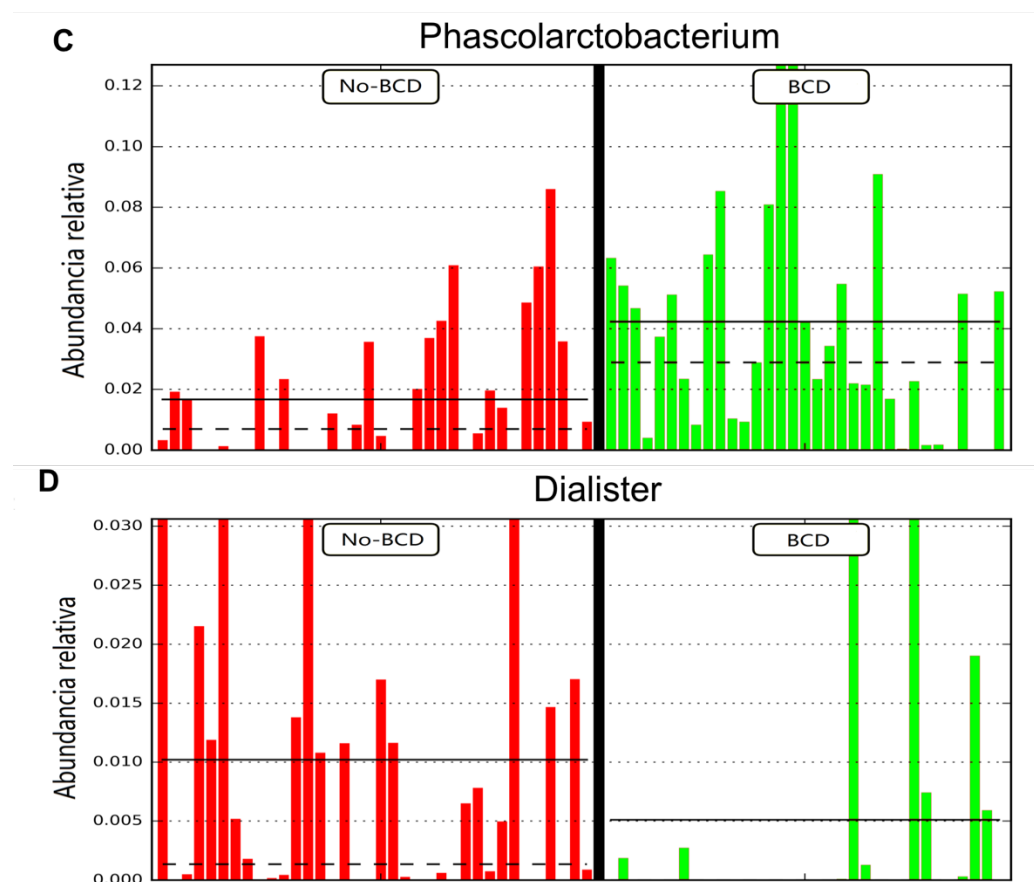


**Figura 29. Gráficos UpSet que ilustran la intersección cuantitativa de los microorganismos exclusivos para pacientes con BCD y no-BCD.**

(A). Gráfico Upset para pacientes con BCD. (B). Gráfico Upset para pacientes con no-BCD. El gráfico de barras de la parte superior muestra el número de taxones bacterianos exclusivos o colección de taxones exclusivos comunes en los pacientes. El gráfico de barras de la izquierda muestra el número total de taxones bacterianos exclusivos detectados en un paciente determinado. En la matriz de puntos, que se observa a la derecha del número de paciente, los puntos grises indican que el paciente no presenta ese taxón (n=1 en grafico de barras superior) o colección de taxones exclusivos (n>1), mientras que los puntos negros indican que el paciente los presenta. La barra intersección indica varios pacientes en los que se ha detectado un taxón de taxones exclusivos.

A continuación, se realizó un análisis por LEfSe para discriminar los microorganismos predominantes en los pacientes con BCD y no-BCD. De este modo, se encontró que *Phascolarctobacterium* estaba enriquecido en pacientes con BCD, mientras que *Dialister* fue más predominante en pacientes no-BCD (Figura 30).





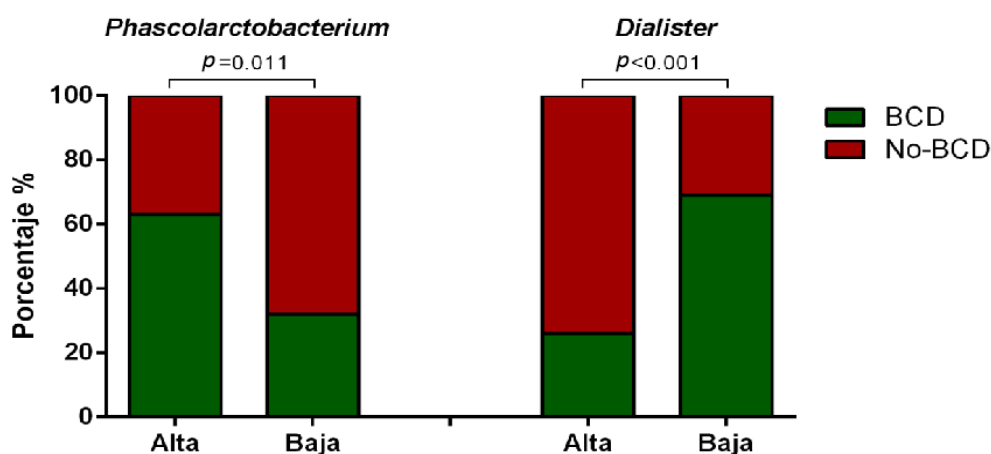
**Figura 30. Análisis de LefSe basado en la composición microbiana intestinal según la respuesta a ICIs.**

(A). Histograma del análisis LefSe. (B). Cladograma taxonómico del análisis LefSe. (C). Análisis de abundancia diferencial utilizando el análisis LefSe para *Phascolarctobacterium* en pacientes con no-BCD y BCD; las líneas rectas continuas representan las medias de abundancia relativa; las líneas rectas punteadas representan las medianas de abundancia relativa. (D). Análisis de abundancia diferencial utilizando el análisis LefSe para *Dialister* en pacientes con no-BCD y BCD; las líneas rectas continuas representan las medias de abundancia relativa; las líneas rectas punteadas representan las medianas de abundancia relativa. Todos los microorganismos presentes en la figura tienen un  $p$  valor menor a 0,05 mediante la prueba de Kruskal-Wallis, y puntuación de LDA mayores a 3. BCD (color verde): beneficio clínico duradero; no-BCD (color rojo): no beneficio clínico duradero. LefSe: tamaño del efecto de análisis discriminante lineal; LDA: análisis discriminante lineal.

Por otro lado, como *Phascolarctobacterium* y *Dialister* fueron los microorganismos más relacionados con la respuesta y, además, estaban presentes en más del 50% del total de pacientes, a continuación, se analizó el resultado clínico al tratamiento con ICIs en función de la abundancia de estos microorganismos. En este sentido, los pacientes con “alta” abundancia fueron los pacientes con una abundancia relativa igual o mayor a la mediana (1,920% para *Phascolarctobacterium* y 0,009% para *Dialister*), mientras, que el resto fueron

clasificados como “baja” abundancia.

Los pacientes con la alta abundancia de *Phascolarctobacterium* presentaron una tasa de BCD más alta en comparación con el resto de pacientes (63% vs. 32%,  $p=0,011$ ; **Figura 31**), contrariamente, los pacientes con alta abundancia de *Dialister* presentaron una tasa de BCD significativamente más baja en comparación con el grupo de baja abundancia (26% vs. 69%,  $p<0,001$ ; **Figura 31**).

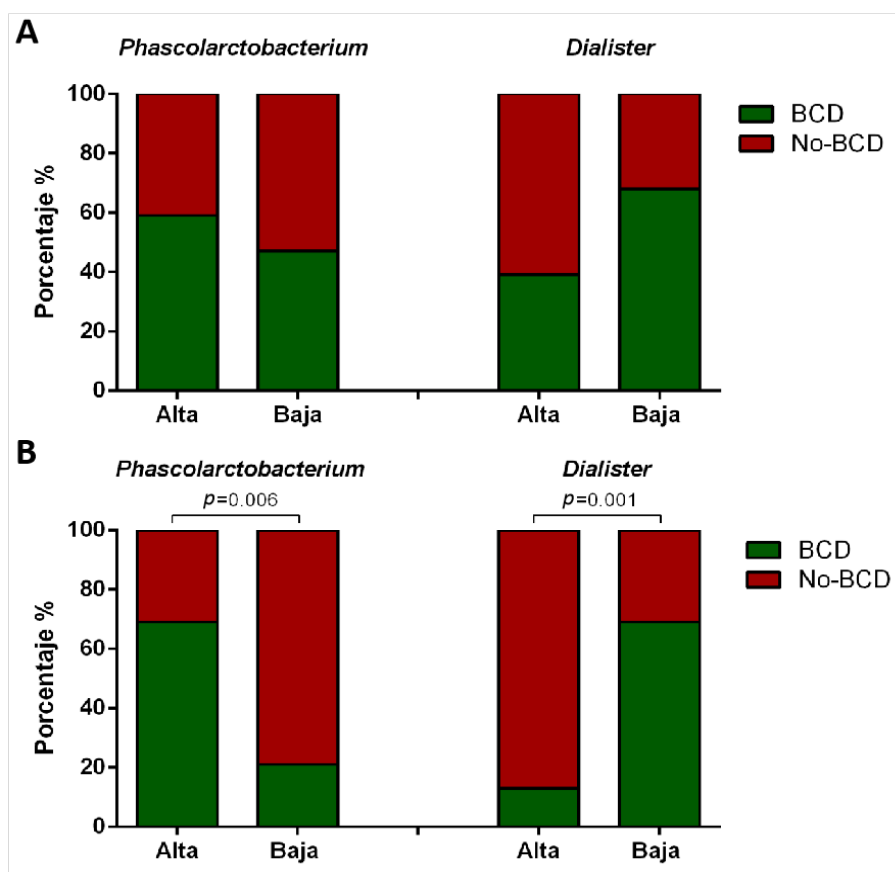


**Figura 31. Relación entre la abundancia relativa de *Phascolarctobacterium* y *Dialister* con la respuesta a ICIs.**

Los valores de corte utilizados para la estratificación de los pacientes en alta y baja abundancia corresponden a las medianas de la abundancia relativa: 1,920% (*Phascolarctobacterium*) y 0,009% (*Dialister*). BCD: beneficio clínico duradero.  $P$  valores se obtuvieron usando el test chi-cuadrado.

Nuestros resultados demuestran el valor predictivo en beneficio clínico al tratamiento con ICIs de *Phascolarctobacterium* y *Dialister* en la cohorte global de pacientes. A continuación, validamos el valor predictivo de estos microorganismos según la línea de tratamiento con ICIs (usando el mismo valor de corte previamente establecido). En el subgrupo de los pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea, no se vieron resultados estadísticamente significativos (**Figura 32A**), mientras que en el subgrupo de los pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea, los pacientes con alta abundancia de *Phascolarctobacterium* presentaron alta tasa de respuesta en comparación con pacientes con baja abundancia (69% vs. 21%,  $p=0,006$ ; **Figura 32B**). Por otra parte, los pacientes con alta abundancia de *Dialister* presentaron, como esperábamos, baja tasa de respuesta con  $p$  valor significativo (13% vs. 69%,  $p=0,001$ ; **Figura 32B**).





**Figura 32.** Relación entre la abundancia relativa de *Phascolarctobacterium* y *Dialister* con la respuesta, según la línea de tratamiento con ICIs.

(A). Subgrupo de pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea. (B). Subgrupo de pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea. Los valores de corte utilizados para la estratificación de los pacientes en alta y baja abundancia corresponden a las medianas de la abundancia relativa: 1,920% (*Phascolarctobacterium*), 0,009% (*Dialister*). BCD: beneficio clínico duradero. *P* valores se obtuvieron usando el test chi-cuadrado.

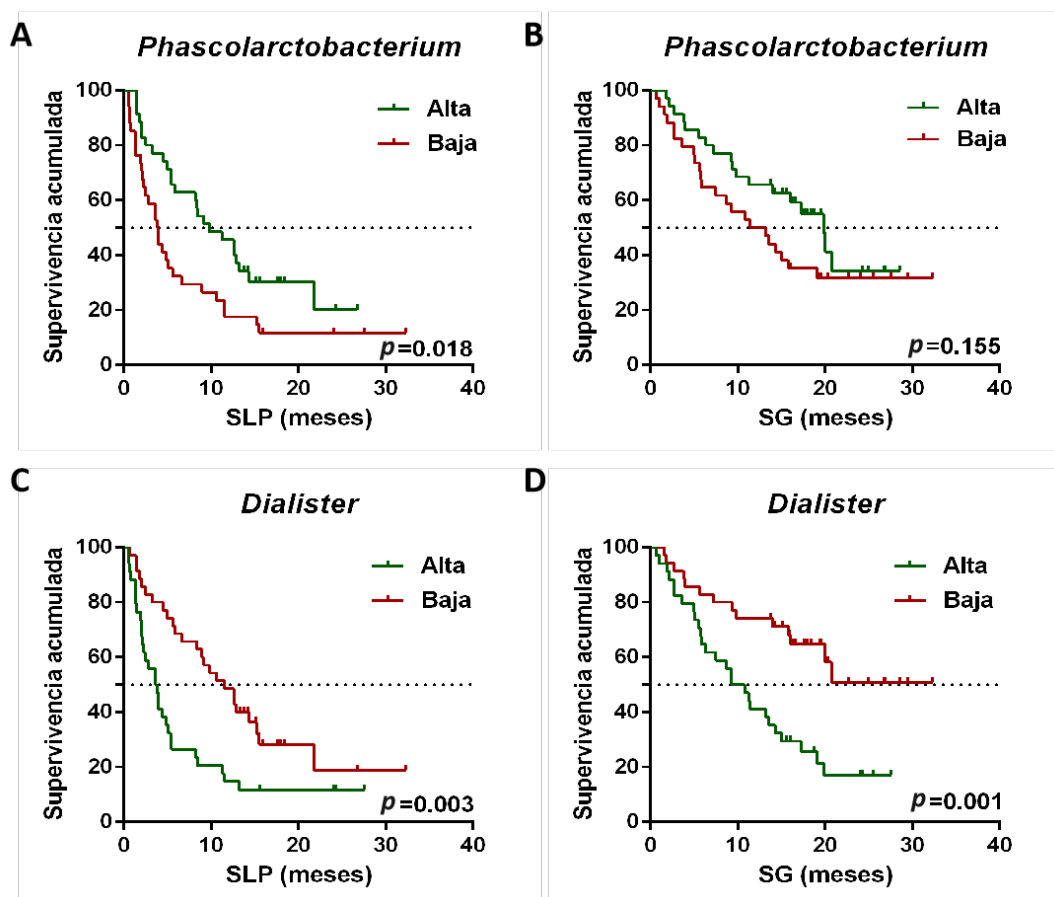
Seguidamente, se estudió el valor pronóstico de determinados microorganismos. Para ello, los pacientes se dicotomizaron según la abundancia relativa de la composición microbiana intestinal, y a continuación, se evaluó el pronóstico mediante el método de regresión de Cox univariante para la SLP y la SG. Los resultados de Cox univariante de SLP y SG se muestran en la **Tabla 22**.

**Tabla 22. Resultados del análisis de regresión de Cox basado en abundancia relativa de *Phascolarctobacterium* y *Dialister*.**

Microbiota	SLP			SG		
	HR	IC 95%	P valor	HR	IC 95%	P valor
<b><i>Phascolarctobacterium</i></b>						
Alta vs. Baja	0,531	0,311-0,907	<b>0,021*</b>	0,642	0,346-1,190	0,159
<b><i>Dialister</i></b>						
Alta vs. Baja	2,208	1,286-3,791	<b>0,004*</b>	2,847	1,485-5,459	<b>0,002*</b>

El valor de corte corresponde a la mediana de la abundancia relativa: 1,920% (*Phascolarctobacterium*), 0,009% (*Dialister*). HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confianza. Los *p* valores se obtuvieron usando el método de regresión de Cox univariante. \**p* <0,05.

Los resultados del análisis de regresión de Cox univariante revelaron que la abundancia de *Phascolarctobacterium* y *Dialister* presentaban una relación significativa con la supervivencia. Además, el análisis de supervivencia por Kaplan-Meier mostró que los pacientes con alta abundancia de *Phascolarctobacterium* tenían una SLP estadísticamente superior (SLP mediana: 9,8 vs. 3,8 meses, *p*= 0,018; **Figura 33A**), y tendencia a una mayor SG en comparación con los pacientes con baja abundancia (SG mediana: 19,9 vs. 11,4 meses, *p*= 0,155; **Figura 33B**). Por el contrario, el análisis de supervivencia para *Dialister* mostró un efecto opuesto al descrito para *Phascolarctobacterium*, los pacientes con alta abundancia presentaron menor SLP (SLP mediana: 3,6 vs. 11,5 meses, *p*= 0,003; **Figura 33C**) y SG (SG mediana: 9,3 vs. no alcanzado meses, *p*= 0,001; **Figura 33D**) en comparación con los pacientes con baja abundancia.



**Figura 33. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier para SLP y SG de acuerdo a la abundancia relativa de *Phascolarctobacterium* y *Dialister*.**

(A) SLP y (B) SG de acuerdo a la abundancia de *Phascolarctobacterium*. (C) SLP y (D) SG de acuerdo a la abundancia de *Dialister*. Las líneas verdes representan los pacientes con alta abundancia de *Phascolarctobacterium* o *Dialister*, mientras que la líneas rojas representa los pacientes con baja abundancia para estas bacterias. Los valores de corte corresponden a las medianas de la abundancia relativa: 1,920% (*Phascolarctobacterium*), 0,009% (*Dialister*). *P* valores se obtuvieron usando el test de log-rango.

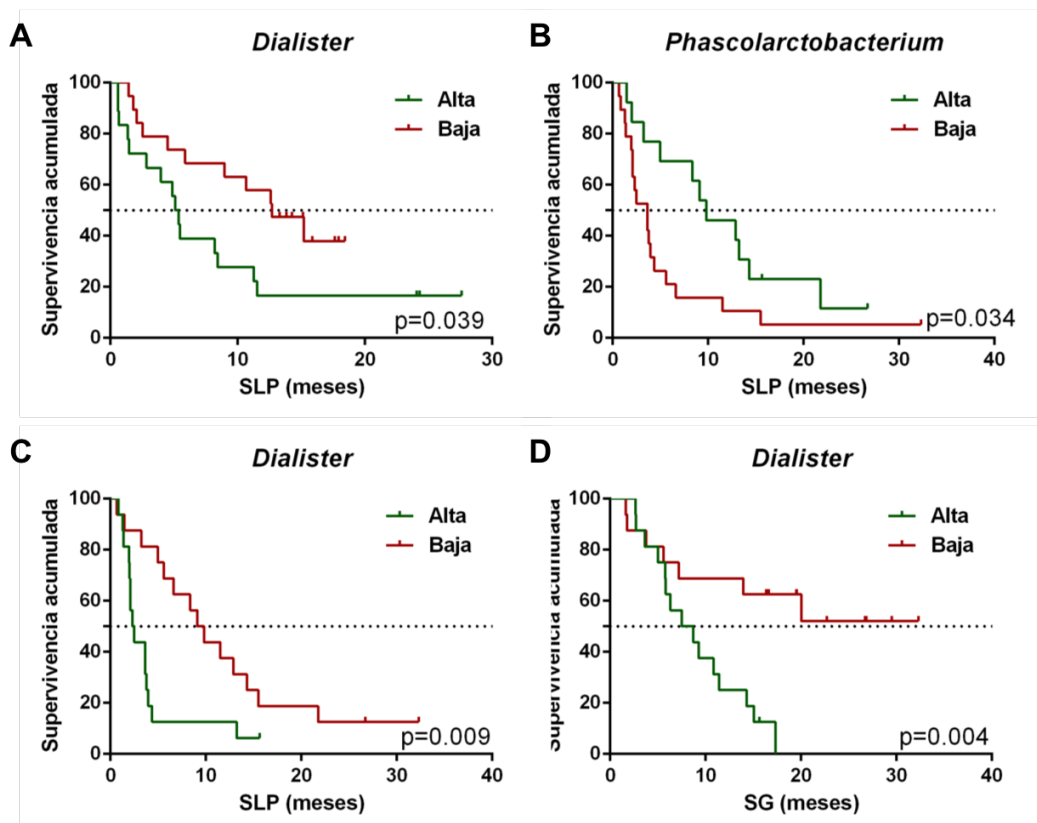
Posteriormente, se procedió a evaluar el valor pronóstico de estos dos microorganismos estratificando los pacientes según la línea de tratamiento con ICIs. Los resultados mostraron que la alta abundancia de *Dialister* correlacionaba significativamente con la SLP en los pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea. En cuanto a los pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea, la abundancia de *Phascolarctobacterium* mostró una relación significativa con mejor SLP, mientras que la abundancia de *Dialister* se correspondía con supervivencias (SLP y SG) más cortas (Tabla 23).

**Tabla 23. Resultados del análisis de regresión de Cox basado en la abundancia relativa de *Phascolarctobacterium* y *Dialister* según la línea de tratamiento con ICIs.**

Microbiota	SLP			SG		
	HR	IC 95%	P valor	HR	IC 95%	P valor
<b>Pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea</b>						
<b><i>Phascolarctobacterium</i></b>						
Alta vs. Baja	0,644	0,297-1,397	0,266	0,942	0,378-2,351	0,898
<b><i>Dialister</i></b>						
Alta vs. Baja	2,251	1,022-4,958	<b>0,044*</b>	2,121	0,831-5,413	0,116
<b>Pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea</b>						
<b><i>Phascolarctobacterium</i></b>						
Alta vs. Baja	0,444	0,206-0,960	<b>0,039*</b>	0,492	0,199-1,215	0,124
<b><i>Dialister</i></b>						
Alta vs. Baja	2,717	1,248-5,915	<b>0,012*</b>	3,835	1,438-10,224	<b>0,007*</b>

HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confianza. El valor de corte es la mediana de la abundancia relativa: 1,920% (*Phascolarctobacterium*), 0,009% (*Dialister*). Los *p* valores se obtuvieron usando el método de regresión de Cox univariante. \**p* < 0,05.

A continuación, se realizó un análisis mediante el método de Kaplan-Meier (estadístico log-rango) para obtener las curvas de supervivencia. En la cohorte de los pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea, los pacientes con alta abundancia de *Dialister* presentaron una SLP más de dos veces menor en comparación con el resto de pacientes (SLP mediana: 5,1 vs. 12,7 meses, *p*= 0,039; **Figura 34A**). Por otra parte, en la cohorte de los pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea, los pacientes con alta abundancia de *Phascolarctobacterium* presentaron una SLP más prolongada en comparación con el subgrupo de baja abundancia (SLP mediana: 9,8 vs. 3,6 meses, *p*= 0,034; **Figura 34B**). Respecto a *Dialister*, los pacientes con alta abundancia exhibieron, como cabía esperar, una SLP y una SG reducidas, en comparación con el grupo de pacientes con baja abundancia (SLP mediana: 2,3 vs. 9,1 meses, *p*= 0,009; **Figura 34C**; SG mediana: 7,5 vs. no alcanzado meses, *p*= 0,004; **Figura 34D**).



**Figura 34. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier para SLP y SG de acuerdo a la abundancia relativa de *Phascolarctobacterium* y *Dialister* según la línea de tratamiento con ICIs.**

(A). *Dialister* y SLP para los pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea. (B). *Phascolarctobacterium* y SLP para los pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea. (C). *Dialister* y SLP para los pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea. (D). *Dialister* y SG para los pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea. Las líneas verdes representan los pacientes con alta abundancia de *Phascolarctobacterium* o *Dialister*, mientras que las líneas rojas representan los pacientes con baja abundancia para estas bacterias. El valor de corte es la mediana de la abundancia relativa: 1,920% (*Phascolarctobacterium*), 0,009% (*Dialister*). *P* valores se obtuvieron usando el test de log-rango.

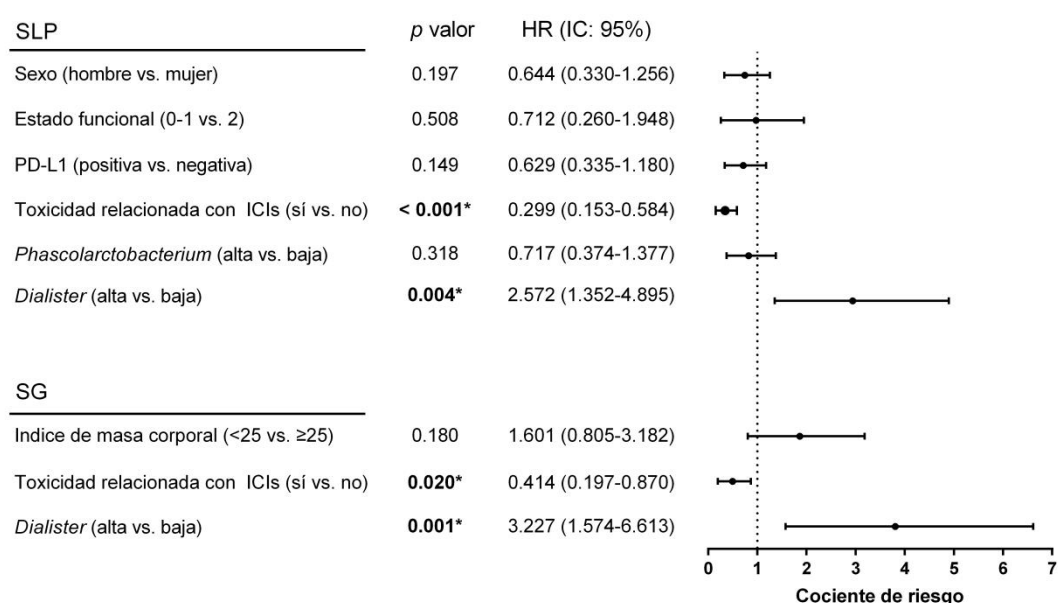
### 3.3.3. Análisis multivariante

Para comprobar si realmente el valor pronóstico de la microbiota intestinal analizada en este estudio tenía valor pronóstico independiente, se realizó un análisis multivariante incluyendo todas las variables clínicas que habían sido relacionadas significativamente con el pronóstico ( $p < 0,05$ ). El análisis multivariante se realizó según el método de regresión de Cox, con el fin de revelar cuáles de las variables analizadas eran de pronóstico independiente para nuestra cohorte de pacientes con CPNM.

En el modelo multivariante para la SLP se incluyeron las variables: sexo, estado funcional,

expresión de PD-L1, la presencia de toxicidad, la abundancia de *Phascolarctobacterium* y *Dialister*, todas ellas fueron significativas para el análisis univariante previo, de igual forma, en el modelo multivariante para la SG se incluyeron las variables: índice de masa corporal, la presencia de toxicidad y la abundancia de *Dialister* (Tabla 13, Tabla 18 y Tabla 22).

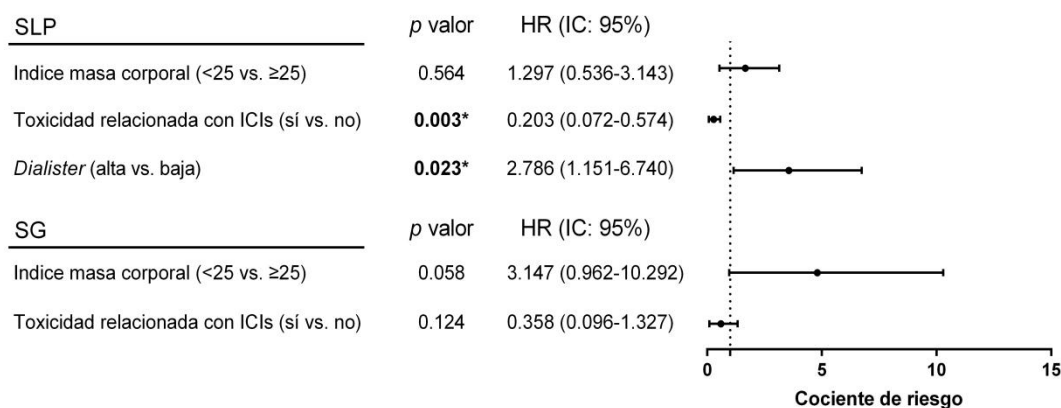
De acuerdo con el análisis de regresión de Cox, la presencia de toxicidad y la abundancia de *Dialister* fueron las variables con valor pronóstico independiente tanto para la SLP como para la SG (Figura 35).



**Figura 35. Resultado del modelo de regresión de Cox multivariante que incluye todas las variables significativas.**

HR: hazard ratio; IC: intervalo de confianza; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global. Los p valores se obtuvieron usando el método de regresión de Cox multivariante. \*p < 0,05.

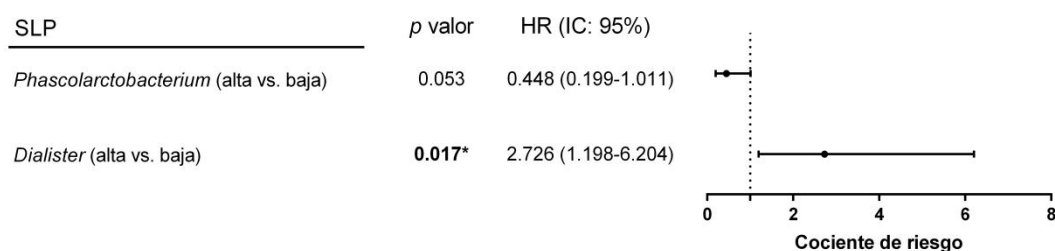
A continuación, se analizó la prueba de regresión de Cox multivariante para revelar el factor de pronóstico independiente para los pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea. En este sentido, se incluyeron las variables: el índice de masa corporal, la presencia de toxicidad y la abundancia de *Dialister* para la SLP, mientras, que el índice de masa corporal y la presencia de toxicidad se incluyeron para la SG (Tabla S3, Tabla 18 y Tabla 23). Al igual que en la cohorte global, la presencia de toxicidad y la abundancia de *Dialister* fueron las variables con valor pronóstico independiente para SLP en esta cohorte de pacientes (Figura 36).



**Figura 36. Resultado del modelo de regresión de Cox multivariante para los pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea.**

HR: hazard ratio; IC: intervalo de confianza; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global. Los *p* valores se obtuvieron usando el método de regresión de Cox multivariante. \**p* <0,05.

En cuanto a los pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea, al no identificar variables demográficas o clínico-patológicas relacionadas con supervivencia (**Tabla S3**), sólo se analizó la prueba de regresión de Cox multivariante con la abundancia de *Phascolarctobacterium* y *Dialister* (**Tabla 23**). Los resultados muestran que la abundancia de *Dialister* tiene valor pronóstico negativo independiente para la SLP en este grupo de pacientes con un HR de 2,726 (**Figura 37**).



**Figura 37. Resultado del modelo de regresión de Cox multivariante para los pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea.**

HR: hazard ratio; IC: intervalo de confianza; SLP: supervivencia libre de progresión; SG: supervivencia global. Los *p* valores se obtuvieron usando el método de regresión de Cox multivariante. \**p* <0,05.

A modo de resumen, en cuanto a la composición microbiana intestinal, los resultados indican que *Phascolarctobacterium* y *Dialister* son microorganismos intestinales con valor predictivo y/o pronóstico para los pacientes con CPNM en estadios avanzados.

Los diferentes estudios publicados han demostrado que diferentes componentes de la

microbiota intestinal podrían modular la respuesta a la inmunoterapia [164,166,228]. Así por ejemplo, en un modelo murino, la administración oral de *Bifidobacterium* ha mostrado capacidad de mejorar el control tumoral en el mismo grado que anti-PD-L1; mientras que la combinación de *Bifidobacterium* oral y anti-PD-L1 inhibe completamente el crecimiento tumoral. En este sentido, *Bifidobacterium* podría mejorar la función de las células dendríticas, activar las células T CD8+, promover la acumulación de CD8+ T en el tumor y mejorar la respuesta inmune antitumoral [169]. Por otro lado, Zitvogel y colaboradores han revelado que el TMF de pacientes con CPNM respondedores a ICIs en ratones libres de gérmenes mejora los efectos antitumorales del bloqueo de PD-1, mientras que el TMF de pacientes no respondedores no se logra el mismo efecto; sin embargo, la suplementación oral con *Akkermansia muciniphila* tras TMF procedente de paciente no respondedor restablece la eficacia del bloqueo de PD-1 de una manera dependiente de IL-12 al aumentar el reclutamiento de linfocitos T CCR9+ CXCR3+ CD4+ [163]. El grupo americano de Wargo ha revelado que la alta abundancia de *Faecalibacterium* presenta relación con una mayor efectividad de la inmunoterapia en pacientes con melanoma mediante la regulación de las células T [166]. Un estudio chino ha reportado que *Alistipes putredinis* es uno de los microorganismos más frecuentes en pacientes de CPNM con respuestas favorables a ICIs, mientras *Ruminococcus unclassified* es más detectable en pacientes con respuestas no favorables [123]. Otras bacterias intestinales, como *Ruminococcaceae UCG 13* y *Agathobacter*, han mostrado relación con el pronóstico en pacientes con CPNM tratados con ICIs en población japonesa [228].

En nuestro estudio, se ha detectado que *Phascolarctobacterium* es uno de los microorganismos más dominantes en pacientes con BCD, y la alta abundancia relativa de *Phascolarctobacterium* se asocia con SLP y SG más prolongadas. Por el contrario, *Dialister* es más frecuente en pacientes no-BCD, y la alta abundancia relativa de *Dialister* se asocia con SLP y SG reducidas.

*Phascolarctobacterium* es un género de la familia *Acidaminococcaceae*, y se ha demostrado una abundancia relativa de bacterias de esta familia más alta en personas sanas en comparación con pacientes con cáncer colorrectal [229]. Asimismo,



*Phascolarctobacterium* fue una de las bacterias dominantes de 131 géneros detectados en un estudio que incluía individuos sanos en comparación con pacientes con cáncer de pulmón [230]. Además, datos previos demuestran que *Phascolarctobacterium* es una de las bacterias enriquecidas en pacientes con melanoma con mejor respuesta a ICIs [166]. En Japón, el grupo de Tanoue aisló una mezcla de 11 cepas de bacterias de la microbiota intestinal humana sana capaz de inducir células T IFN- $\gamma$  + CD8+ y de mejorar la eficacia de ICIs en ratones portadores de tumores, y entre las cepas bacterianas incluidas se encontró una especie de *Phascolarctobacterium* [170]. Adicionalmente, *Phascolarctobacterium* se ha descrito como un buen productor de AGCCs especialmente de ácido acético y ácido propiónico [231,232]. Estos ácidos han demostrado ser “claves” para modular las respuestas inmunitarias al regular la concentración de LPS [233,234]. Además, la mayor concentración de AGCCs fecales, como el ácido propiónico, se asocia con mejor eficacia del tratamiento con ICIs en tumores sólidos [235], y predice el beneficio terapéutico en pacientes con CPNM [236]. Por lo tanto, en nuestro estudio *Phascolarctobacterium* podría modular los resultados clínicos del tratamiento con ICIs mediante la regulación de los niveles de AGCCs o modulando la respuesta inmune antitumoral.

*Dialister* es un género dentro de la familia *Veillonellaceae*, y en relación con el cáncer de pulmón, se ha descrito que existe un enriquecimiento de esta familia de bacterias en tejido tumoral en comparación con tejido normal adyacente en este tipo de tumores [237]. Estudios previos han demostrado que *Dialister* presenta relación con periodontitis, enfermedad de Crohn y depresión [238–241]. Aún más, se ha confirmado que *Dialister* se correlaciona con carcinogénesis gástrica [240]. Un estudio que compara la composición microbiana entre 30 pacientes con cáncer de pulmón y 16 controles sanos ha revelado que *Dialister* se encuentra entre los géneros más frecuentes en pacientes con cáncer de pulmón [230]. Apoyando nuestros resultados, Vernocchi et al. han observado que entre los 11 pacientes con CPNM tratados con nivolumab, los 7 respondedores presentan menor abundancia de *Dialister* en comparación con el resto de los pacientes [242]. Los resultados sobre la capacidad metabólica de *Dialister* han mostrado que, además de producir ácido propiónico, también puede producir ácido pentanoico (también conocido como ácido

valérico) [243]. Se ha demostrado que el ácido pentanoico podría tener un efecto inmunomodulador marcado, induciendo la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10 y suprimiendo las células Th17, por lo tanto, muestra potencial inmunosupresor [244]. Aunque el mecanismo específico a través del cual *Dialister* influye en la eficacia de ICIs justifica una mayor investigación, su efecto antiinflamatorio podría ser una posible explicación. En base a los estudios previos y a los resultados presentados en este trabajo, el análisis de la abundancia de *Dialister* muestras fecales podría ser utilizado como biomarcador potencial para predecir la respuesta al tratamiento con ICIs y la supervivencia en pacientes con CPNM en estadios avanzados.

## 4. Integración de los resultados

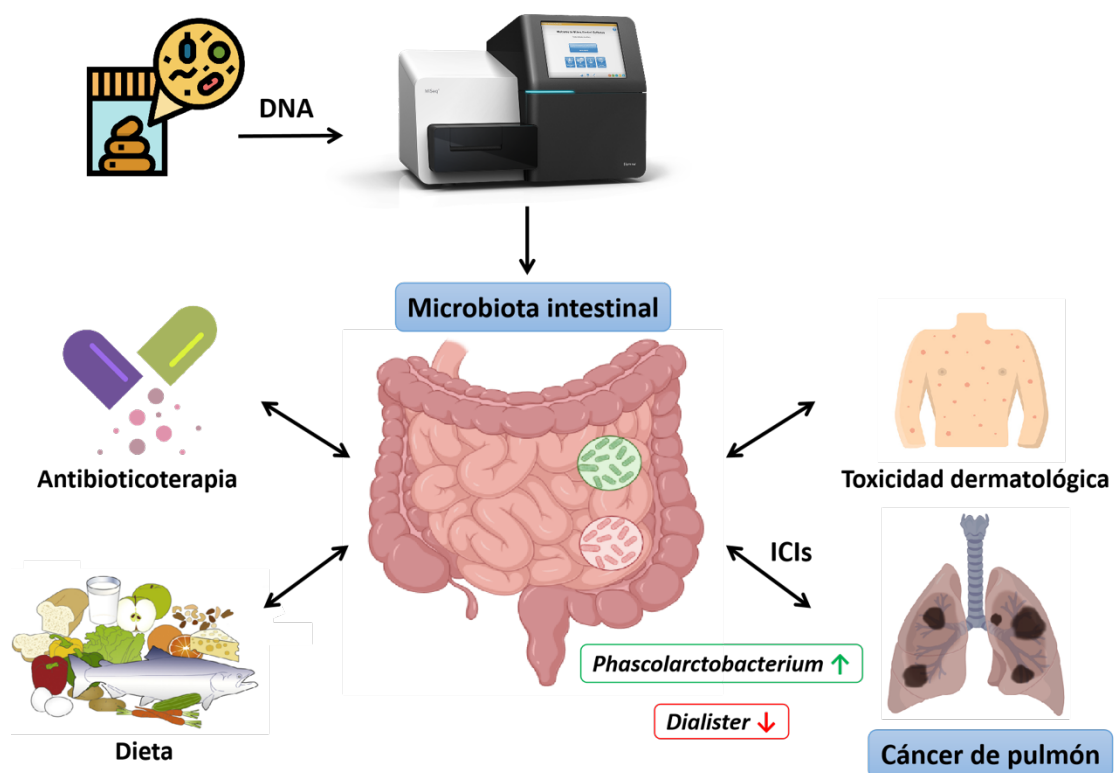
En este trabajo de tesis doctoral, se abordó un análisis exhaustivo de la composición y diversidad de la microbiota intestinal en pacientes con CPNM en estadios avanzados tratados con ICIs (nivolumab, pembrolizumab o atezolizumab), con el fin de lograr una mayor comprensión del papel de la microbiota intestinal como biomarcador en inmunoterapia (**Figura 38**).

El análisis de correlación de la diversidad microbiana intestinal con las características clínico-patológicas revela que el uso de antibióticos previos en un período de 0 a 3 meses antes de ICIs, la dieta y el desarrollo de toxicidad dermatológica inmunorelacionada están asociados con la diversidad microbiana.

Por otra parte, el estudio entre la composición microbiana y el efecto terapéutico de ICIs demuestra que *Phascolarctobacterium* y *Dialister* representan potenciales biomarcadores predictivos y pronósticos. Particularmente, la mayor abundancia relativa de *Phascolarctobacterium* correlaciona con el beneficio clínico y una mayor SLP, mientras que la alta frecuencia de *Dialister* es asociada con una respuesta desfavorable y con una SLP y SG reducidas. Sin embargo, serán necesarios más estudios y ensayos clínicos que evalúen la

aplicabilidad de estos microorganismos como potenciales biomarcadores, y planteen la necesidad de estudios futuros para determinar la relevancia biológica de *Phascolarctobacterium* y *Dialister* en la modulación de las respuestas a ICIs.

La novedad de nuestros resultados, que han sido publicados recientemente, ofrece nuevas posibilidades para la búsqueda de biomarcadores en la microbiota intestinal de pacientes con CPNM tratados con inmunoterapia.



**Figura 38.** Características de la microbiota intestinal en los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico tratados con los inhibidores de los puntos de control inmunitario (ICIs).



## **V. CONCLUSIONES**



1. La secuenciación por NGS sobre la región V3-V4 del gen 16S rRNA a partir de muestras de heces de pacientes con CPNM avanzado tratados con ICIs permite una buena identificación de la composición microbiana intestinal.
2. El análisis de correlación entre la microbiota intestinal y las características demográficas y clínico-patológicas revela que el uso de antibióticos previos se relaciona con menor riqueza microbiana intestinal, sin embargo no influye en la eficacia terapéutica de los ICIs. Además, los antibióticos, ciertos hábitos alimentarios, concretamente, un mayor consumo de carne procesada, moluscos y crustáceos y berenjena también se correlaciona con una menor diversidad de la microbiota intestinal en nuestra cohorte de pacientes.
3. El análisis de correlación entre la microbiota intestinal y la respuesta al tratamiento y efectos adversos inmunorelacionados con ICIs revela que una alta abundancia relativa del género *Phascolarctobacterium*, así como una baja abundancia del género *Dialister* se relacionan con una mejor respuesta, mientras que la aparición de toxicidad dermatológica se relaciona con una menor riqueza y diversidad microbiana intestinal y, a su vez, la presencia de toxicidades relacionadas con ICIs correlacionan con el mejor resultado clínico.
4. El análisis del valor pronóstico sobre la microbiota intestinal demuestra que la alta abundancia del género *Phascolarctobacterium* y la baja abundancia del género *Dialister* se relacionan con una mejor supervivencia de los pacientes incluidos en el estudio. El análisis multivariante revela que la presencia de la toxicidad relacionada con ICIs y la abundancia de *Dialister* son factores pronósticos independientes para el tratamiento con ICIs en pacientes con CPNM avanzado.
5. La visión integral de los resultados obtenidos permite posicionar al análisis de la microbiota intestinal como un posible nuevo biomarcador con valor predictivo y pronóstico en pacientes con CPNM avanzado tratados con ICIs.





## **VI. BIBLIOGRAFÍA**



1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* 2021, *71*, 209–249, doi:10.3322/CAAC.21660.
2. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000, *100*, 57–70, doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
3. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011, *144*, 646–674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
4. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA. Cancer J. Clin.* 2021, *71*, 7–33, doi:10.3322/caac.21654.
5. de Groot, P.; Munden, R.F. Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Radiol. Clin. North Am.* 2012, *50*, 863–876.
6. Sasco, A.J.; Secretan, M.B.; Straif, K. Tobacco smoking and cancer: A brief review of recent epidemiological evidence. In Proceedings of the Lung Cancer; Lung Cancer, 2004; Vol. 45.
7. Khuder, S.A.; Mutgi, A.B. Effect of smoking cessation on major histologic types of lung cancer. *Chest* 2001, *120*, 1577–1583, doi:10.1378/chest.120.5.1577.
8. Greillier, L.; Cortot, A.B.; Viguier, J.; Brignoli-Guibaudet, L.; Lhomel, C.; Eisinger, F.; Morère, J.F.; Couraud, S. Perception of Lung Cancer Risk: Impact of Smoking Status and Nicotine Dependence. *Curr. Oncol. Rep.* 2018, *20*, doi:10.1007/s11912-017-0650-1.
9. Markowitz, S.B.; Levin, S.M.; Miller, A.; Morabia, A. Asbestos, asbestosis, smoking, and lung cancer: New findings from the north american insulator cohort. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013, *188*, 90–96, doi:10.1164/rccm.201302-0257OC.
10. Couraud, S.; Zalcman, G.; Milleron, B.; Morin, F.; Souquet, P.J. Lung cancer in never smokers - A review. *Eur. J. Cancer* 2012, *48*, 1299–1311, doi:10.1016/j.ejca.2012.03.007.
11. Sawyers, C.L.; Abate-Shen, C.; Anderson, K.C.; Barker, A.; Baselga, J.; Berger, N.A.; Foti, M.; Jemal, A.; Lawrence, T.S.; Li, C.I.; et al. AACR cancer progress report 2013. *Clin. Cancer Res.* 2013, *19*, doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2107.
12. Malhotra, J.; Malvezzi, M.; Negri, E.; La Vecchia, C.; Boffetta, P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur. Respir. J.* 2016, *48*, 889–902, doi:10.1183/13993003.00359-2016.
13. Knight, S.B.; Crosbie, P.A.; Balata, H.; Chudziak, J.; Hussell, T.; Dive, C. Progress and prospects of early detection in lung cancer. *Open Biol.* 2017, *7*, doi:10.1098/rsob.170070.
14. Xing, P.Y.; Zhu, Y.X.; Wang, L.; Hui, Z.G.; Liu, S.M.; Ren, J.S.; Zhang, Y.; Song, Y.; Liu,

- C.C.; Huang, Y.C.; et al. What are the clinical symptoms and physical signs for non-small cell lung cancer before diagnosis is made? A nation-wide multicenter 10-year retrospective study in China. *Cancer Med.* 2019, 8, 4055–4069, doi:10.1002/cam4.2256.
15. Rorke, L.B. Pathologic diagnosis as the gold standard. *Cancer* 1997, 79, 665–667, doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19970215)79:4<665::AID-CNCR1>3.0.CO;2-D.
  16. Gregg, J.P.; Li, T.; Yoneda, K.Y. Molecular testing strategies in non-small cell lung cancer: Optimizing the diagnostic journey. *Transl. Lung Cancer Res.* 2019, 8, 286–301, doi: 10.21037/tlcr.2019.04.14.
  17. Detterbeck, F.C.; Boffa, D.J.; Kim, A.W.; Tanoue, L.T. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest* 2017, 151, 193–203, doi:10.1016/j.chest.2016.10.010.
  18. Chan, B.A.; Hughes, B.G.M. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Transl. lung cancer Res.* 2015, 4, 36–54, doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2014.05.01.
  19. Li, T.; Kung, H.-J.; Mack, P.C.; Gandara, D.R. Genotyping and genomic profiling of non-small-cell lung cancer: implications for current and future therapies. *J. Clin. Oncol.* 2013, 31, 1039–49, doi:10.1200/JCO.2012.45.3753.
  20. Majem, M.; Juan, O.; Insa, A.; Reguart, N.; Trigo, J.; Carcereny, E.; García-Campelo, R.; García, Y.; Guirado, M.; Provencio, M. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clin. Transl. Oncol.* 2019, 21, 3–17, doi:10.1007/S12094-018-1978-1.
  21. Hu, Q.; Sun, W.; Wang, C.; Gu, Z. Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016, 98, 19–34, doi: 10.1016/j.addr.2015.10.022.
  22. Bergh, J.; Bondarenko, I.M.; Lichinitser, M.R.; Liljegren, A.; Greil, R.; Voytko, N.L.; Makhson, A.N.; Cortes, J.; Lortholary, A.; Bischoff, J.; et al. First-line treatment of advanced breast cancer with sunitinib in combination with docetaxel versus docetaxel alone: Results of a prospective, randomized phase III study. *J. Clin. Oncol.* 2012, 30, 921–929, doi:10.1200/JCO.2011.35.7376.
  23. Brahmer, J.R.; Pardoll, D.M. Immune checkpoint inhibitors: making immunotherapy a reality for the treatment of lung cancer. *Cancer Immunol. Res.* 2013, 1, 85–91, doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0078.
  24. Buchbinder, E.; Hodi, F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 and immune checkpoint blockade. *J. Clin. Invest.* 2015, 125, 3377–3383, doi:10.1172/JCI80012.
  25. Chen, L. Co-inhibitory molecules of the B7–CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2004, 4, 336–347, doi:10.1038/nri1349.
  26. Wells, A.D.; Walsh, M.C.; Bluestone, J.A.; Turka, L.A. Signaling through CD28 and CTLA-4 controls two distinct forms of T cell anergy. *J. Clin. Invest.* 2001, 108, 895–903,

- doi:10.1172/JCI13220.
27. Leach, D.R.; Krummel, M.F.; Allison, J.P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science (80- )*. 1996, *271*, 1734–1736, doi:10.1126/science.271.5256.1734.
  28. Okazaki, T.; Honjo, T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int. Immunol.* 2007, *19*, 813–824, doi:10.1093/intimm/dxm057.
  29. Keir, M.E.; Butte, M.J.; Freeman, G.J.; Sharpe, A.H. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2008, *26*, 677–704, doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
  30. Velcheti, V.; Schalper, K.A.; Carvajal, D.E.; Anagnostou, V.K.; Syrigos, K.N.; Sznol, M.; Herbst, R.S.; Gettinger, S.N.; Chen, L.; Rimm, D.L. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab. Investig.* 2014, *94*, 107–116, doi:10.1038/labinvest.2013.130.
  31. Hino, R.; Kabashima, K.; Kato, Y.; Yagi, H.; Nakamura, M.; Honjo, T.; Okazaki, T.; Tokura, Y. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer* 2010, *116*, 1757–1766, doi:10.1002/cncr.24899.
  32. Sfanos, K.S.; Bruno, T.C.; Meeker, A.K.; De Marzo, A.M.; Isaacs, W.B.; Drake, C.G. Human prostate-infiltrating CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are oligoclonal and PD-1<sup>+</sup>. *Prostate* 2009, *69*, 1694–1703, doi:10.1002/pros.21020.
  33. Soliman, H.; Khalil, F.; Antonia, S. PD-L1 Expression Is Increased in a Subset of Basal Type Breast Cancer Cells. *PLoS One* 2014, *9*, e88557, doi:10.1371/journal.pone.0088557.
  34. Thompson, R.H.; Gillett, M.D.; Cheville, J.C.; Lohse, C.M.; Dong, H.; Webster, W.S.; Krejci, K.G.; Lobo, J.R.; Sengupta, S.; Chen, L.; et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004, *101*, 17174–17179, doi:10.1073/pnas.0406351101.
  35. Vaddepally, R.K.; Kharel, P.; Pandey, R.; Garje, R.; Chandra, A.B. Review of indications of FDA-approved immune checkpoint inhibitors per NCCN guidelines with the level of evidence. *Cancers (Basel)*. 2020, *12*, 1–19, doi:10.3390/cancers12030738.
  36. Haslam, A.; Prasad, V. Estimation of the Percentage of US Patients With Cancer Who Are Eligible for and Respond to Checkpoint Inhibitor Immunotherapy Drugs. *JAMA Netw. open* 2019, *2*, e192535, doi:10.1001/jamanetworkopen.2019.2535.
  37. Nishijima, T.F.; Shachar, S.S.; Nyrop, K.A.; Muss, H.B. Safety and Tolerability of PD-1/PD-L1 Inhibitors Compared with Chemotherapy in Patients with Advanced Cancer: A Meta-Analysis. *Oncologist* 2017, *22*, 470–479, doi:10.1634/theoncologist.2016-0419.
  38. Pillai, R.N.; Behera, M.; Owonikoko, T.K.; Kamphorst, A.O.; Pakkala, S.; Belani, C.P.;

- Khuri, F.R.; Ahmed, R.; Ramalingam, S.S. Comparison of the toxicity profile of PD-1 versus PD-L1 inhibitors in non-small cell lung cancer: A systematic analysis of the literature. *Cancer* 2018, *124*, 271–277, doi: 10.1002/cncr.31043.
39. Kumar, V.; Chaudhary, N.; Garg, M.; Floudas, C.S.; Soni, P.; Chandra, A.B. Current diagnosis and management of immune related adverse events (irAEs) induced by immune checkpoint inhibitor therapy. *Front. Pharmacol.* 2017, *8*, doi: 10.3389/fphar.2017.00049.
40. Rizvi, N.A.; Mazières, J.; Planchard, D.; Stinchcombe, T.E.; Dy, G.K.; Antonia, S.J.; Horn, L.; Lena, H.; Minenza, E.; Mennecier, B.; et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): A phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol.* 2015, *16*, 257–265, doi:10.1016/S1470-2045(15)70054-9.
41. Gettinger, S.N.; Horn, L.; Gandhi, L.; Spigel, D.R.; Antonia, S.J.; Rizvi, N.A.; Powderly, J.D.; Heist, R.S.; Carvajal, R.D.; Jackman, D.M.; et al. Overall survival and long-term safety of nivolumab (anti-programmed death 1 antibody, BMS-936558, ONO-4538) in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2015, *33*, 2004–2012, doi:10.1200/JCO.2014.58.3708.
42. Shah, N.J.; Kelly, W.J.; Liu, S. V.; Choquette, K.; Spira, A. Product review on the Anti-PD-L1 antibody atezolizumab. *Hum. Vaccines Immunother.* 2018, *14*, 269–276, doi: 10.1080/21645515.2017.1403694
43. Garon, E.B.; Rizvi, N.A.; Hui, R.; Leighl, N.; Balmanoukian, A.S.; Eder, J.P.; Patnaik, A.; Aggarwal, C.; Gubens, M.; Horn, L.; et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2015, *372*, 2018–2028, doi:10.1056/NEJMoa1501824.
44. Antonia, S.J.; Villegas, A.; Daniel, D.; Vicente, D.; Murakami, S.; Hui, R.; Yokoi, T.; Chiappori, A.; Lee, K.H.; de Wit, M.; et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2017, *377*, 1919–1929, doi:10.1056/nejmoa1709937.
45. Mishra, A.; Verma, M. Cancer biomarkers: Are we ready for the prime time? *Cancers (Basel)*. 2010, *2*, 190–208, doi: 10.3390/cancers2010190.
46. Yang, G.; Xiao, Z.; Tang, C.; Deng, Y.; Huang, H.; He, Z. Recent advances in biosensor for detection of lung cancer biomarkers. *Biosens. Bioelectron.* 2019, *141*, doi.org/10.1016/j.bios.2019.111416
47. Pai-Scherf, L.; Blumenthal, G.M.; Li, H.; Subramaniam, S.; Mishra-Kalyani, P.S.; He, K.; Zhao, H.; Yu, J.; Paciga, M.; Goldberg, K.B.; et al. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer: First-Line Therapy and Beyond. *Oncologist* 2017, *22*, 1392–1399, doi:10.1634/theoncologist.2017-0078.
48. Keytruda | European Medicines Agency, SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS

- Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/keytruda> (accessed on Jul 13, 2021).
49. Sacher, A.G.; Gandhi, L. Biomarkers for the clinical use of PD-1/PD-L1 inhibitors in non-small-cell lung cancer: A review. *JAMA Oncol.* 2016, *2*, 1217–1222, doi: 10.1001/jamaoncol.2016.0639.
  50. Herbst, R.S.; Baas, P.; Kim, D.W.; Felip, E.; Pérez-Gracia, J.L.; Han, J.Y.; Molina, J.; Kim, J.H.; Arvis, C.D.; Ahn, M.J.; et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet* 2016, *387*, 1540–1550, doi:10.1016/S0140-6736(15)01281-7.
  51. Reck, M.; Rodríguez-Abreu, D.; Robinson, A.G.; Hui, R.; Csőszi, T.; Fülöp, A.; Gottfried, M.; Peled, N.; Tafreshi, A.; Cuffe, S.; et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2016, *375*, 1823–1833, doi:10.1056/NEJMoa1606774.
  52. Gibney, G.T.; Weiner, L.M.; Atkins, M.B. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* 2016, *17*, e542–e551, doi: 10.1016/S1470-2045(16)30406-5.
  53. Grigg, C.; Rizvi, N.A. PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: Truth or fiction? *J. Immunother. Cancer* 2016, *4*, 48, doi:10.1186/s40425-016-0153-x.
  54. Davis, A.A.; Patel, V.G. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: An analysis of all US food and drug administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors. *J. Immunother. Cancer* 2019, *7*, 278, doi:10.1186/s40425-019-0768-9.
  55. Marabelle, A.; Fakih, M.; Lopez, J.; Shah, M.; Shapira-Frommer, R.; Nakagawa, K.; Chung, H.C.; Kindler, H.L.; Lopez-Martin, J.A.; Miller, W.H.; et al. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *Lancet Oncol.* 2020, *21*, 1353–1365, doi:10.1016/S1470-2045(20)30445-9.
  56. Le, D.T.; Uram, J.N.; Wang, H.; Bartlett, B.R.; Kemberling, H.; Eyring, A.D.; Skora, A.D.; Lubner, B.S.; Azad, N.S.; Laheru, D.; et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2015, *372*, 2509–2520, doi:10.1056/NEJMoa1500596.
  57. Strickler, J.H.; Hanks, B.A.; Khasraw, M. Tumor mutational burden as a predictor of immunotherapy response: Is more always better? *Clin. Cancer Res.* 2021, *27*, 1236–1241, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3054.
  58. Sidaway, P. MSI-H: a truly agnostic biomarker? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2020, *17*, 68, doi: 10.1038/s41571-019-0310-5.
  59. Thursby, E.; Juge, N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* 2017, *474*,

- 1823–1836, doi: 10.1042/BCJ20160510
60. Ursell, L.K.; Metcalf, J.L.; Parfrey, L.W.; Knight, R. Defining the human microbiome. *Nutr. Rev.* 2012, *70*, S38, doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x.
  61. O'Hara, A.M.; Shanahan, F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006, *7*, 688–93, doi:10.1038/sj.embor.7400731.
  62. Scarpellini, E.; Campanale, M.; Leone, D.; Purchiaroni, F.; Vitale, G.; Lauritano, E.C.; Gasbarrini, A. Gut microbiota and obesity. *Intern. Emerg. Med.* 2010, *5*, 53–56, doi:10.1007/s11739-010-0450-1.
  63. Sender, R.; Fuchs, S.; Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol.* 2016, *14*, e1002533, doi:10.1371/journal.pbio.1002533.
  64. Schwabe, R.F.; Jobin, C. The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2013, *13*, 800–12, doi:10.1038/nrc3610.
  65. Li, Y.; Kundu, P.; Seow, S.W.; de Matos, C.T.; Aronsson, L.; Chin, K.C.; Kärre, K.; Pettersson, S.; Greicius, G. Gut microbiota accelerate tumor growth via c-jun and STAT3 phosphorylation in APC Min/+ mice. *Carcinogenesis* 2012, *33*, 1231–1238, doi:10.1093/carcin/bgs137.
  66. Lee, C.-W.; Rickman, B.; Rogers, A.B.; Ge, Z.; Wang, T.C.; Fox, J.G. Helicobacter pylori eradication prevents progression of gastric cancer in hypergastrinemic INS-GAS mice. *Cancer Res.* 2008, *68*, 3540–8, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6786.
  67. Jin, C.; Lagoudas, G.K.; Zhao, C.; Bullman, S.; Bhutkar, A.; Hu, B.; Ameh, S.; Sandel, D.; Liang, X.S.; Mazzilli, S.; et al. Commensal Microbiota Promote Lung Cancer Development via  $\gamma\delta$  T Cells. *Cell* 2019, *176*, 998-1013.e16, doi:10.1016/j.cell.2018.12.040.
  68. Marshall, B.J.; Windsor, H.M. The relation of Helicobacter pylori to gastric adenocarcinoma and lymphoma: pathophysiology, epidemiology, screening, clinical presentation, treatment, and prevention. *Med. Clin. North Am.* 2005, *89*, 313–344, doi:10.1016/j.mcna.2004.09.001.
  69. Moss, S.F. The Clinical Evidence Linking Helicobacter pylori to Gastric Cancer. *CMGH* 2017, *3*, 183–191, doi: 10.1016/j.jcmgh.2016.12.001.
  70. Di Domenico, E.G.; Cavallo, I.; Pontone, M.; Toma, L.; Ensoli, F. Biofilm producing Salmonella typhi: Chronic colonization and development of gallbladder cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, *18*, doi: 10.3390/ijms18091887.
  71. Arthur, J.C.; Perez-Chanona, E.; Muhlbauer, M.; Tomkovich, S.; Uronis, J.M.; Fan, T.-J.; Campbell, B.J.; Abujamel, T.; Dogan, B.; Rogers, A.B.; et al. Intestinal Inflammation Targets Cancer-Inducing Activity of the Microbiota. *Science (80-. )*. 2012, *338*, 120–123, doi:10.1126/science.1224820.
  72. Bullman, S.; Pédamallu, C.S.; Sicinska, E.; Clancy, T.E.; Zhang, X.; Cai, D.; Neubergh, D.;



- Huang, K.; Guevara, F.; Nelson, T.; et al. Analysis of *Fusobacterium* persistence and antibiotic response in colorectal cancer. *Science* (80-. ). 2017, eaa15240, doi:10.1126/science.aal5240.
73. How, K.Y.; Song, K.P.; Chan, K.G. Porphyromonas gingivalis: An overview of periodontopathic pathogen below the gum line. *Front. Microbiol.* 2016, 7, doi: 10.3389/fmicb.2016.00053.
74. Wong, S.H.; Yu, J. Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2019, 16, 690–704, doi: 10.1038/s41575-019-0209-8.
75. Wu, N.; Yang, X.; Zhang, R.; Li, J.; Xiao, X.; Hu, Y.; Chen, Y.; Yang, F.; Lu, N.; Wang, Z.; et al. Dysbiosis Signature of Fecal Microbiota in Colorectal Cancer Patients. *Microb. Ecol.* 2013, 66, 462–470, doi:10.1007/s00248-013-0245-9.
76. Kostic, A.D.; Gevers, D.; Pedamallu, C.S.; Michaud, M.; Duke, F.; Earl, A.M.; Ojesina, A.I.; Jung, J.; Bass, A.J.; Taberner, J.; et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma Aleksandar. *Genome Res.* 2012, 22, 292–298, doi:10.1101/gr.126573.111.
77. Flanagan, L.; Schmid, J.; Ebert, M.; Soucek, P.; Kunicka, T.; Liska, V.; Bruha, J.; Neary, P.; Dezeeuw, N.; Tommasino, M.; et al. *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014, 33, 1381–1390, doi:10.1007/s10096-014-2081-3.
78. Mima, K.; Nishihara, R.; Qian, Z.R.; Cao, Y.; Sukawa, Y.; Nowak, J.A.; Yang, J.; Dou, R.; Masugi, Y.; Song, M.; et al. *Fusobacterium nucleatum* in colorectal carcinoma tissue and patient prognosis. *Gut* 2016, 65, 1973–1980, doi:10.1136/gutjnl-2015-310101.
79. Serna, G.; Ruiz-Pace, F.; Hernando, J.; Alonso, L.; Fasani, R.; Landolfi, S.; Comas, R.; Jimenez, J.; Elez, E.; Bullman, S.; et al. *Fusobacterium nucleatum* persistence and risk of recurrence after preoperative treatment in locally advanced rectal cancer. *Ann. Oncol.* 2020, 31, 1366–1375, doi:10.1016/j.annonc.2020.06.003.
80. Durham, A.L.; Adcock, I.M. The relationship between COPD and lung cancer. *Lung Cancer* 2015, 90, 121–127, doi: 10.1016/j.lungcan.2015.08.017.
81. Yan, X.; Yang, M.; Liu, J.; Gao, R.; Hu, J.; Li, J.; Zhang, L.; Shi, Y.; Guo, H.; Cheng, J.; et al. Discovery and validation of potential bacterial biomarkers for lung cancer. *Am. J. Cancer Res.* 2015, 5, 3111–3122.
82. Cheng, M.; Qian, L.; Shen, G.; Bian, G.; Xu, T.; Xu, W.; Shen, G.; Hu, S. Microbiota modulate tumoral immune surveillance in lung through a  $\gamma\delta T17$  immune cell-dependent mechanism. *Cancer Res.* 2014, 74, 4030–4041, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2462.
83. Zhuang, H.; Cheng, L.; Wang, Y.; Zhang, Y.K.; Zhao, M.F.; Liang, G. Da; Zhang, M.C.; Li, Y.G.; Zhao, J.B.; Gao, Y.N.; et al. Dysbiosis of the gut microbiome in lung cancer. *Front.*

- Cell. Infect. Microbiol.* 2019, 9, doi:10.3389/fcimb.2019.00112.
84. Catanzaro, J.R.; Strauss, J.D.; Bielecka, A.; Porto, A.F.; Lobo, F.M.; Urban, A.; Schofield, W.B.; Palm, N.W. IgA-deficient humans exhibit gut microbiota dysbiosis despite secretion of compensatory IgM. *Sci. Rep.* 2019, 9, doi:10.1038/s41598-019-49923-2.
85. Sansonetti, P. Phagocytosis of bacterial pathogens: implications in the host response. *Semin. Immunol.* 2001, 13, 381–390, doi:10.1006/smim.2001.0335.
86. Macpherson, A.J.; Uhr, T. Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. *Science (80- )*. 2004, 303, 1662–1665, doi:10.1126/science.1091334.
87. Xiong, N.; Hu, S. Regulation of intestinal IgA responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015, 72, 2645–2655, doi:10.1007/s00018-015-1892-4.
88. Uribe-Herranz, M.; Rafail, S.; Beghi, S.; Gil-De-Gómez, L.; Verginadis, I.; Bittinger, K.; Pustynnikov, S.; Pierini, S.; Perales-Linares, R.; Blair, I.A.; et al. Gut microbiota modulate dendritic cell antigen presentation and radiotherapy-induced antitumor immune response. *J. Clin. Invest.* 2020, 130, 466–479, doi:10.1172/JCI124332.
89. Patsoukis, N.; Bardhan, K.; Weaver, J.; Herbel, C.; Seth, P.; Li, L.; Boussiotis, V.A. The role of metabolic reprogramming in T cell fate and function. *Curr. Trends Immunol.* 2016, 17, 1–12.
90. Barnes, M.J.; Powrie, F. Regulatory T Cells Reinforce Intestinal Homeostasis. *Immunity* 2009, 31, 401–411, doi:10.1016/j.immuni.2009.08.011.
91. Cremonesi, E.; Governa, V.; Garzon, J.F.G.; Mele, V.; Amicarella, F.; Muraro, M.G.; Trella, E.; Galati-Fournier, V.; Oertli, D.; Däster, S.R.; et al. Gut microbiota modulate T cell trafficking into human colorectal cancer. *Gut* 2018, 67, 1984–1994, doi:10.1136/gutjnl-2016-313498.
92. Lee, N.; Kim, W.-U. Microbiota in T-cell homeostasis and inflammatory diseases. *Exp. Mol. Med.* 2017, 49, e340, doi:10.1038/emm.2017.36.
93. Ivanov, I.I.; Frutos, R. de L.; Manel, N.; Yoshinaga, K.; Rifkin, D.B.; Sartor, R.B.; Finlay, B.B.; Littman, D.R. Specific Microbiota Direct the Differentiation of IL-17-Producing T-Helper Cells in the Mucosa of the Small Intestine. *Cell Host Microbe* 2008, 4, 337–349, doi:10.1016/j.chom.2008.09.009.
94. Narushima, S.; Sugiura, Y.; Oshima, K.; Atarashi, K.; Hattori, M.; Suematsu, M.; Honda, K. Characterization of the 17 strains of regulatory T cell-inducing human-derived Clostridia. *Gut Microbes* 2014, 5, 333–339, doi:10.4161/gmic.28572.
95. Geuking, M.B.; Cahenzli, J.; Lawson, M.A.E.; Ng, D.C.K.; Slack, E.; Hapfelmeier, S.; McCoy, K.D.; Macpherson, A.J. Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses. *Immunity* 2011, 34, 794–806, doi:10.1016/j.immuni.2011.03.021.
96. Tang, D.; Kang, R.; Coyne, C.B.; Zeh, H.J.; Lotze, M.T. PAMPs and DAMPs: signal Os

- that spur autophagy and immunity. *Immunol. Rev.* 2012, 249, 158–175, doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x.
97. Schaefer, A.K.; Melnyk, J.E.; He, Z.; Del Rosario, F.; Grimes, C.L. Pathogen- and Microbial- Associated Molecular Patterns (PAMPs/MAMPs) and the Innate Immune Response in Crohn's Disease. In *Immunity and Inflammation in Health and Disease*; Elsevier, 2018; pp. 175–187, doi.org/10.1016/B978-0-12-805417-8.00014-7
  98. Thaiss, C.A.; Levy, M.; Suez, J.; Elinav, E. The interplay between the innate immune system and the microbiota. *Curr. Opin. Immunol.* 2014, 26, 41–48, doi:10.1016/j.coi.2013.10.016.
  99. Saijo, Y.; Loo, E.P.; Yasuda, S. Pattern recognition receptors and signaling in plant-microbe interactions. *Plant J.* 2018, 93, 592–613, doi:10.1111/tpj.13808.
  100. Johnson, J.L.; Jones, M.B.; Cobb, B.A. Polysaccharide A from the Capsule of *Bacteroides fragilis* Induces Clonal CD4+ T Cell Expansion. *J. Biol. Chem.* 2015, 290, 5007–5014, doi:10.1074/jbc.M114.621771.
  101. Round, J.L.; Lee, S.M.; Li, J.; Tran, G.; Jabri, B.; Chatila, T.A.; Mazmanian, S.K. The toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science (80- )*. 2011, 332, 974–977, doi:10.1126/science.1206095.
  102. Vaure, C.; Liu, Y. A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front. Immunol.* 2014, 5.
  103. Carvalho, F.A.; Aitken, J.D.; Gewirtz, A.T.; Vijay-Kumar, M. TLR5 activation induces secretory interleukin-1 receptor antagonist (sIL-1Ra) and reduces inflammasome-associated tissue damage. *Mucosal Immunol.* 2011, 4, 102–111, doi:10.1038/mi.2010.57.
  104. Rehman, A.; Sina, C.; Gavrilova, O.; Hasler, R.; Ott, S.; Baines, J.F.; Schreiber, S.; Rosenstiel, P. Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities. *Gut* 2011, 60, 1354–1362, doi:10.1136/gut.2010.216259.
  105. Couturier-Maillard, A.; Secher, T.; Rehman, A.; Normand, S.; De Arcangelis, A.; Haesler, R.; Huot, L.; Grandjean, T.; Bressenot, A.; Delanoye-Crespin, A.; et al. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J. Clin. Invest.* 2013, 123, 700–11, doi:10.1172/JCI62236.
  106. Negroni, A.; Pierdomenico, M.; Cucchiara, S.; Stronati, L. NOD2 and inflammation: Current insights. *J. Inflamm. Res.* 2018, 11, 49–60, doi: 10.2147/JIR.S137606.
  107. Ferrand, A.; Al Nabhani, Z.; Tapias, N.S.; Mas, E.; Hugot, J.P.; Barreau, F. NOD2 Expression in Intestinal Epithelial Cells Protects Toward the Development of Inflammation and Associated Carcinogenesis. *CMGH* 2019, 7, 357–369, doi: 10.1016/j.jcmgh.2018.10.009.
  108. Caruso, R.; Warner, N.; Inohara, N.; Núñez, G. NOD1 and NOD2: Signaling, Host Defense, and Inflammatory Disease. *Immunity* 2014, 41, 898–908,

- doi:10.1016/j.immuni.2014.12.010.
109. Levy, M.; Thaiss, C.A.; Zeevi, D.; Dohnalová, L.; Zilberman-Schapira, G.; Mahdi, J.A.; David, E.; Savidor, A.; Korem, T.; Herzig, Y.; et al. Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. *Cell* 2015, *163*, 1428–1443, doi:10.1016/j.cell.2015.10.048.
  110. Levy, M.; Kolodziejczyk, A.A.; Thaiss, C.A.; Elinav, E. Dysbiosis and the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2017, *17*, 219–232, doi:10.1038/nri.2017.7.
  111. Donohoe, D.R.; Holley, D.; Collins, L.B.; Montgomery, S.A.; Whitmore, A.C.; Hillhouse, A.; Curry, K.P.; Renner, S.W.; Greenwalt, A.; Ryan, E.P.; et al. A gnotobiotic mouse model demonstrates that dietary fiber protects against colorectal tumorigenesis in a microbiota- and butyrate-dependent manner. *Cancer Discov.* 2014, *4*, 1387–1397, doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0501.
  112. Li, G.-F.; Zheng, H.-B. Effects of short-chain fatty acids on colonopathies and mechanisms involved. *World Chinese J. Dig.* 2010, *18*, 3425, doi:10.11569/wcjd.v18.i32.3425.
  113. Kim, C.H.; Park, J.; Kim, M. Gut microbiota-derived short-chain Fatty acids, T cells, and inflammation. *Immune Netw.* 2014, *14*, 277–88, doi:10.4110/in.2014.14.6.277.
  114. Luu, M.; Weigand, K.; Wedi, F.; Breidenbend, C.; Leister, H.; Pautz, S.; Adhikary, T.; Visekruna, A. Regulation of the effector function of CD8+ T cells by gut microbiota-derived metabolite butyrate. *Sci. Rep.* 2018, *8*, doi:10.1038/s41598-018-32860-x.
  115. Bachem, A.; Makhoulouf, C.; Binger, K.J.; de Souza, D.P.; Tull, D.; Hochheiser, K.; Whitney, P.G.; Fernandez-Ruiz, D.; Dähling, S.; Kastenmüller, W.; et al. Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote the Memory Potential of Antigen-Activated CD8+ T Cells. *Immunity* 2019, *51*, 285-297.e5, doi:10.1016/j.immuni.2019.06.002.
  116. Sun, M.; Wu, W.; Chen, L.; Yang, W.; Huang, X.; Ma, C.; Chen, F.; Xiao, Y.; Zhao, Y.; Ma, C.; et al. Microbiota-derived short-chain fatty acids promote Th1 cell IL-10 production to maintain intestinal homeostasis. *Nat. Commun.* 2018, *9*, 3555, doi:10.1038/s41467-018-05901-2.
  117. Kim, M.; Qie, Y.; Park, J.; Kim, C.H. Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses. *Cell Host Microbe* 2016, *20*, 202–14, doi:10.1016/j.chom.2016.07.001.
  118. Sanchez, H.N.; Gan, H.; Moroney, J.B.; Daw, C.C.; Taylor, J.; Zan, H.; Casali, P. B cell-intrinsic epigenetic modulation of local and systemic antibody response by gut microbiota through catabolic short-chain fatty acids. *J. Immunol.* 2018, *200*, doi: 10.1038/s41467-019-13603-6.
  119. Bilotta, A.J.; Cong, Y. Gut microbiota metabolite regulation of host defenses at mucosal surfaces: implication in precision medicine. *Precis. Clin. Med.* 2019, *2*, 110–119, doi:10.1093/pcmedi/pbz008.

120. Bingula, R.; Filaire, M.; Radosevic-Robin, N.; Bey, M.; Berthon, J.Y.; Bernalier-Donadille, A.; Vasson, M.P.; Filaire, E. Desired Turbulence? Gut-Lung Axis, Immunity, and Lung Cancer. *J. Oncol.* 2017, 2017, doi:10.1155/2017/5035371.
121. Dumas, A.; Bernard, L.; Poquet, Y.; Lugo-Villarino, G.; Neyrolles, O. The role of the lung microbiota and the gut-lung axis in respiratory infectious diseases. *Cell. Microbiol.* 2018, 20, e12966, doi:10.1111/cmi.12966.
122. Kobozev, I.; Karlsson, F.; Grisham, M.B. Gut-associated lymphoid tissue, T cell trafficking, and chronic intestinal inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010, 1207, E86, doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05711.x.
123. Jin, Y.; Dong, H.; Xia, L.; Yang, Y.; Zhu, Y.; Shen, Y.; Zheng, H.; Yao, C.; Wang, Y.; Lu, S. The Diversity of Gut Microbiome is Associated With Favorable Responses to Anti-Programmed Death 1 Immunotherapy in Chinese Patients With NSCLC. *J. Thorac. Oncol.* 2019, 14, 1378–1389, doi:10.1016/j.jtho.2019.04.007.
124. Gallacher, D.J.; Kotecha, S. Respiratory microbiome of new-born infants. *Front. Pediatr.* 2016, 4, 1, doi: 10.3389/fped.2016.00010.
125. David, L.A.; Maurice, C.F.; Carmody, R.N.; Gootenberg, D.B.; Button, J.E.; Wolfe, B.E.; Ling, A. V.; Devlin, A.S.; Varma, Y.; Fischbach, M.A.; et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2013, 505, 559–563, doi:10.1038/nature12820.
126. Rinninella, E.; Cintoni, M.; Raoul, P.; Lopetuso, L.R.; Scalfaferrri, F.; Pulcini, G.; Miggiano, G.A.D.; Gasbarrini, A.; Mele, M.C. Food components and dietary habits: Keys for a healthy gut microbiota composition. *Nutrients* 2019, 11, doi: 10.3390/nu11102393.
127. Vangay, P.; Ward, T.; Gerber, J.S.; Knights, D. Antibiotics, Pediatric Dysbiosis, and Disease. *Cell Host Microbe* 2015, 17, 553–564, doi:10.1016/j.chom.2015.04.006.
128. Lange, K.; Buerger, M.; Stallmach, A.; Bruns, T. Effects of Antibiotics on Gut Microbiota. *Dig. Dis.* 2016, 34, 260–268, doi: 10.1159/000443360.
129. Lavelle, A.; Hoffmann, T.W.; Pham, H.P.; Langella, P.; Guédon, E.; Sokol, H. Baseline microbiota composition modulates antibiotic-mediated effects on the gut microbiota and host. *Microbiome* 2019, 7, doi:10.1186/s40168-019-0725-3.
130. Francino, M.P. Antibiotics and the human gut microbiome: Dysbioses and accumulation of resistances. *Front. Microbiol.* 2016, 6, doi: 10.3389/fmicb.2015.01543.
131. Lupp, C.; Robertson, M.L.; Wickham, M.E.; Sekirov, I.; Champion, O.L.; Gaynor, E.C.; Finlay, B.B. Host-Mediated Inflammation Disrupts the Intestinal Microbiota and Promotes the Overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe* 2007, 2, 119–129, doi:10.1016/j.chom.2007.06.010.
132. Mathew, S.; Smatti, M.K.; Al Ansari, K.; Nasrallah, G.K.; Al Thani, A.A.; Yassine, H.M.

- Mixed Viral-Bacterial Infections and Their Effects on Gut Microbiota and Clinical Illnesses in Children. *Sci. Rep.* 2019, 9, doi:10.1038/s41598-018-37162-w.
133. Goodrich, J.K.; Waters, J.L.; Poole, A.C.; Sutter, J.L.; Koren, O.; Blekhan, R.; Beaumont, M.; Van Treuren, W.; Knight, R.; Bell, J.T.; et al. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 2014, 159, 789–99, doi:10.1016/j.cell.2014.09.053.
134. Deschasaux, M.; Bouter, K.E.; Prodan, A.; Levin, E.; Groen, A.K.; Herrema, H.; Tremaroli, V.; Bakker, G.J.; Attaye, I.; Pinto-Sietsma, S.J.; et al. Depicting the composition of gut microbiota in a population with varied ethnic origins but shared geography. *Nat. Med.* 2018, 24, 1526–1531, doi:10.1038/s41591-018-0160-1.
135. Keohane, D.M.; Ghosh, T.S.; Jeffery, I.B.; Molloy, M.G.; O'Toole, P.W.; Shanahan, F. Microbiome and health implications for ethnic minorities after enforced lifestyle changes. *Nat. Med.* 2020, 26, 1089–1095, doi:10.1038/s41591-020-0963-8.
136. Rutayisire, E.; Huang, K.; Liu, Y.; Tao, F. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC Gastroenterol.* 2016, 16, 86, doi:10.1186/s12876-016-0498-0.
137. de Groot, P.F.; Frissen, M.N.; de Clercq, N.C.; Nieuwdorp, M. Fecal microbiota transplantation in metabolic syndrome: History, present and future. *Gut Microbes* 2017, 8, 253–267, doi:10.1080/19490976.2017.1293224.
138. Basson, A.; Trotter, A.; Rodriguez-Palacios, A.; Cominelli, F. Mucosal Interactions between Genetics, Diet, and Microbiome in Inflammatory Bowel Disease. *Front. Immunol.* 2016, 7, 290, doi:10.3389/fimmu.2016.00290.
139. Matijašić, M.; Meštrović, T.; Perić, M.; Čipčić Paljetak, H.; Panek, M.; Vranešić Bender, D.; Ljubas Kelečić, D.; Krznarić, Ž.; Verbanac, D. Modulating Composition and Metabolic Activity of the Gut Microbiota in IBD Patients. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, doi:10.3390/ijms17040578.
140. Bhattarai, Y.; Muniz Pedrego, D.A.; Kashyap, P.C. Irritable bowel syndrome: a gut microbiota-related disorder? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2017, 312, G52–G62, doi:10.1152/ajpgi.00338.2016.
141. Zuo, T.; Ng, S.C. The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory bowel disease. *Front. Microbiol.* 2018, 9, doi:10.3389/fmicb.2018.02247.
142. Khan, I.; Ullah, N.; Zha, L.; Bai, Y.; Khan, A.; Zhao, T.; Che, T.; Zhang, C. Alteration of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease (IBD): Cause or Consequence? IBD Treatment Targeting the Gut Microbiome. *Pathogens* 2019, 8, 126, doi:10.3390/pathogens8030126.
143. Dahiya, D.K.; Renuka; Puniya, M.; Shandilya, U.K.; Dhewa, T.; Kumar, N.; Kumar, S.; Puniya, A.K.; Shukla, P. Gut Microbiota Modulation and Its Relationship with Obesity Using Prebiotic Fibers and Probiotics: A Review. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 563,

- doi:10.3389/fmicb.2017.00563.
144. Xu, Y.; Zhou, H.; Zhu, Q. The Impact of Microbiota-Gut-Brain Axis on Diabetic Cognition Impairment. *Front. Aging Neurosci.* 2017, *9*, 106, doi:10.3389/fnagi.2017.00106.
  145. Lazar, V.; Ditu, L.M.; Pircalabioru, G.G.; Picu, A.; Petcu, L.; Cucu, N.; Chifiriuc, M.C. Gut microbiota, host organism, and diet triologue in diabetes and obesity. *Front. Nutr.* 2019, *6*, doi.org/10.3389/fnut.2019.00021.
  146. Tang, W.H.W.; Kitai, T.; Hazen, S.L. Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Circ. Res.* 2017, *120*, 1183–1196, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.309715.
  147. Scheperjans, F.; Aho, V.; Pereira, P.A.B.; Koskinen, K.; Paulin, L.; Pekkonen, E.; Haapaniemi, E.; Kaakkola, S.; Eerola-Rautio, J.; Pohja, M.; et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov. Disord.* 2015, *30*, 350–358, doi:10.1002/mds.26069.
  148. Cenit, M.C.; Sanz, Y.; Codoñer-Franch, P. Influence of gut microbiota on neuropsychiatric disorders. *World J. Gastroenterol.* 2017, *23*, 5486–5498, doi:10.3748/wjg.v23.i30.5486.
  149. Srikantha, P.; Hasan Mohajeri, M. The possible role of the microbiota-gut-brain-axis in autism spectrum disorder. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, *20*, doi:10.3390/ijms20092115.
  150. Huang, T.T.; Lai, J.B.; Du, Y.L.; Xu, Y.; Ruan, L.M.; Hu, S.H. Current understanding of gut microbiota in mood disorders: An update of human studies. *Front. Genet.* 2019, *10*, doi:10.3389/fgene.2019.00098.
  151. Gazerani, P. Probiotics for Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, *20*, doi: 10.3390/ijms20174121, doi: 10.3390/ijms20174121.
  152. Xu, X.; Zhang, X. Effects of cyclophosphamide on immune system and gut microbiota in mice. *Microbiol. Res.* 2015, *171*, 97–106, doi:10.1016/j.micres.2014.11.002.
  153. Liu, T.; Wu, Y.; Wang, L.; Pang, X.; Zhao, L.; Yuan, H.; Zhang, C. A more robust gut microbiota in calorie-restricted mice is associated with attenuated intestinal injury caused by the chemotherapy drug cyclophosphamide. *MBio* 2019, *10*, doi:10.1128/mBio.02903-18.
  154. Viaud, S.; Saccheri, F.; Mignot, G.; Yamazaki, T.; Daillere, R.; Hannani, D.; Enot, D.P.; Pfirschke, C.; Engblom, C.; Pittet, M.J.; et al. The Intestinal Microbiota Modulates the Anticancer Immune Effects of Cyclophosphamide. *Science (80-. )*. 2013, *342*, 971–976, doi:10.1126/science.1240537.
  155. Gui, Q.-F.; Lu, H.-F.; Zhang, C.-X.; Xu, Z.-R.; Yang, Y.-H. Well-balanced commensal microbiota contributes to anti-cancer response in a lung cancer mouse model. *Genet. Mol. Res.* 2015, *14*, 5642–5651, doi:10.4238/2015.May.25.16.
  156. Crawford, P.A.; Gordon, J.I. From The Cover: Microbial regulation of intestinal radiosensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005, *102*, 13254–13259,

- doi:10.1073/pnas.0504830102.
157. Packey, C.D.; Ciorba, M.A. Microbial influences on the small intestinal response to radiation injury. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2010, *26*, 88–94, doi:10.1097/MOG.0b013e3283361927.
  158. Villéger, R.; Lopès, A.; Carrier, G.; Veziat, J.; Billard, E.; Barnich, N.; Gagnière, J.; Vazeille, E.; Bonnet, M. Intestinal Microbiota: A Novel Target to Improve Anti-Tumor Treatment? *Int. J. Mol. Sci.* 2019, *20*, 4584, doi:10.3390/ijms20184584.
  159. Van Praagh, J.B.; De Goffau, M.C.; Bakker, I.S.; Van Goor, H.; Harmsen, H.J.M.; Olinga, P.; Havenga, K. Mucus Microbiome of Anastomotic Tissue during Surgery Has Predictive Value for Colorectal Anastomotic Leakage. *Ann. Surg.* 2019, *269*, 911–916, doi:10.1097/SLA.0000000000002651.
  160. Bloemen, J.G.; Schreinemacher, M.H.; De Bruine, A.P.; Buurman, W.A.; Bouvy, N.D.; Dejong, C.H. Butyrate enemas improve intestinal anastomotic strength in a rat model. *Dis. Colon Rectum* 2010, *53*, 1069–1075, doi:10.1007/DCR.0b013e3181d881b7.
  161. Lauka, L.; Reitano, E.; Carra, M.C.; Gaiani, F.; Gavriilidis, P.; Brunetti, F.; De'Angelis, G.L.; Sobhani, I.; De'Angelis, N. Role of the intestinal microbiome in colorectal cancer surgery outcomes. *World J. Surg. Oncol.* 2019, *17*, 204, doi: 10.1186/s12957-019-1754-x.
  162. Sharma, P.; Allison, J.P. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: Toward combination strategies with curative potential. *Cell* 2015, *161*, 205–214, doi: 10.1016/j.cell.2015.03.030.
  163. Routy, B.; Le Chatelier, E.; Derosa, L.; Duong, C.P.M.; Alou, M.T.; Daillère, R.; Fluckiger, A.; Messaoudene, M.; Rauber, C.; Roberti, M.P.; et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science (80-. )*. 2018, *359*, 91–97, doi:10.1126/science.aan3706.
  164. Vetizou, M.; Pitt, J.M.; Daillere, R.; Lepage, P.; Waldschmitt, N.; Flament, C.; Rusakiewicz, S.; Routy, B.; Roberti, M.P.; Duong, C.P.M.; et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science (80-. )*. 2015, *350*, 1079–1084, doi:10.1126/science.aad1329.
  165. Frankel, A.E.; Deshmukh, S.; Reddy, A.; Lightcap, J.; Hayes, M.; McClellan, S.; Singh, S.; Rabideau, B.; Glover, T.G.; Roberts, B.; et al. Cancer Immune Checkpoint Inhibitor Therapy and the Gut Microbiota. *Integr. Cancer Ther.* 2019, *18*, doi: 10.1177/1534735419846379.
  166. Gopalakrishnan, V.; Spencer, C.N.; Nezi, L.; Reuben, A.; Andrews, M.C.; Karpinets, T. V.; Prieto, P.A.; Vicente, D.; Hoffman, K.; Wei, S.C.; et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science (80-. )*. 2018, *359*, 97–103, doi:10.1126/science.aan4236.
  167. Matson, V.; Fessler, J.; Bao, R.; Chongsuwat, T.; Zha, Y.; Alegre, M.L.; Luke, J.J.; Gajewski, T.F. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in



- metastatic melanoma patients. *Science* (80-. ). 2018, 359, 104–108, doi:10.1126/science.aao3290.
168. AE, F.; LA, C.; J, K.; TW, F.; Y, X.; EP, F.; AY, K. 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, 19, 848–855, doi:10.1016/J.NEO.2017.08.004.
169. Sivan, A.; Corrales, L.; Hubert, N.; Williams, J.B.; Aquino-Michaels, K.; Earley, Z.M.; Benyamin, F.W.; Lei, Y.M.; Jabri, B.; Alegre, M.-L.; et al. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* 2015, 350, 1084–9, doi:10.1126/science.aac4255.
170. Tanoue, T.; Morita, S.; Plichta, D.R.; Skelly, A.N.; Suda, W.; Sugiura, Y.; Narushima, S.; Vlamakis, H.; Motoo, I.; Sugita, K.; et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature* 2019, 565, 600–605, doi:10.1038/s41586-019-0878-z.
171. Derosa, L.; Hellmann, M.D.; Spaziano, M.; Halpenny, D.; Fidelle, M.; Rizvi, H.; Long, N.; Plodkowski, A.J.; Arbour, K.C.; Chaft, J.E.; et al. Negative association of antibiotics on clinical activity of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced renal cell and non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* 2018, 29, 1437–1444, doi:10.1093/annonc/mdy103.
172. Pinato, D.J.; Howlett, S.; Ottaviani, D.; Urus, H.; Patel, A.; Mineo, T.; Brock, C.; Power, D.; Hatcher, O.; Falconer, A.; et al. Association of Prior Antibiotic Treatment with Survival and Response to Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Patients with Cancer. *JAMA Oncol.* 2019, doi:10.1001/jamaoncol.2019.2785.
173. Elkrief, A.; El Raichani, L.; Richard, C.; Messaoudene, M.; Belkaid, W.; Malo, J.; Belanger, K.; Miller, W.; Jamal, R.; Letarte, N.; et al. Antibiotics are associated with decreased progression-free survival of advanced melanoma patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Oncoimmunology* 2019, 8, doi:10.1080/2162402X.2019.1568812.
174. Huemer, F.; Rinnerthaler, G.; Lang, D.; Hackl, H.; Lamprecht, B.; Greil, R. Association between antibiotics use and outcome in patients with NSCLC treated with immunotherapeutics. *Ann. Oncol.* 2019, 30, 652–653, doi: 10.1093/annonc/mdz021.
175. Kaderbhai, C.; Richard, C.; Fumet, J.D.; Aarnink, A.; Foucher, P.; Coudert, B.; Favier, L.; Lagrange, A.; Limagne, E.; Boidot, R.; et al. Antibiotic use does not appear to influence response to nivolumab. *Anticancer Res.* 2017, 37, 3195–3200, doi:10.21873/anticancer.11680.
176. Streit, W.R.; Schmitz, R.A. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* 2004, 7, 492–498, doi:10.1016/j.mib.2004.08.002.
177. Handelsman, J.; Rondon, M.R.; Brady, S.F.; Clardy, J.; Goodman, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for

- natural products. *Chem. Biol.* 1998, 5, R245-9, doi: 10.1016/s1074-5521(98)90108-9.
178. Clarridge, J.E.; III Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004, 17, 840–62, table of contents, doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.
179. Ma, J.; Prince, A.; Aagaard, K.M. Use of whole genome shotgun metagenomics: A practical guide for the microbiome-minded physician scientist. *Semin. Reprod. Med.* 2014, 32, 5–13, doi:10.1055/s-0033-1361817.
180. D'Argenio, V. Human microbiome acquisition and bioinformatic challenges in metagenomic studies. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, doi: 10.3390/ijms19020383.
181. Fukuda, K.; Ogawa, M.; Taniguchi, H.; Saito, M. Molecular approaches to studying microbial communities: Targeting the 16S ribosomal RNA gene. *J. UOEH* 2016, 38, 223–232, doi:10.7888/JUOEH.38.223.
182. Eisenhauer, E.A.; Therasse, P.; Bogaerts, J.; Schwartz, L.H.; Sargent, D.; Ford, R.; Dancey, J.; Arbuck, S.; Gwyther, S.; Mooney, M.; et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer* 2009, 45, 228–247, doi:10.1016/j.ejca.2008.10.026.
183. Bentley, D.R.; Balasubramanian, S.; Swerdlow, H.P.; Smith, G.P.; Milton, J.; Brown, C.G.; Hall, K.P.; Evers, D.J.; Barnes, C.L.; Bignell, H.R.; et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 2008, 456, 53–59, doi:10.1038/nature07517.
184. Schmieder, R.; Edwards, R.; Bateman, A. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinforma. Appl. NOTE* 2011, 27, 863–864, doi:10.1093/bioinformatics/btr026.
185. Magoč, T.; Salzberg, S.L. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 2011, 27, 2957–2963, doi:10.1093/bioinformatics/btr507.
186. Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Pěa, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 2010, 7, 335–336, doi: 10.1038/nmeth.f.303.
187. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 2016, 13, 581–583, doi:10.1038/nmeth.3869.
188. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2013, 41, doi:10.1093/nar/gks1219.
189. Willis, A.D. Rarefaction, Alpha Diversity, and Statistics. *Front. Microbiol.* 2019, 10,

- 2407, doi:10.3389/fmicb.2019.02407.
190. Whittaker, R.H. EVOLUTION AND MEASUREMENT OF SPECIES DIVERSITY. *Taxon* 1972, 21, 213–251, doi:10.2307/1218190.
191. Shannon, C.E. A Mathematical Theory of Communication. *Bell Syst. Tech. J.* 1948, 27, 379–423, doi:10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x.
192. Simpson, E.H. Measurement of diversity [16]. *Nature* 1949, 163, 688. doi.org/10.1038/163688a0.
193. Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W.S.; Huttenhower, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011, 12, doi:10.1186/gb-2011-12-6-r60.
194. Naidoo, J.; Page, D.B.; Li, B.T.; Connell, L.C.; Schindler, K.; Lacouture, M.E.; Postow, M.A.; Wolchok, J.D. Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 2016, 27, 1362, doi:10.1093/annonc/mdw141.
195. Das, S.; Johnson, D.B. Immune-related adverse events and anti-tumor efficacy of immune checkpoint inhibitors. *J. Immunother. Cancer* 2019, 7, doi: 10.1186/s40425-019-0805-8.
196. Johnson, J.S.; Spakowicz, D.J.; Hong, B.-Y.; Petersen, L.M.; Demkowicz, P.; Chen, L.; Leopold, S.R.; Hanson, B.M.; Agresta, H.O.; Gerstein, M.; et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat. Commun.* 2019 101 2019, 10, 1–11, doi:10.1038/s41467-019-13036-1.
197. Zhang, W.Q.; Zhao, S.K.; Luo, J.W.; Dong, X.P.; Hao, Y.T.; Li, H.; Shan, L.; Zhou, Y.; Shi, H.B.; Zhang, Z.Y.; et al. Alterations of fecal bacterial communities in patients with lung cancer. *Am. J. Transl. Res.* 2018, 10, 3171–3185.
198. Wexler, H.M. Bacteroides: The good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007, 20, 593–621, doi: 10.1128/CMR.00008-07.
199. Visbal, A.L.; Williams, B.A.; Nichols, F.C.; Marks, R.S.; Jett, J.R.; Aubry, M.-C.; Edell, E.S.; Wampfler, J.A.; Molina, J.R.; Yang, P. Gender Differences in Non-Small-Cell Lung Cancer Survival: An Analysis of 4,618 Patients Diagnosed Between 1997 and 2002. 2004, doi:10.1016/j.athoracsur.2003.11.021.
200. Raphael, J.; Batra, A.; Boldt, G.; Shah, P.S.; Blanchette, P.; Rodrigues, G.; Vincent, M.D. Predictors of Survival Benefit From Immune Checkpoint Inhibitors in Patients With Advanced Non-small-cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Lung Cancer* 2020, 21, 106-113.e5, doi: 10.1016/j.clcc.2019.11.004.
201. Calle, E.E.; Rodriguez, C.; Walker-Thurmond, K.; Thun, M.J. Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa021423> 2009, 348, 1625–1638, doi:10.1056/NEJMoa021423.

202. Sepesi, B.; Gold, K.A.; Correa, A.M.; Heymach, J. V.; Vaporciyan, A.A.; Roszik, J.; Dmitrovsky, E.; Liu, X. The Influence of Body Mass Index on Overall Survival Following Surgical Resection of Non–Small Cell Lung Cancer. In Proceedings of the Journal of Thoracic Oncology; Elsevier Inc, 2017; Vol. 12, pp. 1280–1287, doi: 10.1016/j.jtho.2017.05.010.
203. Eroglu, C.; Orhan, O.; Unal, D.; Dogu, G.G.; Karaca, H.; Dikilitas, M.; Oztürk, A.; Ozkan, M.; Kaplan, B. Concomitant chemoradiotherapy with docetaxel and cisplatin followed by consolidation chemotherapy in locally advanced unresectable non-small cell lung cancer. *Ann. Thorac. Med.* 2013, 8, 109, doi:10.4103/1817-1737.109824.
204. Sun, L.; Zhang, X.; Zhang, Y.; Zheng, K.; Xiang, Q.; Chen, N.; Chen, Z.; Zhang, N.; Zhu, J.; He, Q. Antibiotic-induced disruption of gut microbiota alters local metabolomes and immune responses. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019, 9, doi:10.3389/fcimb.2019.00099.
205. Huemer, F.; Rinnerthaler, G.; Westphal, T.; Hackl, H.; Hutarew, G.; Gampenrieder, S.P.; Weiss, L.; Greil, R. Impact of antibiotic treatment on immune-checkpoint blockade efficacy in advanced non-squamous non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2018, 9, 16512–16520, doi:10.18632/oncotarget.24751.
206. Wilson, B.E.; Routy, B.; Nagrial, A.; Chin, V.T. The effect of antibiotics on clinical outcomes in immune-checkpoint blockade: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cancer Immunol. Immunother.* 2020, 69, 343–354, doi:10.1007/s00262-019-02453-2.
207. Elvers, K.T.; Wilson, V.J.; Hammond, A.; Duncan, L.; Huntley, A.L.; Hay, A.D.; van der Werf, E.T. Antibiotic-induced changes in the human gut microbiota for the most commonly prescribed antibiotics in primary care in the UK: a systematic review. *BMJ Open* 2020, 10, e035677, doi:10.1136/bmjopen-2019-035677.
208. Palleja, A.; Mikkelsen, K.H.; Forslund, S.K.; Kashani, A.; Allin, K.H.; Nielsen, T.; Hansen, T.H.; Liang, S.; Feng, Q.; Zhang, C.; et al. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nat. Microbiol.* 2018, 3, 1255–1265, doi:10.1038/s41564-018-0257-9.
209. Relman, D.A. The human microbiome: Ecosystem resilience and health. *Nutr. Rev.* 2012, 70, doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00489.x.
210. Zinöcker, M.K.; Lindseth, I.A. The Western Diet–Microbiome–Host Interaction and Its Role in Metabolic Disease. *Nutrients* 2018, 10, doi:10.3390/NU10030365.
211. Thawabteh, A.; Juma, S.; Bader, M.; Karaman, D.; Scrano, L.; Bufo, S.A.; Karaman, R. The biological activity of natural alkaloids against herbivores, cancerous cells and pathogens. *Toxins (Basel)*. 2019, 11, doi: 10.3390/toxins11110656.
212. Sato, K.; Akamatsu, H.; Murakami, E.; Sasaki, S.; Kanai, K.; Hayata, A.; Tokudome, N.; Akamatsu, K.; Koh, Y.; Ueda, H.; et al. Correlation between immune-related adverse events and efficacy in non-small cell lung cancer treated with nivolumab. *Lung Cancer*

- 2018, *115*, 71–74, doi:10.1016/j.lungcan.2017.11.019.
213. Weinmann, S.C.; Pisetsky, D.S. Mechanisms of immune-related adverse events during the treatment of cancer with immune checkpoint inhibitors. *Rheumatol. (United Kingdom)* 2019, *58*, vii59–vii67, doi:10.1093/rheumatology/kez308.
214. Zhou, X.; Yao, Z.; Yang, H.; Liang, N.; Zhang, X.; Zhang, F. Are immune-related adverse events associated with the efficacy of immune checkpoint inhibitors in patients with cancer? A systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* 2020, *18*, 87, doi: 10.1186/s12916-020-01549-2.
215. Hua, C.; Boussemart, L.; Mateus, C.; Routier, E.; Boutros, C.; Cazenave, H.; Viollet, R.; Thomas, M.; Roy, S.; Benannoune, N.; et al. Association of vitiligo with tumor response in patients with metastatic melanoma treated with pembrolizumab. *JAMA Dermatology* 2016, *152*, 45–51, doi:10.1001/jamadermatol.2015.2707.
216. Tattersall, I.W.; Leventhal, J.S. Cutaneous toxicities of immune checkpoint inhibitors: The role of the dermatologist. *Yale J. Biol. Med.* 2020, *93*, 123–132.
217. O’Neill, C.A.; Monteleone, G.; McLaughlin, J.T.; Paus, R. The gut-skin axis in health and disease: A paradigm with therapeutic implications. *BioEssays* 2016, *38*, 1167–1176, doi:10.1002/bies.201600008.
218. Salem, I.; Ramser, A.; Isham, N.; Ghannoum, M.A. The gut microbiome as a major regulator of the gut-skin axis. *Front. Microbiol.* 2018, *9*, doi: 10.3389/fmicb.2018.01459.
219. Coates, M.; Lee, M.J.; Norton, D.; MacLeod, A.S. The Skin and Intestinal Microbiota and Their Specific Innate Immune Systems. *Front. Immunol.* 2019, *10*, 2950, doi: 10.3389/fimmu.2019.02950.
220. Polkowska-Pruszyńska, B.; Gerkowicz, A.; Krasowska, D. The gut microbiome alterations in allergic and inflammatory skin diseases – an update. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* 2020, *34*, 455–464, doi: 10.1111/jdv.15951.
221. Ramírez-Boscá, A.; Navarro-López, V.; Martínez-Andrés, A.; Such, J.; Francés, R.; De La Parte, J.; Asín-Llorca, M. Identification of bacterial DNA in the peripheral blood of patients with active psoriasis. *JAMA Dermatology* 2015, *151*, 670–671, doi: 10.1001/jamadermatol.2014.5585.
222. Groeger, D.; O’Mahony, L.; Murphy, E.F.; Bourke, J.F.; Dinan, T.G.; Kiely, B.; Shanahan, F.; Quigley, E.M.M. *Bifidobacterium infantis* 35624 modulates host inflammatory processes beyond the gut. *Gut Microbes* 2013, *4*, 325–339, doi:10.4161/gmic.25487.
223. Chapat, L.; Chemin, K.; Dubois, B.; Bourdet-Sicard, R.; Kaiserlian, D. *Lactobacillus casei* reduces CD8+ T cell-mediated skin inflammation. *Eur. J. Immunol.* 2004, *34*, 2520–2528, doi:10.1002/eji.200425139.
224. Hacini-Rachinel, F.; Gheit, H.; Le Ludeuc, J.B.; Dif, F.; Nancey, S.; Kaiserlian, D. Oral probiotic control skin inflammation by acting on both effector and regulatory T cells.

- PLoS One* 2009, 4, 4903, doi:10.1371/journal.pone.0004903.
225. Niers, L.; Martín, R.; Rijkers, G.; Sengers, F.; Timmerman, H.; Van Uden, N.; Smidt, H.; Kimpen, J.; Hoekstra, M. The effects of selected probiotic strains on the development of eczema (the Panda study). *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2009, 64, 1349–1358, doi:10.1111/j.1398-9995.2009.02021.x.
226. Agarwal, A.; Modliszewski, J.; Davey, L.; Reyes-Martinez, M.; Runyambo, D.; Corcoran, D.; Dressman, H.; George, D.J.; Valdivia, R.; Armstrong, A.J.; et al. Investigating the role of the gastrointestinal microbiome in response to immune checkpoint inhibitors (ICIs) among patients (pts) with metastatic renal cell carcinoma (mRCC). *J. Clin. Oncol.* 2020, 38, 730–730, doi:10.1200/jco.2020.38.6\_suppl.730.
227. Katayama, Y.; Yamada, T.; Shimamoto, T.; Iwasaku, M.; Kaneko, Y.; Uchino, J.; Takayama, K. The role of the gut microbiome on the efficacy of immune checkpoint inhibitors in Japanese responder patients with advanced non-small cell lung cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* 2019, 8, 847–853, doi:10.21037/tlcr.2019.10.23.
228. Hakoziaki, T.; Richard, C.; Elkrief, A.; Hosomi, Y.; Benlaïfaoui, M.; Mimpen, I.; Terrisse, S.; Derosa, L.; Zitvogel, L.; Routy, B.; et al. The Gut Microbiome Associates with Immune Checkpoint Inhibition Outcomes in Patients with Advanced Non–Small Cell Lung Cancer. *Cancer Immunol. Res.* 2020, 8, 1243–1250, doi:10.1158/2326-6066.cir-20-0196.
229. Youssef, O.; Lahti, L.; Kokkola, A.; Karla, T.; Tikkanen, M.; Ehsan, H.; Carpelan-Holmström, M.; Koskensalo, S.; Böhling, T.; Rautelin, H.; et al. Stool Microbiota Composition Differs in Patients with Stomach, Colon, and Rectal Neoplasms. *Dig. Dis. Sci.* 2018, 63, 2950–2958, doi:10.1007/s10620-018-5190-5.
230. Liu, F.; Li, J.; Guan, Y.; Lou, Y.; Chen, H.; Xu, M.; Deng, D.; Chen, J.; Ni, B.; Zhao, L.; et al. Dysbiosis of the gut microbiome is associated with tumor biomarkers in lung cancer. *Int. J. Biol. Sci.* 2019, 15, 2381–2392, doi:10.7150/ijbs.35980.
231. Reichardt, N.; Duncan, S.H.; Young, P.; Belenguer, A.; McWilliam Leitch, C.; Scott, K.P.; Flint, H.J.; Louis, P. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME J.* 2014, 8, 1323–1335, doi:10.1038/ismej.2014.14.
232. Louis, P.; Flint, H.J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.* 2017, 19, 29–41, doi: 10.1111/1462-2920.13589.
233. Tian, X.; Hellman, J.; Horswill, A.R.; Crosby, H.A.; Francis, K.P.; Prakash, A. Elevated gut microbiome-derived propionate levels are associated with reduced sterile lung inflammation and bacterial immunity in mice. *Front. Microbiol.* 2019, 10, doi:10.3389/fmicb.2019.00159.
234. Citronberg, J.S.; Curtis, K.R.; White, E.; Newcomb, P.A.; Newton, K.; Atkinson, C.; Song, X.; Lampe, J.W.; Hullar, M.A. Association of gut microbial communities with plasma lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in premenopausal women. *ISME J.* 2018, 12,

- 1631–1641, doi:10.1038/s41396-018-0064-6.
235. Nomura, M.; Nagatomo, R.; Doi, K.; Shimizu, J.; Baba, K.; Saito, T.; Matsumoto, S.; Inoue, K.; Muto, M. Association of Short-Chain Fatty Acids in the Gut Microbiome With Clinical Response to Treatment With Nivolumab or Pembrolizumab in Patients With Solid Cancer Tumors. *JAMA Netw. Open* 2020, 3, e202895, doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.2895.
236. Botticelli, A.; Vernocchi, P.; Marini, F.; Quagliarello, A.; Cerbelli, B.; Reddel, S.; Del Chierico, F.; Di Pietro, F.; Giusti, R.; Tomassini, A.; et al. Gut metabolomics profiling of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients under immunotherapy treatment. *J. Transl. Med.* 2020, 18, 49, doi:10.1186/s12967-020-02231-0.
237. Peters, B.A.; Hayes, R.B.; Goparaju, C.; Reid, C.; Pass, H.I.; Ahn, J. The microbiome in lung cancer tissue and recurrence-free survival. *Author Manuscr. Publ. OnlineFirst* 2019, doi:10.1158/1055-9965.EPI-18-0966.
238. Kowalska-Duplaga, K.; Gosiewski, T.; Kapusta, P.; Sroka-Oleksiak, A.; Wędrychowicz, A.; Pieczarkowski, S.; Ludwig-Słomczyńska, A.H.; Wołkow, P.P.; Fyderek, K. Differences in the intestinal microbiome of healthy children and patients with newly diagnosed Crohn's disease. *Sci. Rep.* 2019, 9, 18880, doi:10.1038/s41598-019-55290-9.
239. Valles-Colomer, M.; Falony, G.; Darzi, Y.; Tigchelaar, E.F.; Wang, J.; Tito, R.Y.; Schiweck, C.; Kurilshikov, A.; Joossens, M.; Wijmenga, C.; et al. The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. *Nat. Microbiol.* 2019, 4, 623–632, doi:10.1038/s41564-018-0337-x.
240. Castaño-Rodríguez, N.; Goh, K.-L.; Fock, K.M.; Mitchell, H.M.; Kaakoush, N.O. Dysbiosis of the microbiome in gastric carcinogenesis. *Sci. Rep.* 2017, 7, 15957, doi:10.1038/s41598-017-16289-2.
241. Gonçalves, C.; Soares, G.M.S.; Faveri, M.; Pérez-Chaparro, P.J.; Lobão, E.; Figueiredo, L.C.; Baccelli, G.T.; Feres, M. Association of three putative periodontal pathogens with chronic periodontitis in Brazilian subjects. *J. Appl. Oral Sci.* 2016, 24, 181–186, doi:10.1590/1678-775720150445.
242. Botticelli, A.; Putignani, L.; Zizzari, I.; Del Chierico, F.; Reddel, S.; Di Pietro, F.; Quagliarello, A.; Onesti, C.E.; Raffaele, G.; Mazzuca, F.; et al. Changes of microbiome profile during nivolumab treatment in NSCLC patients. *J. Clin. Oncol.* 2018, 36, e15020–e15020, doi:10.1200/jco.2018.36.15\_suppl.e15020.
243. Taylor, H.; McDonald, J.; Serrano Contreras, J.I.; Li, J.; Marchesi, J.; Hart, A. DOP08 Deep remission in paediatric Crohn's disease is associated with increased abundance of dialister species and increased valerate. *J. Crohn's Colitis* 2020, 14, S045–S046, doi:10.1093/ecco-jcc/jjz203.047.
244. Luu, M.; Pautz, S.; Kohl, V.; Singh, R.; Romero, R.; Lucas, S.; Hofmann, J.; Raifer, H.; Vachharajani, N.; Carrascosa, L.C.; et al. The short-chain fatty acid pentanoate

## Bibliografía

suppresses autoimmunity by modulating the metabolic-epigenetic crosstalk in lymphocytes. *Nat. Commun.* 2019, *10*, 1–12, doi:10.1038/s41467-019-08711-2.



## **VII. ANEXOS**



## 1. Tablas suplementarias

Tabla S1. Descriptores T, N, M en la octava edición del sistema de clasificación TNM [17].

T, N, M del sistema de clasificación TNM (octava edición)	
T (Tumor primario)	
<b>T0</b>	No hay evidencia del tumor primario.
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ.
<b>T1</b>	La mayor dimensión del tumor no pasa 3 cm, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que el bronquio lobar.
<b>-T1a (mi)</b>	Adenocarcinoma mínimamente invasivo.
<b>- T1a</b>	El diámetro mayor del tumor no pasa 1 cm.
<b>- T1b</b>	El diámetro mayor del tumor más de 1 cm y no pasa 2 cm.
<b>- T1c</b>	El diámetro mayor del tumor más de 2 cm y no pasa 3 cm.
<b>T2</b>	El diámetro mayor entre 3 cm y 5 cm, o tumor que involucra: pleura visceral, o bronquio principal (no carina), atelectasia al ilion.
<b>- T2a</b>	El diámetro mayor más de 3 cm y no pasa 4 cm.
<b>- T2b</b>	El diámetro mayor más de 4 cm y no pasa 5 cm.
<b>T3</b>	El diámetro mayor más de 5 cm y no pasa 7 cm, o uno que invade directamente cualquiera de los siguientes: pared torácica, pericardio, nervio frénico, o nódulo(s) tumoral(es) separado(s) en el mismo lóbulo.
<b>T4</b>	El diámetro mayor más de 7 cm, o invasión tumoral: mediastino, diafragma, corazón, grandes vasos, nervio laríngeo recurrente, carina, tráquea, esófago, columna vertebral; o nódulo(s) tumoral(es) en un lóbulo ipsilateral diferente.
N (Nódulo linfático regional)	
<b>N0</b>	Ninguna metástasis regional de ganglios linfáticos.
<b>N1</b>	Metástasis en nódulos hiliares o pulmonares ipsilaterales.
<b>N2</b>	Metástasis en los ganglios mediastínicos / subcarinales ipsilaterales.
<b>N3</b>	Metástasis en los ganglios mediastínicos / hiliares contralaterales o supraclaviculares.
M (Metástasis a distancia)	
<b>M0</b>	No presenta metástasis a distancia.
<b>M1</b>	Presenta metástasis a distancia.
<b>- M1a</b>	Derrame pleural / pericárdico maligno o nódulos pleurales / pericárdicos; o nódulo(s) tumoral(es) separado(s) en un lóbulo contralateral.
<b>- M1b</b>	Presenta metástasis a distancia única.
<b>M1c</b>	Presenta metástasis a distancia múltiples.

**Tabla S2. Correlación entre las principales características clínico-patológicas y la respuesta según la línea de tratamiento con ICIs.**

Características	BCD	No-BCD	p valor
<b>Pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea</b>			
<b>Edad</b>			
≤66 años	8 (40,0%)	9 (52,9%)	0,431
>66 años	12 (60,0%)	8 (47,1%)	
<b>Sexo</b>			
Hombre	16 (80,0%)	8 (47,1%)	<b>0,036*</b>
Mujer	4 (20,0%)	9 (52,9%)	
<b>Tabaquismo</b>			
Fumador	13 (65,0%)	13 (76,5%)	0,447
No fumador	7 (35,0%)	4 (23,5%)	
<b>Índice de masa corporal</b>			
≥25	14 (70,0%)	4 (23,5%)	<b>0,006*</b>
<25	5 (25,0%)	11 (64,7%)	
Sin especificar	1 (5,0%)	2 (11,8%)	
<b>Antibióticos previos</b>			
Sí	8 (40,0%)	6 (35,3%)	0,769
No	12 (60,0%)	11 (64,7%)	
<b>Estado funcional</b>			
0-1	19 (95,0%)	15 (88,2%)	0,452
≥2	1 (5,0%)	2 (11,8%)	
<b>Histología</b>			
Adenocarcinoma	11 (55,0%)	10 (58,8%)	0,815
No adenocarcinoma	9 (45,0%)	7 (41,2%)	
<b>Estadio</b>			
III	5 (25,0%)	2 (11,8%)	0,306
IV	15 (75,0%)	15 (88,2%)	
<b>Tamaño tumoral</b>			
≤5 cm	4 (20,03%)	4 (23,5%)	0,795
>5 cm	16 (80,0%)	13 (76,5%)	
<b>Nº localizaciones metastásicas</b>			
≤2	8 (40,0%)	2 (11,8%)	0,054
>2	12 (60,0%)	15 (88,2%)	

<b>Pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea</b>			
<b>Edad</b>			
≤66 años	6 (46,2%)	11 (57,9%)	
>66 años	7 (53,8%)	8 (42,1%)	0,513
<b>Sexo</b>			
Hombre	12 (92,3%)	13 (68,4%)	
Mujer	1 (7,7%)	6 (31,6%)	0,108
<b>Tabaquismo</b>			
Fumador	9 (69,2%)	12 (63,2%)	
No fumador	4 (30,8%)	7 (36,8%)	0,722
<b>Índice de masa corporal</b>			
≥ 25	7 (53,8%)	10 (52,6%)	
<25	6 (46,2%)	8 (42,1%)	
Sin especificar	0 (0,0%)	1 (5,3%)	0,925
<b>Antibióticos previos</b>			
Sí	2 (15,4%)	4 (21,1%)	
No	11 (84,6%)	15 (78,9%)	0,687
<b>Estado funcional</b>			
0-1	13 (100,0%)	16 (84,2%)	
≥2	0 (0,0%)	3 (15,8%)	0,132
<b>Histología</b>			
Adenocarcinoma	3 (23,1%)	8 (42,1%)	
No adenocarcinoma	10 (76,9%)	11 (57,9%)	0,266
<b>Estadio</b>			
III	3 (23,1%)	2 (10,5%)	
IV	10 (76,9%)	17 (89,5%)	0,337
<b>Tamaño tumoral</b>			
≤5 cm	6 (46,2%)	5 (26,3%)	
>5 cm	7 (53,8%)	14 (73,7%)	0,114
<b>Nº localizaciones metastásicas</b>			
≤2	8 (61,5%)	9 (47,4%)	
>2	5 (38,5%)	10 (52,6%)	0,430

P valores se obtuvieron usando el test chi-cuadrado. \* $p < 0,05$ .

**Tabla S3. Resultados del análisis de regresión de Cox basado en variables clínico-patológicas según la línea de tratamiento con ICIs.**

Variables	SLP			SG		
	HR	IC 95%	P valor	HR	IC 95%	P valor
<b>Pacientes tratados con pembrolizumab en primera línea</b>						
<b>Sexo</b>						
Hombre vs. Mujer	0,455	0,207-1,010	0,051	0,937	0,368-2,383	0,891
<b>Edad</b>						
≤66 vs. >66	0,905	0,415-1,973	0,803	0,769	0,309-1,915	0,572
<b>Hábito tabáquico</b>						
Fumador vs. No fumador	1,256	0,526-2,996	0,608	1,081	0,386-3,027	0,883
<b>IMC</b>						
<25 vs. ≥25	2,575	1,123-5,907	<b>0,026*</b>	4,256	1,362-13,304	<b>0,013*</b>
<b>Estadio</b>						
III vs. IV	1,137	0,456-2,835	0,783	0,834	0,242-2,870	0,773
<b>Antibióticos previos</b>						
Sí vs. No	0,851	0,379-1,913	0,697	0,823	0,312-2,170	0,694
<b>Estado funcional</b>						
0-1 vs. 2	0,335	0,095-1,180	0,089	0,486	0,108-2,297	0,349
<b>Histología</b>						
ADC vs. No-ADC	1,015	0,466-2,214	0,970	0,783	0,317-1,930	0,594
<b>Tamaño tumoral</b>						
≤5cm vs. >5cm	0,622	0,213-1,814	0,385	0,361	0,083-1,572	0,175
<b>Nº localizaciones metastásicas</b>						
≤2 vs. >2	0,579	0,231-1,447	0,242	0,723	0,238-2,196	0,568
<b>Pacientes tratados con nivolumab y atezolizumab en segunda o tercera línea</b>						
<b>Sexo</b>						
Hombre vs. Mujer	1,803	0,748-4,342	0,189	1,870	0,715-4,891	0,202

<b>Edad</b>						
≤66 vs. >66	0,815	0,390-1,701	0,585	0,890	0,384-2,063	0,786
<b>Hábito tabáquico</b>						
Fumador vs. No fumador	0,851	0,404-1,794	0,672	1,483	0,641-3,429	0,357
<b>IMC</b>						
<25 vs. ≥25	1,350	0,637-2,858	0,434	0,919	0,385-2,196	0,849
<b>Estadio</b>						
III vs. IV	1,987	0,685-5,761	0,206	1,884	0,554-6,404	0,310
<b>Antibióticos previos</b>						
Sí vs. No	1,111	0,420-2,935	0,832	0,840	0,283-2,489	0,753
<b>Estado funcional</b>						
0-1 vs. 2	2,295	0,647-8,137	0,198	3,284	0,916-11,768	0,068
<b>Histología</b>						
ADC vs. No-ADC	0,616	0,284-1,337	0,220	0,733	0,304-1,763	0,487
<b>Tamaño tumoral</b>						
≤ 5cm vs. > 5cm	1,289	0,571-2,951	0,533	2,376	0,795-7,104	0,121
<b>Nº localizaciones metastásicas</b>						
≤ 2 vs. >2	1,915	0,838-4,379	0,123	1,810	0,734-4,468	0,198

IMC: Índice de masa corporal; ADC: Adenocarcinoma; PD-L1 positivo: TPS≥1%; PD-L1 negativo: TPS<1%. HR: *hazard ratio*; IC: intervalo de confianza. Los *p* valores se obtuvieron usando el método de regresión de Cox univariante. \**p* < 0,05.

## 2. Aprobación CEIm



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

### APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

- ANEXO 11 -

Este CEIm tras evaluar en su reunión de 7 de Febrero de 2016 el Proyecto de Investigación:

Título:	Microbiota intestinal y de tracto respiratorio, ¿nuevo biomarcador en cáncer de pulmón no microcítico?		
I.P.:	Carlos Camps Herrero	Servicio/Unidad	Oncología

Acuerda respecto a esta documentación:

Que se cumplen los requisitos éticos y metodológicos y la Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado presentado reúnen las condiciones exigidas por este CEIC, por tanto se decide su APROBACIÓN.

#### COMPOSICIÓN DEL CEIm

**Presidente:** Dra. Elena Rubio Gomis (Unidad de Farmacología Clínica)

#### Vocales:

- Dra. Pilar Blasco Segura (Servicio de Farmacia)
- Dr. Ernesto Bataller Alonso (Director Económico del CHGUV)
- Dr. Enrique Ortega Gonzalez (Gerente Chguv)
- Dr. Julio Cortijo Gimeno (Unidad de Docencia e Investigación)
- Dña. Maria Teresa Jareño (Unidad de Reanimación Cardiaca)
- Dr. Miguel Armengot Carceller (Servicio de Otorrinolaringología)
- Dr. Gustavo Juan Samper (Servicio de Neumología)
- D. Alejandro Moner González (Gerencia CHGUV – Asesoría Jurídica)
- Dr. Alberto Berenguer Jofresa (Servicio de Cardiología)
- Dra. Ana Blasco Cordellat (Servicio de Oncología)
- Dr. Antonio Martorell Aragonés (Unidad de Alergología)
- Dr. Aurelio Quesada Dorador (Servicio de Cardiología)
- Dña. Encarna Domingo Cebrián (Servicio de Estomatología)





Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

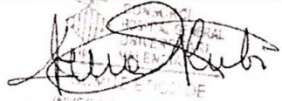
- Dra. M<sup>a</sup> José Safont Aguilera (Servicio de Oncología)
- Dr. Javier Milara Payá (Farmacia)
- Dra. Goitzane Marcaida Benito (Servicio de Análisis Clínicos)
- Dr. Pedro Polo Martín (Pediatra- Atención Primaria)
- D. Jaime Alapont Pérez (Miembro lego Gerencia. Asesoría Jurídica)
- Dña. Carmen Sarmiento Cabañes (Miembro independiente de la organización asistencial)
- D. A. Baltasar Olivas Nevado (Miembro independiente de la organización asistencial)
- 

**Secretario:** Dr. Elias Ruiz Rojo (Farmacéutico Att Primaria)

El CEIm del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) tanto en su composición como en sus procedimientos y con la legislación vigente que regula su funcionamiento, y que la composición del CEIm es la indicada en el anexo I, teniendo en cuenta que en el caso de que algún miembro participe en el ensayo o declare algún conflicto de interés no habrá participado en la evaluación ni en el dictamen de la solicitud de autorización del ensayo clínico

Lo que comunico a efectos oportunos:

Valencia a 07 de febrero de 2017

Fdo. Dra Elena Rubio Gomis (Presidente CEIC.CHGUV)


### 3. Documento de información al paciente y consentimiento informado



#### DOCUMENTO DE INFORMACION AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

DONANTE: \_\_\_\_\_

ACERCA DE LA DONACIÓN VOLUNTARIA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA OBTENIDAS EN EL CURSO DE PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS, TERAPÉUTICOS O DIAGNÓSTICOS.

<b>LÍNEA DE INVESTIGACIÓN</b>	Oncología Molecular
<b>INVESTIGADOR PRINCIPAL</b>	Dr. Carlos Camps
<b>CENTRO</b>	Servicio de Oncología Médica (SOM) del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV) y Laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV)
<b>EQUIPO INVESTIGADOR</b>	Facultativos del SOM, personal de la Unidad de Investigación Clínica del SOM, y del laboratorio de Oncología Molecular, miembros de los servicios quirúrgicos involucrados (Cirugía Torácica, Cirugía General), facultativos del servicio de Anatomía Patológica.

**1. DESCRIPCIÓN GENERAL:** La línea de investigación de “Oncología Molecular” centra sus esfuerzos en la comprensión de la patogénesis de los eventos genéticos y moleculares implicados en el origen y la progresión del cáncer. Uno de los aspectos de mayor interés en esta línea de investigación es la búsqueda de biomarcadores que puedan ser usados en la clínica y ayuden a la individualización del tratamiento del cáncer.

**PROPÓSITO DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:** Analizar en diferentes tipos de muestras, factores que puedan ser importantes en el diagnóstico, pronóstico y en la respuesta del cáncer a los tratamientos empleados, así como en la aparición de efectos tóxicos asociados a dichos tratamientos. Si bien la constitución genética de los seres humanos es muy similar, existen pequeñas diferencias entre las personas que, en algunos casos podrían asociarse con el desarrollo o evolución de diferentes enfermedades. Por otra parte, los tumores también presentan diferencias a nivel genético que necesitan seguir siendo estudiadas. Por lo tanto, para poder llevar a cabo esta línea de investigación, es necesario disponer de muestras biológicas para poder realizar estos estudios genéticos. También es necesario recoger datos sobre su historial médico para obtener información que pudiera tener relevancia para nuestros estudios.

**2. IDENTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO:** Durante la intervención quirúrgica o la prueba diagnóstica a la que va a ser sometido en las instalaciones del CHGUV se tomarán muestras de sus tejidos y/o sangre. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente una parte de la muestra biológica sobrante de la intervención o prueba a una colección de muestras que se usará con fines de investigación biomédica, sin que esto suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. También es posible que le recojamos muestras biológicas que no requieran un procedimiento invasivo, como orina heces, saliva etc. o que el procedimiento de obtención sea mínimamente invasivo como una extracción de sangre. Las muestras que done se almacenarán en una colección de muestras que corresponden a una Línea de Investigación sobre Oncología Molecular, que se encuentra en las instalaciones de la FIHGUV y que cumple con los requerimientos establecidos en la normativa vigente.

Sus muestras solo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación avalados científicamente y que hayan sido evaluados y aprobados por el CEIC, en los que participen miembros del equipo investigador que forma parte de esta línea de investigación.

**3. OBJETIVO:** El Centro Sanitario en el que usted está siendo atendido/tratado, dispone de investigadores que desean recoger y almacenar sus muestras biológicas para poder realizar proyectos de investigación biomédica en el área de la Oncología. Los resultados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico, pronóstico y tratamientos.



**4. BENEFICIOS ESPERADOS:** Por su participación no percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas. Sin embargo, si las intervenciones que se pudieran realizar tuvieran éxito, podrían ayudar en el futuro a pacientes que tienen la misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares. Las muestras de los tejidos y/o sangre no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales. La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando por razones de salud puedan ser necesarias.

**5. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU REALIZACIÓN:** Sólo si usted lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado en el futuro para completar o actualizar la información con la que contamos relacionada con su enfermedad.

Es posible, que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Tiene derecho tanto a ser informado como a que no se le informe de los datos obtenidos en la investigación. A estos efectos se entenderá que no desea recibir tal información salvo que manifieste lo contrario, utilizando para ello el formulario que y se adjunta al presente documento.

**6. CONSECUENCIAS PREVISIBLES DE SU NO REALIZACIÓN Y DERECHO DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO.** La decisión de donar muestras biológicas es totalmente voluntaria, pudiendo negarse a donarlas e incluso pudiendo revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si decidiera revocar el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, será destruida o anonimizada. Tales efectos, no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se han llevado a cabo una vez haya revocado su consentimiento.

**7. RIESGOS.** El procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido para su salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad, puesto que se trata de muestras sobrantes de la intervención, muestras invasivas obtenidas durante los procedimientos de diagnóstico, o muestras de sangre extra que se han obtenido para ser utilizadas en investigación. En este último caso, la extracción de sangre, apenas tiene efectos secundarios, lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 o 2 días. En el caso de las muestras que requieren procedimientos más complejos o invasivos, estos sólo se realizarán si forman parte del procedimiento habitual que debe realizarse para su correcto diagnóstico o tratamiento de su enfermedad.

**8. PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES Y CONFIDENCIALIDAD.** Sus datos personales y de salud serán incorporados y tratados en una base de datos de la que es responsable el Investigador del Proyecto, que debe estar inscrita en un registro nacional dependiente del Instituto de Salud Carlos III y que debe cumplir con todos los requisitos legales. Sólo el INVESTIGADOR RESPONSABLE podrá relacionar estos datos con usted, siendo responsable de custodiar el documento de consentimiento y de garantizar el cumplimiento de su voluntad en relación al uso de la muestra biológica que usted cede para investigación. La información será procesada durante el análisis de los datos obtenidos y aparecerá en los informes y/o memorias de los proyectos derivados de la Línea de Investigación, aunque en ningún caso será posible identificarle, asegurando en todo momento el cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

La cesión de muestras así como de la información contenida en las bases de datos vinculadas a las mismas, solo se realizará si forman parte de la línea de investigación en la cual participan miembros del equipo investigador, realizándose un procedimiento de codificación previo, que consiste en desligar la información que le identifica sustituyéndola por un código.

Asimismo, el titular de los datos personales podrá ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición al tratamiento de datos de carácter personal, incluir alguna restricción sobre el uso de sus muestras, y ejercer los derechos de revocación del consentimiento (en este último caso, conforme al formulario que figura en el apartado 11) en los términos previstos en la normativa aplicable, dirigiendo al titular del centro el escrito correspondiente firmado por Ud. y copia de un documento acreditativo de su identidad.



**9. DESTINO DE LAS MUESTRAS TRAS FINALIZACION DE LA LÍNEA DE INVESTIGACION.** En el supuesto de finalización de la línea de investigación, es posible que existan muestras sobrantes. En relación a las mismas, se le ofrecen las siguientes opciones: a) la destrucción de la muestra sobrante, b) su utilización en otros proyectos de investigación biomédica, para lo cual, se le ofrece la opción de donar la muestra excedente al Biobanco del CHGUV (en el siguiente apartado le explicamos de manera resumida en que consiste un biobanco y cuáles son sus objetivos). En este caso, deberá marcar esta opción en el consentimiento incluido en este documento. En dicho consentimiento usted podrá escoger si desea que esta donación se haga codificada de forma que usted pueda conocer si lo desea los resultados de las investigaciones que se lleven a cabo, o anonimizada, si usted prefiere que nunca nadie pueda recobrar la relación entre sus muestras y su persona.

**10. BIOBANCO. DEFINICIÓN Y OBJETIVOS.** El Biobanco del CHGUV es un establecimiento público, sin ánimo de lucro, que acoge una colección organizada de muestras biológicas. Estas muestras almacenadas en el biobanco, tienen por finalidad ser utilizadas en proyectos de investigación biomédica que hayan sido aprobados por los comités ético y científico a los que esté adscrito el biobanco. Los resultados de las investigaciones realizadas con estas muestras pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico de las enfermedades o en nuevas formas de tratamientos de las mismas. Sus muestras seguirán almacenadas en el biobanco hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.



## 11. DECLARACIONES Y FIRMAS.

### Declaración del donante:

D./Dña \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ años de edad, con domicilio en \_\_\_\_\_, DNI \_\_\_\_\_ y nº de SIP \_\_\_\_\_

D./Dña \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ años de edad, con domicilio en \_\_\_\_\_, DNI \_\_\_\_\_ en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_ y nº de SIP \_\_\_\_\_

### DECLARO

Que he sido informado por el profesional de salud abajo firmante:

- Sobre las ventajas e inconvenientes del procedimiento
- Sobre el lugar de obtención, almacenamiento y proceso que sufrirán los datos personales y las muestras.
- Que mis muestras y datos personales serán tratados de acuerdo a la legislación vigente.
- Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación o anonimización de todos mis datos personales y muestras que permanezcan almacenadas. Esta eliminación no se extendería a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hubieran llevado a cabo
- Que en cualquier momento, yo, mi representante legal, o tutor, de conformidad con lo establecido en el artículo 4, punto 5 de la Ley 14/2007, de 3 de Julio, puedo solicitar información sobre los datos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas.
- Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas

### CONSIENTO

- Que el CHGUV y la FIHGUV, a través de los miembros del equipo investigador de la Línea de Investigación: "Oncología Molecular", utilicen mis datos y las muestras, incluyendo la información sobre mi salud, para investigaciones biomédicas dentro del marco de la línea de investigación antes mencionada, manteniendo siempre la confidencialidad de mis datos.
- Libre y voluntariamente en la donación voluntaria de: (márquese con una cruz lo que proceda)
 

<input type="checkbox"/> Mis tejidos excedentes	<input type="checkbox"/> Muestra de heces, orina o saliva
<input type="checkbox"/> Muestra de sangre	<input type="checkbox"/> Muestras obtenidas en procedimientos que sean necesario para el diagnóstico)
- Yo, mi representante legal o tutor, accedo (márquese sí o no) a que los miembros del equipo investigador puedan contactarme en el futuro en el caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos.
 

<input type="checkbox"/> Sí
<input type="checkbox"/> No
- Que en el supuesto de finalización de la línea de investigación, mis muestras sean (márquese con una cruz lo que proceda)
 

<input type="checkbox"/> destruidas
<input type="checkbox"/> cedidas al Biobanco del CHGUV y anonimizadas
<input type="checkbox"/> cedidas al Biobanco del CHGUV codificada, junto a los datos clínicos asociados.

D. Dña : \_\_\_\_\_ FIRMA: \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_\_

### DECLARACIÓN DEL PROFESIONAL DE SALUD:

He informado debidamente al donante:

Nombre facultativo: \_\_\_\_\_ DNI \_\_\_\_\_ Colegiado Nº \_\_\_\_\_

FIRMA : \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_\_



**12. REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO.**

Yo, D./Dña \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_ revoco el consentimiento prestado en fecha \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_ y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

Fdo: \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

Yo, D./Dña \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_ como representante legal de D./ Dña \_\_\_\_\_, con DNI \_\_\_\_\_ revoco el consentimiento prestado en fecha \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_ y no deseo proseguir la donación voluntaria, que doy con esta fecha por finalizada.

Fdo: \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_



**SOLICITUD DE INFORMACION DE DATOS O RESULTADOS DERIVADOS DE LAS INVESTIGACIONES**

<b>LÍNEA DE INVESTIGACIÓN</b>	Oncología Molecular
-------------------------------	---------------------

**PACIENTE:** \_\_\_\_\_

D./Dña _____, de ____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ y nº de SIP _____  D./Dña _____, de ____ años de edad, con domicilio en _____, DNI _____ _____ en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad) del paciente _____, con DNI _____ y nº de SIP _____
--

**SOLICITO**

Ser informado/a del resultado de las investigaciones realizadas con la/las muestra/s donada/s de manera voluntaria en fecha \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_ si éstas afectan a mi salud o a la de mi representado.

Fdo.: \_\_\_\_\_

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_

## 4. Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos

VISITA: _____ Fecha: _____ / _____ / _____ INICIALES: _____	ETIQUETA
---	----------

# CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS



<b>VISITA:</b> _____ Fecha: _____ / _____ / _____ INICIALES: _____	ETIQUETA
--	----------

### INSTRUCCIONES PARA EL/LA DIETISTA

El objetivo del cuestionario es calcular el número aproximado de veces que el voluntario consumió cada uno de los alimentos en el último año. Para ello, el cuestionario presenta unos recuadros dispuestos en columnas que tienen como encabezamientos las palabras: NUNCA, AÑO, MES, SEMANA Y DÍA.

Se debe estimar la frecuencia de consumo de cada alimento con un número, intentando reflejar aquella cifra que recoja mejor el promedio anual, es decir, las veces que por término medio consumió el alimento en cuestión en el último año. Se habla pues de promedio anual.

Así pues, si consumió habitualmente 3 tazas de leche entera todos los días del año pasado ponga en el recuadro correspondiente a DÍA el dígito 3.

Si no toma el alimento preguntado ponga una X en el recuadro correspondiente a la columna encabezada por la palabra NUNCA. Ej.: Si nunca tomó leche entera ponga una X en el recuadro correspondiente a NUNCA.

Intente ajustar, en la medida de lo posible, la cantidad consumida del alimento a las cantidades que de este aparezcan en el cuestionario. Tenga en cuenta que estas cantidades son raciones estándar, por tanto, si come el doble de lo considerado habrá que reflejarlo.

Ej.: si nos dice que siempre consume doble ración de pizza (en relación con el estándar) y que toma pizza 3 veces por semana, habrá que poner en el recuadro correspondiente a semana el dígito 6.

Ej.: si nos dice que toma una vez al día 50 mL de leche entera tendremos que escribir en la columna DÍA el dígito 0.25 (50mL/200mL).

Respecto a los alimentos de temporada o que sólo se consumen en ciertos períodos del año (por motivos económicos o de estacionalidad natural o cultural) anote en el recuadro que resulte más conveniente la frecuencia de consumo promedio anual.

Ej.: si nos dice que consume helados todos los días de los meses de Julio y Agosto, pondremos el dígito 60 en la columna AÑO (1 vez al día durante 2 meses, es decir, 60 veces al año).

Cuando sea difícil trasladar a un recuadro preciso el promedio de frecuencia del consumo determinado de un alimento, como en caso de consumo con variabilidad estacional compleja, se podrá utilizar el espacio inferior de cada recuadro para después de la entrevista calcular e integrar la respuesta. En otras palabras, en la fase de revisión del cuestionario por parte del encuestador, éste podrá anotar sin la presión de la necesidad de optimizar su tiempo de entrevista la frecuencia de consumo promedio del alimento en cuestión.

Si desea hacer cualquier aclaración sobre el alimento, indíquela en letra clara en el espacio inferior de cada recuadro.

#### Apartado V: Aceites y grasas

Usted debe intentar indicar la cantidad de veces que el individuo utiliza aceite para aliñar, es decir, cuántas cucharadas soperas al día (a la semana, al mes o al año) usa para aliñar sus platos. En un segundo apartado deberá indicar cuántas veces al día (a la semana, al mes o al año) toma guisos/cocidos/sofritos, cuántas toma fritos y cuántas rebozados. Deberá siempre adaptar el tamaño de la ración consumida por el paciente. Indique también qué tipo de aceite o grasa es el que utiliza habitualmente el individuo para cada una de las cocciones.

**PARA QUE LA PERSONA ENTREVISTADA ENTIENDA CÓMO CONTESTAR ESTE CUESTIONARIO SERÍA CONVENIENTE COMENZAR CON UNA FRASE COMO LA SIGUIENTE:**

*Yo le iré diciendo diferentes alimentos y usted me dirá con qué frecuencia los toma: si no los toma NUNCA, o bien cada cuanto los toma, si cada DÍA (y el número de veces) o cada SEMANA (y el número de veces) o cada MES (y el número de veces) o cada AÑO. Si sólo los toma en determinadas épocas o circunstancias, también me lo debe indicar.*

<b>VISITA:</b> _____ <b>Fecha:</b> _____/_____/_____ <b>INICIALES:</b> _____	ETIQUETA
--	----------

**CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS\***

©JM MARTÍN-MORENO y cols. 1997.

VISITA INICIAL

OTRAS VISITAS

Fecha de cumplimentación: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

**IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE**

Iniciales paciente:

Centro:

Nº de Paciente:

1. ¿Ha cambiado su alimentación durante el último año? Sí  NO

\*Versión actualizada del Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos: Martín-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernández-Rodríguez JC, Salvini S, Willet WC. Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. Int J Epidemiol 1993; 22: 512-519.

Modificado por Salas-Salvadó J y Megias-Rangil I, 2002.

<b>VISITA:</b> _____ Fecha: _____ / _____ / _____ INICIALES: _____	ETIQUETA
--	----------

<b>I - LÁCTEOS</b>		USO PROMEDIO ANUAL				
ALIMENTOS - CANTIDADES		Nunca	Año	Mes	Sem.	Día
1	Leche (1 taza, 200 cc) .....					
2	Yoghurt (1, 125 g) .....					
3	Queso (1 porción, 20 g).....					
4	Otros productos lácteos: Natillas, flan, cuajada (1 porción o ración, 135 g) .....					
5	Leche tipo FLORA (1 taza, 200 cc).....					

<b>II - HUEVOS, CARNES Y PESCADOS</b>		USO PROMEDIO ANUAL				
<small>(Un plato o ración de 130 g, excepto cuando se indica)</small>		Nunca	Año	Mes	Sem.	Día
ALIMENTOS - CANTIDADES		Nunca	Año	Mes	Sem.	Día
1	Huevos de gallina (uno, 60 g) .....					
2	Carnes blancas (pollo, pavo, conejo, etc.) (1 ración o pieza).....					
3	Carnes rojas (cerdo, cordero, vaca, etc.) (1 ración).....					
4	Carnes procesadas: jamón, chorizo, salchichón, mortadela, sobrasada, morcilla (50 g) ..					
5	Pescado (1 plato o ración).....					
6	Hígado / otras vísceras (riñones, sesos, corazón, molleja) (70 g) .....					
7	Moluscos y crustáceos: almejas, mejillones, gambas, langostino, pulpo, calamares (1 ración, 50 g, peso neto) .....					

<b>VISITA:</b> _____ <b>Fecha:</b> _____/_____/_____ <b>INICIALES:</b> _____	<b>ETIQUETA</b>
--	-----------------

<b>III - VERDURAS Y HORTALIZAS</b>		<b>USO PROMEDIO ANUAL</b>				
<small>(Un plato o ración de 130 g, excepto cuando se indica)</small>		<b>Nunca</b>	<b>Año</b>	<b>Mes</b>	<b>Sem.</b>	<b>Día</b>
<b>ALIMENTOS - CANTIDADES</b>						
1	Lechuga, endibias, escarola (1 ración o plato, 70 g) .....					
2	Acelgas o espinacas .....					
3	Col, coliflor, o brécoles .....					
4	Tomate (1 unidad pequeña, 130 g) .....					
5	Judías verdes .....					
6	Berenjenas, calabacines, calabaza .....					
7	Pepinos, zanahoria (1 ración, 50 g) .....					
8	Pimiento (1 ración, 100 g) .....					
9	Patatas asadas, cocidas o fritas (1 ración, 150 g) .....					
10	Patatas fritas de bolsa (1 ración, 30 g) .....					
11	Champiñones, setas o niscalos (1 ración de acompañamiento, 100 g) .....					
12	Gazpacho andaluz (1 vaso, 200 cc) .....					

<b>IV - LEGUMBRES Y CEREALES</b>		<b>USO PROMEDIO ANUAL</b>				
<small>(Un plato o ración de 130 g, excepto cuando se indica)</small>		<b>Nunca</b>	<b>Año</b>	<b>Mes</b>	<b>Sem.</b>	<b>Día</b>
<b>ALIMENTOS - CANTIDADES</b>						
1	Lentejas, garbanzos, alubias o guisantes (1 plato, 100 g en seco).....					
2	Pan (3 rebanadas, 60 g) .....					
3	Cereales desayuno (30 g en seco) .....					
4	Arroz blanco (75 g en seco) .....					
5	Pasta: macarrones, espaguetis, etc. (75 g en seco) .....					
6	Pizza (1 ración, 175 g) .....					

<b>VISITA:</b> _____ Fecha: _____ / _____ / _____ INICIALES: _____	ETIQUETA
--	----------

V - ACEITES Y GRASAS									
(Una cucharada sopera, excepto cuando se especifique)					USO PROMEDIO ANUAL				
ALIMENTOS - CANTIDADES					Nunca	Año	Mes	Sem.	Día
1	Aceite, especifique.....								
2	Margarina o Mantequilla (1 tarrina individual, 10 g).....								
3	Manteca (1 porción de 10 g).....								
4	Nata o crema de leche (20 mL).....								

VI - PRECOCINADOS O PREELABORADOS									
					USO PROMEDIO ANUAL				
ALIMENTOS - CANTIDADES					Nunca	Año	Mes	Sem.	Día
1	Croquetas, buñuelos, empanadillas (cuatro unidades, 120 g) (1u = 30 g).....								
2	Palitos de merluza, pescado empanado (cuatro unidades palitos, 100 g).....								
3	Filetes de pollo empanados, Sanjacobo (una pieza, 75 g).....								
4	Sopas y cremas de sobre (1 plato o sobre, 200 g de sopa).....								

VII - FRUTAS Y ALIMENTOS RELACIONADOS									
					USO PROMEDIO ANUAL				
ALIMENTOS - CANTIDADES					Nunca	Año	Mes	Sem.	Día
1	Frutas frescas, especifique.....								
2	Frutas en conserva - en almibar o en su jugo - (2 unidades, 100 g).....								
3	Frutos secos, especifique (50 g).....								

VIII - BOLLERÍA Y PASTELERÍA									
					USO PROMEDIO ANUAL				
ALIMENTOS - CANTIDADES					Nunca	Año	Mes	Sem.	Día
1	Galletas.....								
2	Pasteles o Bollería.....								
3	Churros, porras y similares).....								
4	Chocolates.....								

<b>VISITA:</b> _____ Fecha: _____/_____/_____ INICIALES: _____	ETIQUETA
--	----------

<b>IX - BEBIDAS</b>									
ALIMENTOS - CANTIDADES					USO PROMEDIO ANUAL				
					Nunca	Año	Mes	Sem.	Día
1	Bebidas carbonatadas tipo Coca-cola (1 bot., 200 cc) .....								
2	Bebidas no carbonatadas - refrescos sin burbujas (1 bot., 200 cc) (Aquarius, Trínaranjus) .....								
3	Zumos de frutas (1 vaso, 200 cc) .....								
4	Café (1 taza, 50 cc) .....								
5	Cerveza (1 mediana, 250 cc) .....								
6	Licores o anisetes (1 copa, 50 cc) .....								
7	Vino .....								

<b>X - MISCELÁNEOS</b>									
ALIMENTOS - CANTIDADES					USO PROMEDIO ANUAL				
					Nunca	Año	Mes	Sem.	Día
1	Salsas ( Mayonesa, tomateoketchup, Mostaza ,etc) (1 cucharadasopera, 20 g) .....								
2	Sal (una pizca) .....								
3	Azúcar (1 cucharadita, 5 g) .....								
4	Miel (1 cucharadita, 10 g) .....								
5	Mermeladas o confituras (1 cucharadita, 10 g) .....								
6	Picante (tabasco...) (Media cucharadita) .....								

<b>VISITA:</b> _____ Fecha: _____/_____/_____ INICIALES: _____	ETIQUETA
--	----------

<b>XI -VITAMINAS</b>	
Durante el año pasado, ¿ha tomado vitaminas o minerales?    Sí            NO	
Ponga la marca de las vitaminas v/o minerales que usted toma habitualmente y cantidad al día (si es posible):	
<div style="border: 1px solid gray; height: 100px;"></div>	

<b>XII-ANTIBIOTICO</b>	
Durante los últimos tres meses, ¿ha tomado antibióticos?    Sí            NO	
Ponga el tipo de antibiótico que usted toma y cantidad (si es posible):	
<div style="border: 1px solid gray; height: 100px;"></div>	

## 5. Financiación

Esta tesis fue financiada por las siguientes instituciones:

- Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer: CB1612-00350
- Instituto de Salud Carlos III: PI18/00266
- Beca China Scholarship Council (CSC)

## 6. Comunicaciones a congresos derivadas de la tesis doctoral

Nombre del congreso: ESMO 2020 Congress

Título del trabajo: Effect of gut microbiota on immunotherapy of advanced NSCLC

Tipo de participación: póster

Autor: **Feiyu Zhang**, Ning Dong, Macarena Ferrero Gimeno, Sandra Gallach, Marina Meri, Francisco Aparisi, Ana Blasco, Clara García González, Silvia Calabuig-Fariñas, Mariana Reyes-Prieto, Giuseppe D'Auria, Rafael Sirera Perez, Eloísa Jantus-Lewintre, Carlos Camps

Ciudad de celebración: virtual congress

Fecha de celebración: 19-21 de septiembre de 2020

Nombre del congreso: SEOM 2020

Título del trabajo: Búsqueda de biomarcadores predictivo/pronósticos en la microbiota intestinal de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) avanzado tratados con inmunoterapia

Tipo de participación: póster



Autor: **Feiyu Zhang**, Ning Dong, Macarena Ferrero Gimeno, Silvia Calabuig-Fariñas, Sandra Gallach, Andrea Moreno, Marina Meri, Clara González, Francisco Aparisi, Ana Blasco, Mariana Reyes, Giuseppe D'Auria, Rafael Sirera Pérez, Eloísa Jantus-Lewintre, Carlos Camps.

Ciudad de celebración: virtual congress

Fecha de celebración: 20-23 de octubre de 2020

Nombre del congreso: XIII Congress on Lung Cancer

Título del trabajo: Characterization of gut microbiota in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with immune checkpoints blockers

Tipo de participación: póster

Autor: **Feiyu Zhang**, Ning Dong, Alejandro Herreros, Silvia Calabuig-Fariñas, Sandra Gallach, Marais Mosqueda, Eva Escorihuela, Macarena Ferrero Gimeno, Marina Meri, Francisco Aparisi, Ana Blasco, Eloísa Jantus-Lewintre, Carlos Camps

Ciudad de celebración: Valencia

Fecha de celebración: 21 y 22 de noviembre de 2019

Nombre del congreso: II Encuentro de Jóvenes Investigadores de CIBERONC

Título del trabajo: Characterization of gut microbiota in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with immune checkpoints blockers

Tipo de participación: póster

Autor: **Feiyu Zhang**, Ning Dong, Alejandro Herreros, Silvia Calabuig-Fariñas, Sandra Gallach, Marais Mosqueda, Eva Escorihuela, Macarena Ferrero Gimeno, Marina Meri, Francisco Aparisi, Ana Blasco, Eloísa Jantus-Lewintre, Carlos Camps

Ciudad de celebración: Madrid

Fecha de celebración: 27 de noviembre de 2019

Nombre del congreso: 2nd ASEICA Educational Symposium

Título del trabajo: Analysis of gut microbiota in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with immunecheckpoints blockers

Tipo de participación: póster

Autor: **Zhang, Feiyu**; Dong, Ning; Herreros, Alejandro; Calabuig, Silvia; Gallach, Sandra; Mosqueda, Marais; Escorihuela, Eva; Meri, Marina; Aparisi, Francisco; Blasco, Ana; Jantus-Lewintre, Eloísa; Camps, Carlos

Ciudad de celebración: Madrid

Fecha de celebración: 28 y 29 de noviembre de 2019

Nombre del congreso: ESMO 2019 Congress

Título del trabajo: 1911P: Analysis of gut microbiota in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with immune-checkpoints blockers

Autor: **Zhang, Feiyu**; Dong, Ning; Herreros, Alejandro; Calabuig, Silvia; Gallach, Sandra; Mosqueda, Marais; Escorihuela, Eva; Meri, Marina; Aparisi, Francisco; Blasco, Ana; Jantus-Lewintre, Eloísa; Camps, Carlos

Tipo de participación: Participativo – Póster. Artículo científico *Annals of Oncology*, V 30, Sup 5, October 2019, Page v773. ISSN 09237534 DOI: [https://doi.org/10,1093/annonc/mdz268,038](https://doi.org/10.1093/annonc/mdz268,038)

Ciudad de celebración: Barcelona

Fecha de celebración: 27 de septiembre - 1 de octubre de 2019

Nombre del congreso: SEOM 2019

Título del trabajo: Análisis de la microbiota intestinal en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) avanzados tratados con inhibidor de los Immune checkpoints (ICB)

Tipo de participación: comunicación oral

Autor: **Feiyu Zhang**, Ning Dong, Sandra Gallach, Silvia Calabuig-Fariñas, Marais Mosqueda, Eva Escorihuela, Marina Meri, Francisco De Asís, Eloísa Jantus-Lewintre, Carlos Camps

Ciudad de celebración: Pamplona

Fecha de celebración: 23-25 de octubre de 2019

## 7. Publicación derivada de la tesis doctoral

Feiyu Zhang, Macarena Ferrero, Ning Dong, Giuseppe D'Auria, Mariana Reyes-Prieto, Alejandro Herreros-Pomares, Silvia Calabuig-Fariñas, Elena Duréndez, Francisco Aparisi, Ana Blasco, Clara García, Carlos Camps, Eloísa Jantus-Lewintre, Rafael Sirera. **Analysis of the Gut Microbiota: An Emerging Source of Biomarkers for Immune Checkpoint Blockade Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer.** *Cancers*. 21 May 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13112514>. IF: 6.639.



Article

### Analysis of the Gut Microbiota: An Emerging Source of Biomarkers for Immune Checkpoint Blockade Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer

Feiyu Zhang <sup>1</sup>, Macarena Ferrero <sup>1,2,3</sup>, Ning Dong <sup>1</sup>, Giuseppe D'Auria <sup>4,5</sup>, Mariana Reyes-Prieto <sup>4,6</sup>, Alejandro Herreros-Pomares <sup>1,3</sup>, Silvia Calabuig-Fariñas <sup>1,2,3,7</sup>, Elena Duréndez <sup>1,2,3</sup>, Francisco Aparisi <sup>8</sup>, Ana Blasco <sup>2,3,9</sup>, Clara García <sup>9</sup>, Carlos Camps <sup>1,2,3,9,10</sup>, Eloísa Jantus-Lewintre <sup>1,2,3,11,\*</sup> and Rafael Sirera <sup>2,3,11,\*</sup>

- <sup>1</sup> Molecular Oncology Laboratory, Fundación Investigación, Hospital General Universitario de Valencia, 46014 Valencia, Spain; zfei@alumni.uv.es (F.Z.); ferrero\_mac@gva.es (M.F.); dongning@alumni.uv.es (N.D.); alherpo@etsiamn.upv.es (A.H.-P.); calabuix\_sil@gva.es (S.C.-F.); medusae@posgrado.upv.es (E.D.); camps\_car@gva.es (C.C.)
- <sup>2</sup> Unidad Mixta TRIAL, Centro Investigación Príncipe Felipe—Fundación Investigación, Hospital General Universitario de Valencia, 46014 Valencia, Spain; blasco\_ana@gva.es
- <sup>3</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red Cáncer, CIBERONC, 28029 Madrid, Spain
- <sup>4</sup> Sequencing and Bioinformatics Service, Fundació per al Foment de la Investigació Sanitària i Biomèdica de la Comunitat Valenciana, FISABIO, 46020 Valencia, Spain; dauria\_giu@gva.es (G.D.); reyes\_ber@gva.es (M.R.-P.)
- <sup>5</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red Epidemiología y Salud Pública, CIBERESP, 28029 Madrid, Spain
- <sup>6</sup> Evolutionary Genetics, Institute for Integrative Systems Biology, University of Valencia and Spanish Research Council, 46980 Valencia, Spain
- <sup>7</sup> Department of Pathology, Universitat de València, 46010 Valencia, Spain
- <sup>8</sup> Department of Medical Oncology, Hospital General de Requena, 46340 Valencia, Spain; aparisi\_fraapa@gva.es
- <sup>9</sup> Department of Medical Oncology, Hospital General Universitario de Valencia, 46014 Valencia, Spain; garcia\_clagon@gva.es
- <sup>10</sup> Department of Medicine, Universitat de València, 46010 Valencia, Spain
- <sup>11</sup> Department of Biotechnology, Universitat Politècnica de València, 46022 Valencia, Spain
- \* Correspondence: jantus\_elo@gva.es (E.J.-L.); rsirera@btc.upv.es (R.S.)



**Citation:** Zhang, F.; Ferrero, M.; Dong, N.; D'Auria, G.; Reyes-Prieto, M.; Herreros-Pomares, A.; Calabuig-Fariñas, S.; Duréndez, E.; Aparisi, F.; Blasco, A.; et al. Analysis of the Gut Microbiota: An Emerging Source of Biomarkers for Immune Checkpoint Blockade Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers* **2021**, *13*, 2514. <https://doi.org/10.3390/cancers13112514>

Academic Editor: Viviana Bazan

Received: 22 April 2021

Accepted: 17 May 2021

Published: 21 May 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** The immune checkpoint blockade (ICB), and concretely the blockade of the PD1/PDL1 axis, has opened up a new standard of treatment for non-small cell lung cancer (NSCLC). However, despite substantial advances in clinical care, many patients still remain refractory to these therapies. Biomarkers such as PD-L1 expression and tumor mutational burden have been associated with ICB efficacy, but the mechanisms underlying variable responses are not yet fully understood. Recently, the differential composition of the gut microbiota was studied as one of the variables accounting for interpatient heterogeneity in ICB responses. To better understand the potential role of the gut microbiota as a biomarker for immunotherapy, we prospectively collected microbiota samples from advanced NSCLC patients starting treatment with ICB. The identification of certain bacteria genera associated with clinical outcomes to ICB in NSCLC may provide novel potential predictive and prognostic biomarkers useful for patient selection and therapy optimization.

**Abstract:** Background: The human gut harbors around  $10^{13}$ – $10^{14}$  microorganisms, collectively referred to as gut microbiota. Recent studies have found that the gut microbiota may have an impact on the interaction between immune regulation and anti-cancer immunotherapies. Methods: In order to characterize the diversity and composition of commensal microbiota and its relationship with response to immune checkpoint blockade (ICB), 16S ribosomal DNA (rDNA) sequencing was performed on 69 stool samples from advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients prior to treatment with ICB. Results: The use of antibiotics and ICB-related skin toxicity were significantly associated with reduced gut microbiota diversity. However, antibiotics (ATB) usage was not related to low ICB efficacy. *Phascolarctobacterium* was enriched in patients with clinical benefit and correlated with prolonged progression-free survival, whereas *Dialister* was more represented in patients with progressive disease, and its higher relative abundance was associated with reduced progression-free survival and overall survival, with independent prognostic value in multivariate analysis.

**Conclusions:** Our results corroborate the relation between the baseline gut microbiota composition and ICB clinical outcomes in advanced NSCLC patients, and provide novel potential predictive and prognostic biomarkers for immunotherapy in NSCLC.

**Keywords:** gut microbiota; biomarker; non-small cell lung cancer; immune checkpoint blockade; immunotherapy; next-generation sequencing

## 1. Introduction

Lung cancer is one of the most lethal cancers worldwide [1,2]. Non-small cell lung cancer (NSCLC) constitutes approximately 85% of all lung cancers and includes adenocarcinoma, squamous cell carcinoma (SCC), and large cell carcinoma as the main histological subtypes [3,4]. The treatment of NSCLC has changed in recent years with the initial success of immunotherapy, especially that based on immune checkpoint blockade (ICB) with monoclonal antibodies against cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) or programmed cell death protein 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1). The PD-1/PD-L1 axis has been demonstrated to influence the balance between tumor immune surveillance and immune resistance. In this sense, elevated PD-L1 expression on tumor cells results in T cell exhaustion, thereby attenuating tumor-specific immunity and promoting tumor progression [5]. Anti-PD-1 (nivolumab, pembrolizumab, cemiplimab) and anti-PD-L1 antibodies (atezolizumab, avelumab, durvalumab) are on the list of approved agents for different types of cancer, including NSCLC [6–8]. Clinical responses to treatment with ICB are usually durable, and the overall response rate in advanced NSCLC is around 15–30% [9–13]. However, despite substantial clinical advance, many patients do not benefit from these therapies and, therefore, identification of biomarkers to expand therapeutic efficacy of ICB is a priority. The expression of PD-L1 is currently the most extended and widely employed predictive biomarker for both PD-1 and PD-L1 blockade in NSCLC [14]. However, the use of this biomarker still presents unresolved issues, including temporal and spatial expression heterogeneity as well as variable quantitative scores and cutoffs within and across tumor types, which may exclude a considerable number of responders [15,16]. More recently, tumor mutational burden (TMB), defined as the number of non-synonymous mutations per coding area of tumor genome, has become a useful predictive marker for ICB effectiveness, regardless of PD-L1 expression, in different types of solid tumors, including NSCLC [17,18]. Nonetheless, some caveats, such as unclear thresholds for positive results along studies and tumor histologies, limited data providing significant correlation between higher TMB and improved overall survival, and the fact that not all patients with high TMB derive benefit from ICB, indicate that this biomarker alone is not the perfect predictor for immunotherapy [19]. Moreover, TMB determination by next-generation sequencing is often challenging because of the difficulty to obtain tumor tissue in many of the cases. In this sense, assessment of TMB in liquid biopsies and cytological specimens represent promising alternatives. Interestingly, it has been demonstrated that performing TMB evaluation on cytological samples with TMB values comparable to those obtained in histologically matched samples is technically feasible [20]. However, these findings need to be confirmed in large-scale studies and are still under investigation to accurately direct therapeutic decisions.

On the other hand, immune-related adverse events (irAEs) also remain an important therapeutic problem for immunotherapy usage. A systematic review of 5744 NSCLC patients treated with anti-PD-1/PD-L1 reports an overall adverse events incidence of 64% for anti-PD-1 and 66% for anti-PD-L1 agents [21]. IrAEs can involve any organ or system, and endocrine, dermatological, and gastrointestinal toxicities are the most common irAEs associated with anti-PD-1/PD-L1 in NSCLC patients [22]. Currently, predictive biomarkers for these irAEs to facilitate the use of ICB in the clinical setting are not available. Taking into consideration the evidence, identification of new reliable biomarkers to guide

patient selection and provide indications of efficacy and/or toxicity for ICB therapies is of utmost importance.

Most recent research has been focused on the potential use of the gut microbiota as a biomarker for immunotherapy response. The human gut houses more than  $10^{13}$  microorganisms [23], and the collection of these microorganisms is commonly termed gut microbiota. Abnormal composition of the gut microbiota has been proven to be related to many diseases, including inflammatory bowel disease and metabolic diseases [24,25]. Recently, there is an emerging idea of the systemic influence of the gut microbiota, and the “gut–lung” axis hypothesis supports the importance of a healthy gut microbiota to produce effective immune responses in the lung. Moreover, the impact of the microbiota on cancer and cancer treatment is an emerging area of great interest [26,27]. In the era of novel immune-modulating agents, differential composition of the gut microbiota has been studied as one of the variables accounting for interpatient heterogeneity in ICB responses [28–32]. Additionally, lung cancer patients are frequently treated with antibiotics (ATB) and this intervention could modify or unbalance the gut microbiota. In this regard, the impact of ATB on the clinical outcomes of patients treated with ICB should be a priority area of research [33,34].

Preclinical mouse models have highlighted that the therapeutic efficacy of immunotherapy is strongly dependent on the gut microbiota. In this scenario, *Bacteroides fragilis* has been confirmed to be related to higher anti-CTLA-4 treatment efficiency by regulating the function of dendritic cells and differentiation of T helper cells [35]. *Bifidobacterium spp.* and *Akkermansia muciniphila* have been associated with efficacy of anti-PD-1/PD-L1 treatment by increasing the function of dendritic cells, and enhancing activation and recruitment of CD4+ and CD8+ T cells into the tumor microenvironment [29,30,36]. A defined combination of 11 microbial strains has been associated with high colon interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) production by CD8+ T cells and correlated with enhanced therapeutic efficacy of ICB in mouse tumor models [37]. Moreover, microbiota-derived end product metabolites from dietary fermentation, such as short-chain fatty acids (SCFAs), have been confirmed to influence the ICB clinical outcome by regulating the immune response [38,39]. In addition to the role in shaping systemic immune responses to ICB, the gut microbiota may also influence the emergence of irAEs, and its modification has been demonstrated to ameliorate certain adverse events, particularly colitis [28,40,41].

To better understand the potential role of the gut microbiota as a biomarker for immunotherapy, we sequenced the 16S ribosomal DNA (rDNA) gene in stool samples from 69 advanced NSCLC patients starting ICB. We compared gut microbiota diversity and composition among patients with clinical benefit and patients experiencing progression disease, and evaluated the correlation of specific taxonomic genera with survival indicators. The identification of determined genera, concretely *Phascolarctobacterium* and *Dialister*, associated with clinical outcomes of advanced NSCLC patients undergoing ICB might provide novel potential predictive/prognostic biomarkers useful for patient selection and therapy optimization. In addition, we studied the gut microbiota composition in patients who developed immune-related toxicities, observing that *Bacteroides dorei* was enriched in samples from patients with skin toxicity, whereas bacteria from the *Firmicutes* phylum and *Bacteroides vulgatus* were predominant in patients who did not experience dermatological toxicity. Importantly, our results did not reveal any relationship between ATB usage and diminished response to or survival from ICB immunotherapy.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Patient Cohort

A total of 69 patients with advanced NSCLC were included in this prospective study. Eligible patients did not harbor epidermal growth factor receptor (*EGFR*) and anaplastic lymphoma kinase (*ALK*) gene mutations within the tumors, and did not receive previous targeted therapy. Based on the absolute number of white blood cells (leukocytes, lymphocytes, neutrophils, and monocytes), determined by routine blood testing, the vast

majority of patients presented an adequate immune status to receive immunotherapy. All patients were treated with ICB at the General University Hospital Consortium of Valencia between November 2017 and June 2019. The patients received ICB monotherapy, including nivolumab (3 mg/kg, once every 2 weeks), pembrolizumab (2 mg/kg, once every 3 weeks), or atezolizumab (1200 mg, once every 3 weeks). Evaluation of ICB treatment efficacy was done according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumors version 1.1 (RECIST 1.1) [42]. The patients were classified into two groups: clinical benefit (CB) group (complete response, partial response, and stable disease lasting more than 6 months) and progression disease (PD) group (progressive disease and stable disease lasting less than 6 months).

This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki for research involving human subjects. All patients enrolled signed a voluntary informed consent for fecal sample collection and study under the approved protocols of the Clinical Research Ethics Committee of the present institution (General University Hospital Consortium of Valencia).

## 2.2. Sample Collection

Stool samples from 69 NSCLC patients were collected with EasySampler-Complete Stool Collection Kit (ALPCO, Salem, NH, USA). All patients were provided with stool sample containers and completed their depositions at home within 3 days before ICB treatment initiation. The samples were brought to the laboratory within 6 h after collection and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until processing.

## 2.3. DNA Extraction and 16S rDNA Gene Sequencing

QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used for genomic DNA extraction from stool samples, according to the manufacturer's protocol.

Isolated DNA was sent to the Sequencing and Bioinformatics Service of the Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research of Valencia Region (FISABIO) for sequencing. In more detail, the 16S rDNA gene V3-V4 hypervariable region was amplified using the primers described by Klindworth et al. [43] and then processed using 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Illumina protocol (Cod. 15044223 Rev. A, Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). The full-length primer sequences including Illumina adaptors were as follows: forward: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-CTACGGGNGGCWGCAG, and reverse: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC. Microbial genomic DNA (5 ng/ $\mu\text{L}$  in 10 mM Tris, pH 8.5) was used to start the polymerase chain reaction (PCR) protocol. After 16S rDNA gene amplification, the multiplexing step was performed using Nextera XT Index Kit (FC-131-2001). A volume of 1  $\mu\text{L}$  of the PCR product was run on a Bioanalyzer DNA 1000 chip to verify the size, being the expected size on a Bioanalyzer trace of  $\sim 550$  bp. After size verification the libraries were sequenced using a  $2 \times 300$  pb paired-end run (MiSeq Reagent kit v3 (MS-102-3003)) on a MiSeq sequencer, according to the manufacturer's instructions (Illumina).

## 2.4. Bioinformatic Analysis and Taxonomic Annotation

Amplicon sequences were processed using the QIIME2 pipeline [44]. The DADA2 pipeline was employed for denoising, paired-end joining, and chimera depletion from paired-end data [45]. Taxonomic affiliations were assigned using the Naive Bayesian classifier integrated in QIIME2 plugins. The SILVA release 132 database was used for taxonomic assignment [46]. The taxonomic composition of the gut microbiota was generated by different levels: kingdom, phylum, class, order, family, genus, and species. Alpha-diversity was estimated by Chao 1 richness, Shannon, or inverse Simpson diversity indices, according to the proportion of taxa counts within the QIIME2 pipeline.

### 2.5. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 24.0 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA), GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Inc., Redmond, WA, USA) or R software v.4.0.3 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Chi-squared test and nonparametric tests (Mann–Whitney *U* or Kruskal–Wallis) were applied to evaluate associations between patient clinico-pathological characteristics and microbiota composition. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) was used to compare compositional differences between groups. Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) was performed to study the differential abundance analysis of gut microbiota composition [47]. Progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) estimations were performed by the Kaplan–Meier method and compared with the log-rank test. Hazard ratios and 95% confidence intervals were calculated by the Cox regression model. Multivariate Cox regression analysis was conducted to further identify independent prognostic factors associated with PFS and OS. All results were accepted statistically if *p*-value < 0.05.

## 3. Results

### 3.1. Baseline and Sequencing Characteristics

The clinico-pathological characteristics of the 69 advanced NSCLC patients included in this study are shown in Table S1. The median age in this cohort was 67, 23.2% of the patients were prescribed ATB within 3 months before ICB treatment, 66.7% presented PD-L1-positive expression (TPS  $\geq$  1%), and 53.6% were treated with ICB in first-line setting. The median follow-up time was 14.3 months, and according to response, 33 (47.8%) patients were classified in the clinical benefit (CB) group and 36 (52.2%) in the progression disease (PD) group. Correlation analysis revealed that gender, body mass index, and PD-L1 expression were clinical factors associated with response to ICB in this cohort (Table 1). Univariate Cox regression analysis evidenced that PFS was significantly shorter in women, patients with poor Eastern cooperative oncology group (ECOG) performance status, and patients with low PD-L1 expression, whereas prolonged OS was observed in patients with high body mass index (Table S2).

Barcoded 16S rDNA amplicon sequencing of the 69 stool samples yielded a total of 10,553,396 reads and 7,435,908 (70.5%) effective reads after filtering, with a median of 106,425 reads per sample (range 39,672–395,132). An overview of the sequencing information and microbiota diversity indices, including Chao 1 (range 42–274), Shannon (range 1.78–4.30), and inverse Simpson (range 3.32–42.93), of 69 advanced NSCLC patients in our cohort are shown in Table S3. A total of 851 taxa were obtained, and at the genus level, *Bacteroides* was the most frequent genus among the 357 genera detected in this study (median relative abundance: 28%) (Figure 1).

### 3.2. Impact of ATB Usage on the Diversity and Composition of the Gut Microbiota

To study the complexity of the microbiota community structure within the samples, we determined alpha-diversity scores for all patients (Table S3) and found that patients receiving ATB within 3 months before ICB treatment (16/69, 23.2%) significantly exhibited lower Chao 1 index (*p* = 0.040) (Figure 2a and Table S4), indicating a certain grade of dysbiosis. Compositional analysis by linear discriminant analysis of effect size (LEfSe) revealed that feces samples of patients without ATB treatment were enriched with the genus *Alistipes*, whereas the family *Veillonellaceae* was predominant in the ATB group, among other taxa (Figure 2b,c).

**Table 1.** Baseline clinico-pathological characteristics of patients and correlation with response to ICB.

Characteristics	Total (n = 69)	CB (n = 33)	PD (n = 36)	p-Value
Age				
≤66	34 (49.3%)	14 (42.4%)	20 (55.6%)	0.276
>66	35 (50.7%)	19 (57.6%)	16 (44.4%)	
Gender				
Male	49 (71.0%)	28 (84.8%)	21 (58.3%)	<b>0.015</b>
Female	20 (29.0%)	5 (15.2%)	15 (41.7%)	
Smoking status				
Smoker	47 (68.1%)	22 (66.7%)	25 (69.4%)	0.805
Non-smoker	22 (31.9%)	11 (33.3%)	11 (30.6%)	
Body mass index				
High (≥25)	32 (46.4%)	20 (60.6%)	12 (33.3%)	<b>0.035</b>
Low (<25)	33 (47.8%)	12 (36.4%)	21 (58.3%)	
Non-specified	4 (5.8%)	1 (3.0%)	3 (8.4%)	
Antibiotics previous				
Yes	16 (23.2%)	7 (21.2%)	9 (25.0%)	0.710
No	53 (76.8%)	26 (78.8%)	27 (75.0%)	
ECOG performance status				
0–1	63 (91.3%)	32 (97.0%)	31 (86.1%)	0.110
≥2	6 (8.7%)	1 (3.0%)	5 (13.9%)	
Stage				
III	12 (17.4%)	8 (24.2%)	4 (11.1%)	0.151
IV	57 (82.6%)	25 (75.8%)	32 (88.9%)	
Histology				
Adenocarcinoma	32 (46.4%)	14 (42.4%)	18 (50.0%)	0.528
Non-adenocarcinoma	37 (53.6%)	19 (57.6%)	18 (50.0%)	
PD-L1				
Positive (TPS ≥ 1%)	46 (66.7%)	26 (78.8%)	20 (55.6%)	<b>0.034</b>
Negative (TPS < 1%)	21 (30.4%)	6 (18.2%)	15 (41.7%)	
Non-specified	2 (2.9%)	1 (3.0%)	1 (2.8%)	
Immunotherapy				
1st line	37 (53.6%)	20 (60.6%)	17 (47.2%)	0.265
Non-1st line	32 (46.4%)	13 (39.4%)	19 (52.8%)	
Tumor size				
≤5 cm	16 (23.2%)	10 (30.3%)	6 (16.7%)	0.180
>5 cm	53 (76.8%)	23 (69.7%)	30 (83.3%)	
Number of metastatic sites				
<2	27 (39.1%)	16 (48.5%)	11 (30.6%)	0.127
≥2	42 (60.9%)	17 (51.5%)	25 (69.4%)	

Non-smoker: never smoker + former smoker; ECOG: Eastern cooperative oncology group; TPS: tumor proportion score. p-values were obtained using the chi-square test. Bold p-values denote statistical significance at the  $p < 0.05$  level.



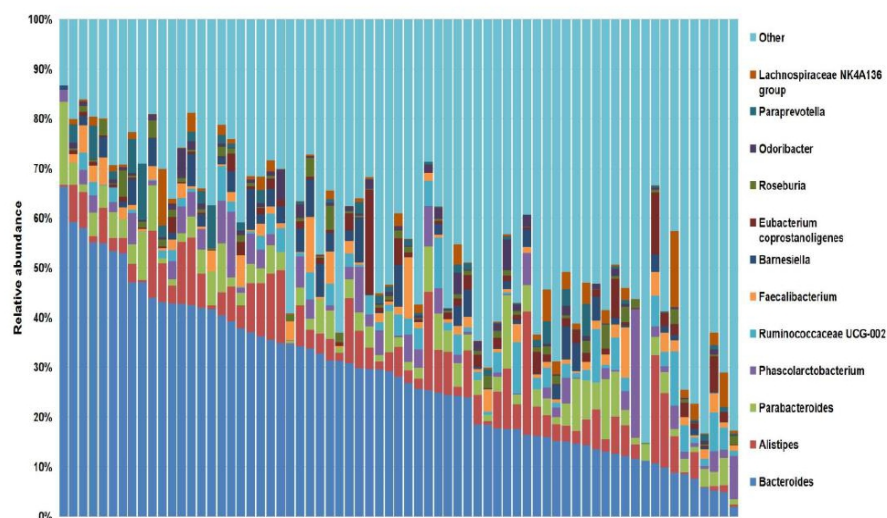


Figure 1. Stacked bar plot of the phylogenetic composition of the most common taxa at the genus level. *Bacteroides*, in dark blue, was the most frequent genera identified within the cohort.

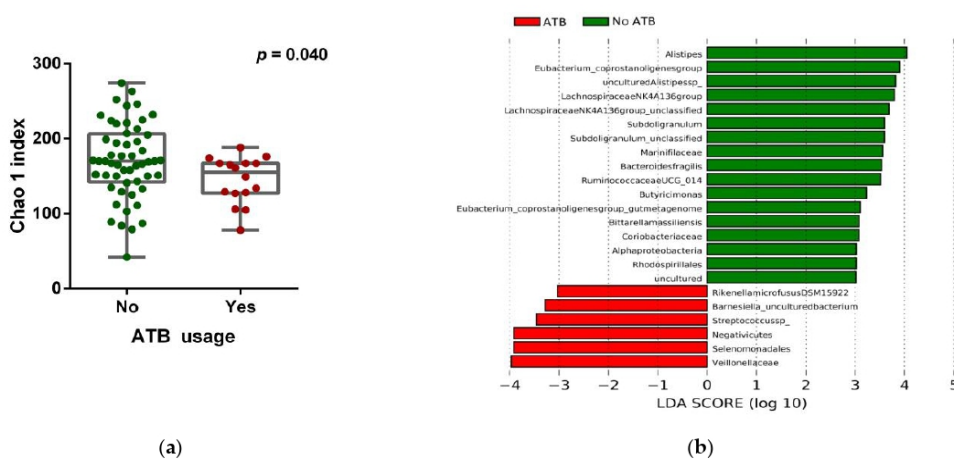
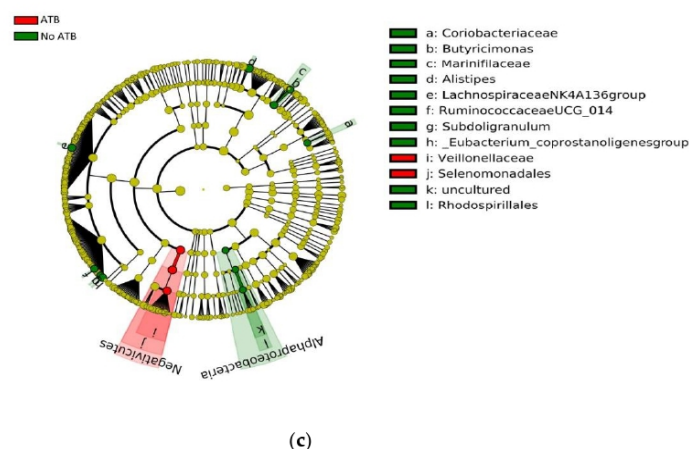


Figure 2. Cont.



**Figure 2.** Gut microbiota composition and ATB usage. (a) Chao 1 index score of the gut microbiota in patients stratified according to ATB usage, by the Mann–Whitney  $U$  rank sum test. Error bars represent the distribution of alpha-diversity scores. (b) Multi-level differential abundance analysis using linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) of patients stratified according to ATB usage. (c) Taxonomic cladogram from the LEfSe analysis showing differences in fecal taxa in ATB and non-ATB groups. Dot size is proportional to the abundance of the taxon. Green legends represent patients who did not receive ATB treatment, and red legends the patients who were prescribed ATB within 3 months before ICB treatment. ATB: antibiotics. LDA score  $> 3.0$ ;  $p < 0.05$ .

To explore whether dysbiosis associated with ATB use could influence resistance to PD-1 blockade, we also compared the therapeutic efficacy of ICB in patients treated with ATB and those not treated with ATB. No significant differences were observed between CB and PD groups based on ATB usage (Table 1), indicating that response to ICB was not impacted by the use of ATB in our cohort. Regarding survival indicators, we neither found statistically significant differences in PFS and OS between ATB and non-ATB groups, suggesting that ATB usage was not associated with poorer prognosis in the cohort (Table S2).

### 3.3. Correlation of the Gut Microbiota with Immune-Related Adverse Events

A total of 26/69 (37.7%) patients experienced irAEs at any grade. The different types of developed irAEs included endocrine (13/69, 18.8%), hepatic (10/69, 14.5%), gastrointestinal (8/69, 11.6%), dermatological (7/69, 10.1%), renal (6/69, 8.7%), and pulmonary (pneumonitis) toxicities (3/69, 4.3%) (Table S1). Interestingly, development of irAEs predicted clinical benefit and was correlated with improved PFS and OS in our cohort (Figure S1).

To investigate the possible influence of the gut microbiota on irAEs, we first analyzed the relationship between alpha-diversity indices and different types of irAEs. According to severity, no significant differences were observed in bacterial diversity between patients who experienced relevant clinical toxicities ( $\geq$  grade 2) and patients with non-severe toxicities (grade 1 or absent, Figure S2). However, according to toxicity types, it was found that patients showing ICB-related skin toxicity exhibited a significant decrease in alpha-diversity indices compared to those without skin toxicity (Chao 1 index,  $p = 0.031$ ; Shannon index,  $p = 0.027$ ; inverse Simpson index,  $p = 0.029$ , respectively, Figure 3a–c). No significant differences in bacterial diversity were observed for the other types of irAEs (Figure S2). Compositional analysis by LEfSe demonstrated differential abundances of bacteria in the gut microbiota of patients with or without skin toxicity. Concretely, *Bacteroides dorei* was enriched in samples from patients with skin toxicity, while bacteria from the *Firmicutes* phylum and *Bacteroides vulgatus* species were predominant in patients who did

not experience dermatological toxicity (Figure 3d,e). These findings indicate that baseline microbiota diversity and composition are associated with the emergence of immune-related skin toxicity and might represent potential biomarkers of dermatological manifestations.

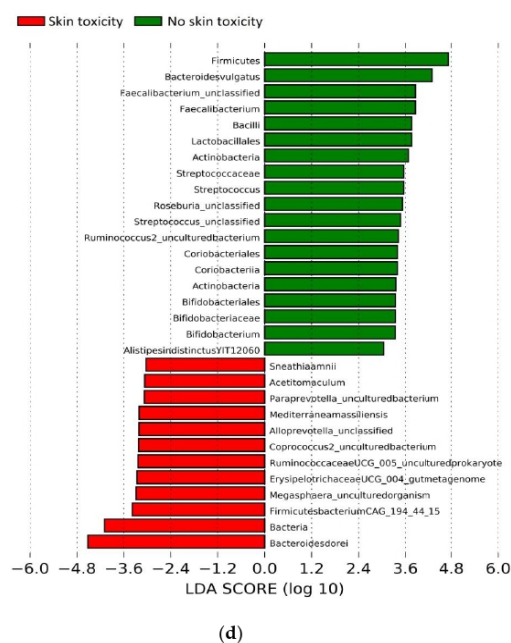
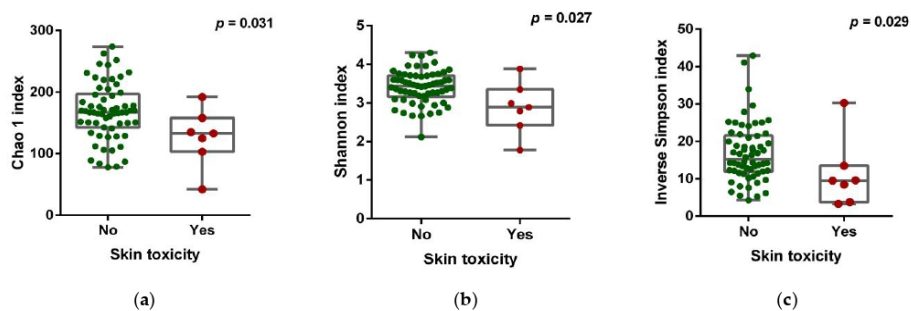
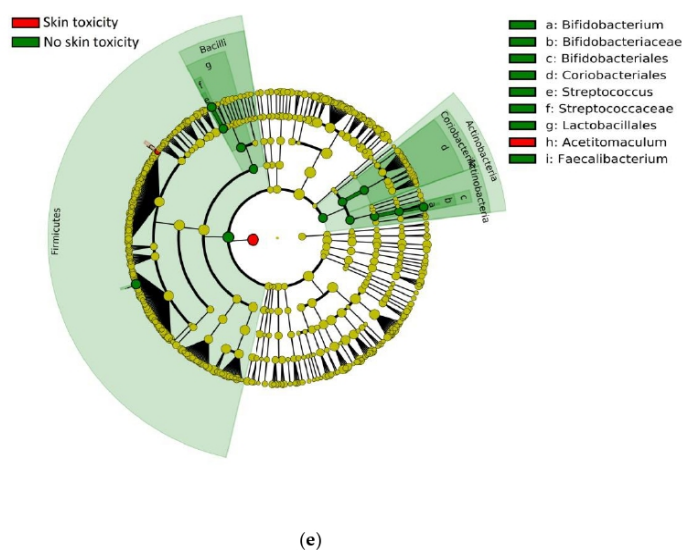


Figure 3. Cont.



**Figure 3.** Gut microbiota composition and ICB-related skin toxicity. (a) Chao 1, (b) Shannon, and (c) inverse Simpson indices scores of the gut microbiota in patients stratified according to the presence/absence of skin toxicity by Mann–Whitney  $U$  rank sum test. Error bars represent the distribution of alpha-diversity scores. (d) Multi-level differential abundance analysis using linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) in patients stratified according to skin toxicity. (e) Taxonomic cladogram stratified by skin toxicity. Dot size is proportional to the abundance of the taxon. Green legends represent the patients without skin toxicity, and red legends represent the patients with skin toxicity associated with ICB treatment. LDA score  $> 3.0$ ;  $p < 0.05$ .

#### 3.4. Gut Microbiota Composition and Response to ICB

To address a possible link between gut microbiota diversity and ICB clinical outcomes, we examined alpha-diversity indices in patients stratified according to ICB response. No significant differences were found in alpha-diversity between CB and PD patients, suggesting similarity in the compositional complexity of the gut microbiota among these two groups of patients (Figure S3). Moreover, to seek a possible impact of diversity on survival, we stratified patients into high versus low categories, based on the median of alpha-diversity indices. Again, no significant association of alpha-diversity with PFS and OS was found within the cohort, indicating a poor value of alpha-diversity as a prognostic factor (Figure S3).

To study whether differential composition and abundance within the gut microbiota could influence the patient clinical outcome to ICB, we analyzed the gut microbiota composition in CB and PD patients. To this aim, we compared the number of taxa between these two groups, observing that out of the 851 taxa obtained, 618 were shared among CB and PD patients (core microbiota), whereas 78 and 155 were exclusive to CB and PD groups, respectively (Figure 4a). However, these exclusive taxa were detected in a few patients and, therefore, the use of exclusive pools was avoided due to high individual variability (Figure S4). Accordingly, principal component analysis revealed no cluster formation in CB and PD patients, indicating that no specific cluster was associated with clinical outcome (Figure S5).

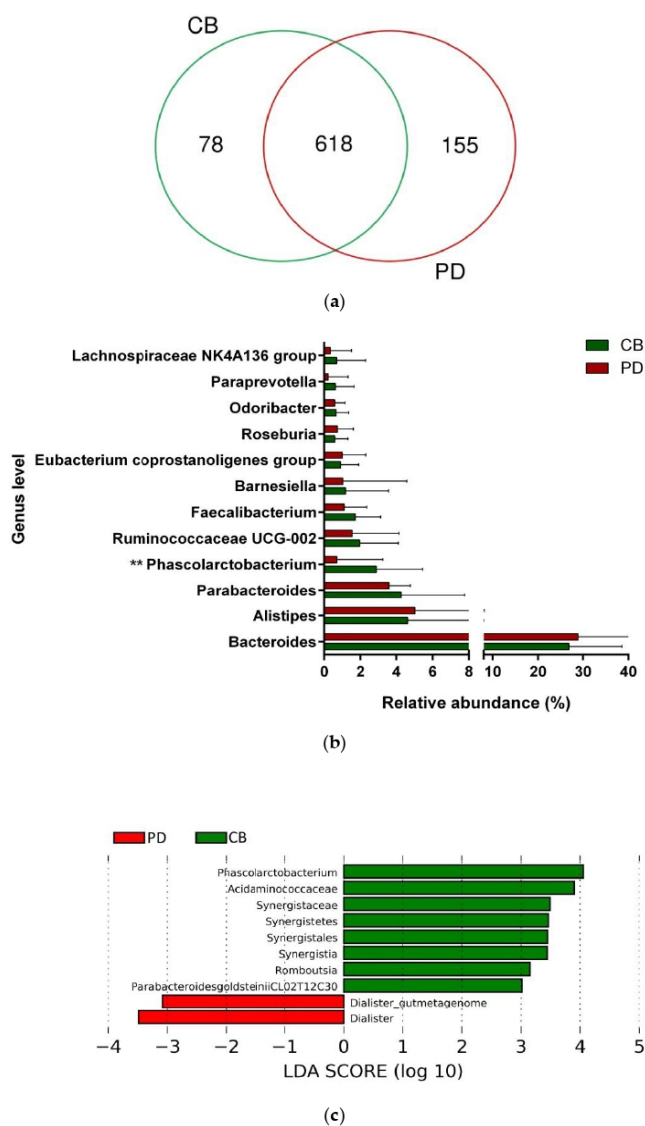
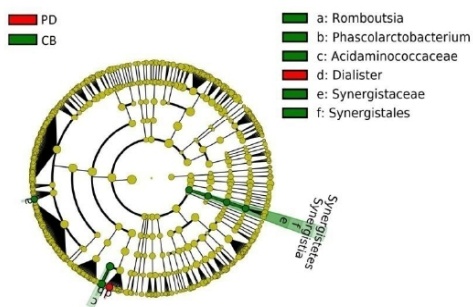
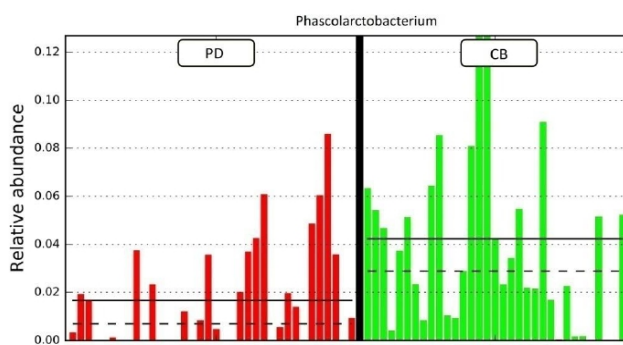


Figure 4. Cont.

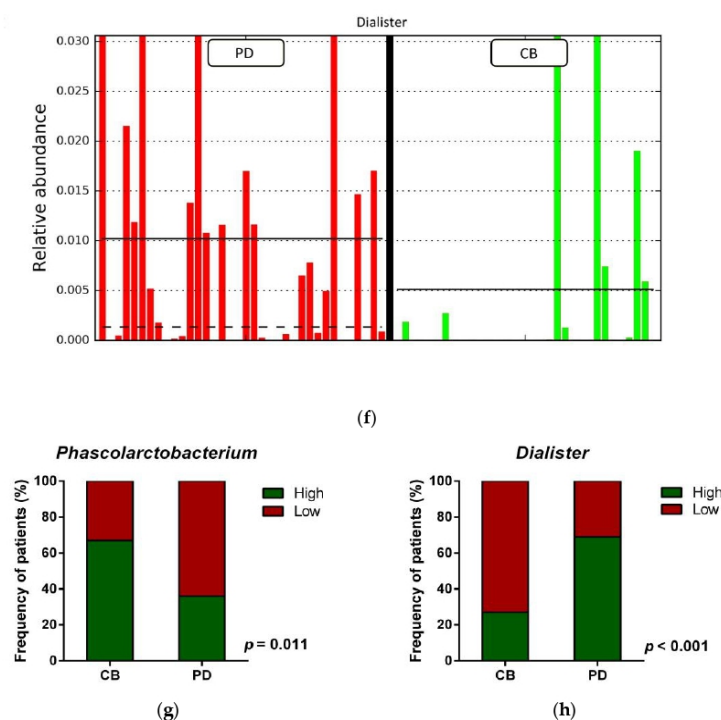


(d)



(e)

Figure 4. *Cont.*



**Figure 4.** Compositional differences of the gut microbiota between CB and PD groups. (a) Venn diagram depicting shared and unique taxa for CB and PD groups; 618 taxa were identified as core microbiota (shared taxa). (b) Comparisons of the relative abundance at the genus level among CB (green) and PD (red) groups;  $** p < 0.01$ . (c) Differential abundance analysis using linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) in patients stratified according to response to ICB. (d) Taxonomic cladogram from the LEfSe analysis depicting differences in fecal taxa in CB and PD patients. Dot size is proportional to the abundance of the taxon. Green legends represent CB patients and red legends represent PD patients. (e) Differential abundance analysis using linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) for the genera *Phascolarctobacterium* in PD and CB patients; the solid straight lines represent the plot subgroup relative abundance means; the dotted straight lines represent the plot subgroup relative abundance medians. (f) Differential abundance analysis using linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) for the genus *Dialister* in PD and CB patients; the solid straight lines represent the plot subgroup relative abundance means; the dotted straight lines represent the plot subgroup relative abundance medians. (g) Frequency of patients with high versus low relative abundance of *Phascolarctobacterium* in their stool samples according to response to ICB (CB and PD groups). (h) Frequency of patients with high versus low relative abundance of *Dialister* in their fecal samples according to the response to ICB (CB and PD groups). The cutoff value is the median of relative abundance: 1.92% (*Phascolarctobacterium*), 0.01% (*Dialister*). CB: clinical benefit group; PD: progression disease group. LDA score  $> 3.0$ ;  $p < 0.05$ .

Focused on the core microbiota, we next characterized and compared the differential abundances of the most frequent genera detected in CB and PD patients. Among the most frequent genera identified (Figure 1), *Phascolarctobacterium* was significantly enriched in CB patients (Figure 4b). LEfSe analysis was next used to find further imbalanced microorganisms between CB and PD patients (LDA score  $> 3.0$  and  $p < 0.05$ ). Results showed that *Phascolarctobacterium* (LDA  $> 4.0$ ), *Acidaminococcaceae*, *Synergistaceae*, *Synergistetes*, *Syner-*

*gistales*, *Synergistia*, *Romboutsia*, and *Parabacteroidesgoldsteinii* CL02T12C30 were enriched in CB patients, while *Dialister* and *Dialister gutmetagenome* were enriched in PD patients (Figure 4c–f). Among these bacteria, the *Phascolarctobacterium* and *Dialister* genera were found in at least 50% of patients. Interestingly, when stratifying patients into high versus low groups, based on the median relative abundance of these taxa, we found that high abundance of *Phascolarctobacterium* was detected in 67% (22/33) of patients experiencing clinical benefit, and 36% (13/36) of patients who progressed ( $p = 0.011$ , Figure 4g). Conversely, high abundance of *Dialister* was observed in 69% (25/36) of PD patients, but only in 27% (9/33) of CB patients ( $p < 0.001$ , Figure 4h). These results demonstrate the potential value of the genera *Phascolarctobacterium* and *Dialister* predicting response to ICB treatment.

### 3.5. Analysis of the Gut Microbiota as a Prognostic Marker

To further investigate the prognostic value of predictive bacteria, we performed survival analysis. Patients with high abundance of *Phascolarctobacterium* exhibited significantly prolonged PFS (median PFS 9.8 vs. 3.8 months, hazard ratio (HR): 0.531, 95% confidence interval (CI): 0.311–0.907,  $p = 0.018$ ; Figure 5a), whereas non-significant differences in OS were observed in comparison to those with low relative abundance (median OS 19.9 vs. 11.4 months, HR: 0.642 (95% CI: 0.346–1.190),  $p = 0.155$ ; Figure 5b). On the other hand, patients with high abundance of *Dialister* showed a significantly shortened PFS (median PFS 3.6 vs. 11.5 months, HR: 2.208 (95% CI: 1.286–3.791),  $p = 0.003$ ; Figure 5c), and reduced OS compared to those with low abundance (median OS 9.3 vs. not reached months, HR: 2.847 (95% CI: 1.485–5.459),  $p = 0.001$ ; Figure 5d).

We then performed multivariate analysis of the effect of *Phascolarctobacterium* and *Dialister* on PFS and OS, taking also into account other standard prognostic factors relevant in our cohort and the presence of irAEs. Our results demonstrated *Dialister* abundance as an independent prognostic factor for PFS (HR: 2.572 (95% CI: 1.352–4.895),  $p = 0.004$ ) and OS (HR: 3.227 (95% CI: 1.574–6.613),  $p = 0.001$ ) in advanced NSCLC patients (Figure 5e). Of note, multivariate analysis also revealed independent prognostic value for the presence of irAEs in our cohort (PFS HR: 0.299 (95% CI: 0.153–0.584),  $p < 0.001$ ; OS HR: 0.414 (95% CI: 0.197–0.870),  $p = 0.020$ ; Figure 5e), in agreement with a recent study that has evidenced association between multisystem irAEs and better outcomes in NSCLC [48]. Altogether, these results indicate that the low abundance of *Dialister* and the presence of irAEs might be used as prognostic biomarkers of improved survival for immunotherapy in NSCLC.

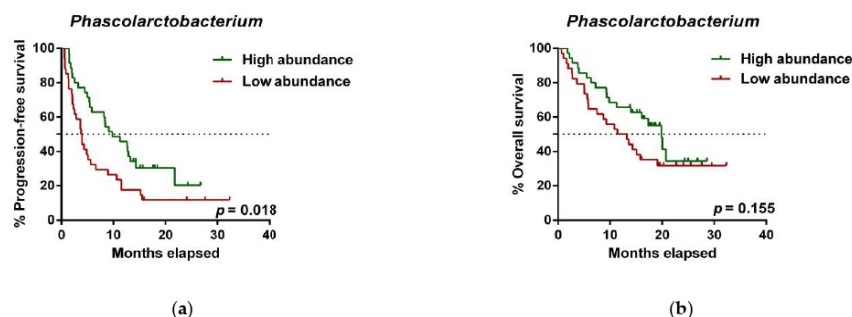
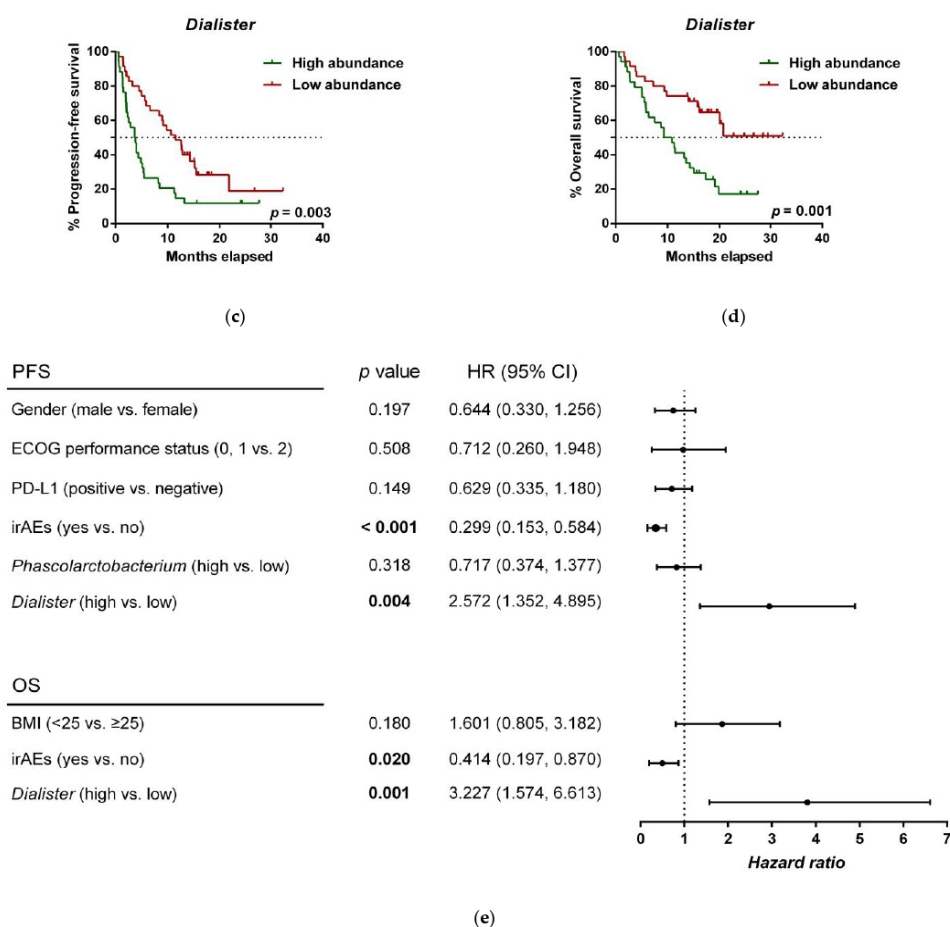


Figure 5. Cont.





**Figure 5.** *Dialister* abundance and the presence of irAEs are independent prognostic factors for PFS and OS. (a) Kaplan–Meier plot of PFS in patients with high (green line,  $n = 35$  (CB = 22, PD = 13), median PFS = 9.8 months) or low abundance of *Phascolarctobacterium* (red line,  $n = 34$  (CB = 11, PD = 23), median PFS = 3.8 months). (b) Kaplan–Meier plot of OS in patients with high (green line,  $n = 35$  (CB = 22, PD = 13), median PFS = 19.9 months) or low abundance of *Phascolarctobacterium* (red line,  $n = 34$  (CB = 11, PD = 23), median PFS = 11.4 months). (c) Kaplan–Meier plot of PFS in patients with high (green line,  $n = 34$  (CB = 9, PD = 25), median PFS = 3.6 months) or low abundance of *Dialister* (red line,  $n = 35$  (CB = 24, PD = 11), median PFS = 11.5 months). (d) Kaplan–Meier plot of OS in patients with high (green line,  $n = 34$  (CB = 9, PD = 25), median PFS = 9.3 months) or low abundance of *Dialister* (red line,  $n = 35$  (CB = 24, PD = 11), median PFS = not reached months). (e) Forest plot illustrating the results of multivariate analysis by the Cox proportional-hazard model. Statistical analysis was performed using the log-rank test. Bold *p*-values denote statistical significance at the  $p < 0.05$  level. Cutoff values correspond to the median relative abundance: 1.92% (*Phascolarctobacterium*), 0.01% (*Dialister*). ECOG: Eastern cooperative oncology group; irAEs: immune-related adverse events; BMI: body mass index; PFS: progression-free survival; OS: overall survival; HR: hazard ratio; CI: confidence interval.

#### 4. Discussion

In the present study, we prospectively investigated the gut microbiota profiles in 69 advanced NSCLC patients starting ICB monotherapy using 16S rDNA sequencing. Our results indicated that the ATB usage and ICB-related cutaneous toxicity, mainly skin rash, were associated with decreased gut microbiota diversity and differences in composition. Our findings also revealed differences in the gut microbiota composition in patients with clinical benefit (CB) versus those with progressive disease (PD). Concretely, *Phascolarctobacterium* was enriched in CB patients, and the high relative abundance of *Phascolarctobacterium* was associated with prolonged PFS. Contrarily, *Dialister* was overrepresented in PD patients and was identified as an independent prognostic biomarker.

Analysis of the sequencing data evidenced that *Bacteroides* was the most frequent genus in our cohort of advanced NSCLC patients. In agreement with these results, previous studies have also proved *Bacteroides* to be the most abundant genus in the human gut microbiota [49]. Furthermore, in lung cancer patients, *Bacteroides* is also significantly higher and a prominent genus biomarker compared to healthy controls [50].

It is widely accepted that the gut microbial composition can fluctuate in response to the use of ATB, affecting the abundances of up to 30% of the bacteria in the gut community [51]. Interestingly, some reports have demonstrated that the use of ATB is a negative factor in the effectiveness and clinical outcomes to ICB [29,33,34]. However, we revealed no significant relationship between ATB usage and the response to or survival from ICB immunotherapy. A plausible explanation lies in the resilience and the ability of the gut microbiota to adapt to the changing environment. It has been reported that the modification of the gut microbial community occurs within a few days from the first antibiotic dose and lasts for several weeks after treatment completion, with a remarkable ability of the gut microbiota to restore its compositional and functional state [52]. Although ATB use decreased the microbiota diversity at the baseline in our cohort, its composition might have recovered during the course of immunotherapy, resulting in non-significant association with clinical outcomes. Supporting our results, Huemer et al. neither observed the influence of ATB on ICB therapy in a bi-centric analysis of NSCLC patients [53]. Likewise, other studies have reported similar response rates and PFS for ICB medication in NSCLC patients treated with ATB and those not treated with ATB [32,54]. Nonetheless, despite the lack of relationship between the use of ATB and ICB efficacy in our patient cohort, and given the number of controversial results among studies, ATB prescription should still be recommended with caution both before and during immunotherapies. Indeed, several aspects, including the ATB administration route, type of ATB, time frame of ATB exposure prior to or during ICB treatment, as well as the interpatient heterogeneity, remain unclarified factors that might be associated with discrepant results among studies, thereby warranting further research to better define the impact of ATB usage on the outcomes of ICB immunotherapy.

The appearance of irAEs is an event that cannot be ignored in immunotherapy, since it may affect the management of cancer patients and could imply treatment discontinuation. The identification of factors predicting immune-related toxicity is a current need and preclinical and clinical studies have highlighted the impact of the gut microbiota on irAEs [28,40]. The gut microbiota has been proved to be a major regulator affecting skin homeostasis, likely through mechanisms related to the modulatory effects that the gut microbial community exerts on systemic immunity or via metabolite products, such as phenols that access circulation and get the distant skin [55,56]. In the present research, we have highlighted a decrease of the gut microbiota diversity in patients with skin toxicity. In our study, bacteria from the *Lactobacillales* and *Bifidobacteriales* orders were among the enriched bacteria in patients without ICB-related skin toxicity. Interestingly, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* are commonly tested probiotics that have demonstrated efficacy in the management of the dermatitis condition or chronic inflammatory diseases, such as psoriasis. In this sense, oral supplementation with *Lactobacillus casei* in mouse models has been demonstrated to reduce skin inflammation by inhibiting IFN- $\gamma$  signaling and CD8+ T hypersensitivity effector cells [57], as well as through increasing interleukin 10

(IL-10) secretion and activating FoxP3+ regulatory T cells in the skin [58]. On the other hand, in human subjects, administration of *Bifidobacterium* species has been proved to reduce systemic pro-inflammatory biomarkers, including C-reactive protein and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in psoriasis patients [59], and supplementation with a mix of *Bifidobacterium* and *Lactococcus* strains in pregnant women results in lower incidence of eczema in infants [60]. In the light of these studies, these probiotics might have potential reducing cutaneous toxicities and skin manifestations in ICB-treated patients. However, the bacteria species and mechanism through which the gut microbiota influences the appearance of skin toxicity need to be explored in future research.

Several studies have revealed that the gut microbiota may modulate the anti-tumor immune response, and certain gut microbiota compositions have been proved to be important regulatory factors in immunotherapy [28,31,35,36]. Our results also revealed differences in the gut microbiota composition according to response and clinical outcomes in advanced NSCLC patients treated with ICB. Concretely, high relative abundance of *Phascolarctobacterium* and low relative abundance of *Dialister*, two genera of the *Firmicutes* phylum, were significantly associated with better responses and improved survival from ICB treatment.

Supporting our findings, *Phascolarctobacterium* has been reported as one of the predominant bacteria in melanoma patients who responded to ICB [31]. Of note, one species of *Phascolarctobacterium* has been positively correlated with induction of colonic interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-expressing CD8 T cells, and colonization of mice with a consortium of 11 bacterial strains, including *Phascolarctobacterium faecium*, has been shown to enhance both spontaneous and ICB-mediated anti-tumor activity by increasing CD8+ tumor infiltrating lymphocytes producing IFN- $\gamma$  in syngeneic tumor models [37]. On the other hand, some bacterial species that feed on dietary fibers produce metabolites such as SCFAs (mainly acetate, propionate, and butyrate) that exert positive effects on the large intestine mucosa, representing a primary energy source for colonocytes and maintaining intestinal homeostasis through anti-inflammatory actions. In this regard, *Phascolarctobacterium* is a good producer of the SCFAs propionate and acetate [61]. SCFAs are known to modulate immune cell function with implications in anti-cancer immunotherapies. Indeed, it has been demonstrated that higher concentrations of fecal SCFAs are associated with ICB efficacy in solid cancer tumors [38] and predict long-term beneficial effects in NSCLC patients [62]. Thus, we hypothesize that *Phascolarctobacterium* might predict clinical benefit in our cohort by increasing the levels of SCFAs and modulating anti-tumor immune responses.

On the other hand, *Dialister* is a genus classified within the family *Veillonellaceae*, and several reports have demonstrated the pathogenic potential of *Dialister* spp. In this sense, *Dialister* has been associated with periodontitis, and decreased levels of *Dialister* spp. have been observed in patients with Crohn's disease [63,64]. Regarding cancer, this microorganism has been found to be increased in microbiota samples of head and neck squamous cell carcinoma and in NSCLC patients in comparison to healthy individuals [65,66]. A recent study has estimated the metabolic capacity of *Dialister* to produce the SCFA pentanoate, also known as valerate [67]. It has been reported that pentanoate has a marked immunomodulatory effect by inducing the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and suppressing Th17 cells, therefore showing therapeutic potential in inflammatory diseases [68]. Although the specific mechanism through which *Dialister* undermines the efficacy of ICB warrants further investigation, its anti-inflammatory effects might explain the detrimental role that this microorganism displays in NSCLC patients receiving immunotherapy.

## 5. Conclusions

This study corroborates the predictive/prognostic significance of the baseline gut microbiota composition in advanced NSCLC patients treated with ICB. Our data suggest that the use of ATB is associated with decreased microbiota diversity, but does not influence the therapeutic efficacy of ICB in our patient cohort. Low microbiota diversity is correlated with development of ICB-related skin toxicity, and the appearance of irAEs

is an independent prognostic biomarker for improved survival. In addition, the gut microbiota composition reveals *Phascolarctobacterium* and *Dialister* as potent predictive and prognostic factors. *Phascolarctobacterium* was correlated with clinical benefit and prolonged progression-free survival, whereas *Dialister* was associated with progressive disease and reduced progression-free survival and overall survival. If proven in larger cohorts, these microorganisms might be applied as potential biomarkers for ICB treatment in NSCLC. Moreover, subsequent extensive cohorts and clinical trials could analyze the possibility of combining *Phascolarctobacterium* and/or *Dialister* with other validated biomarkers, such as PD-L1 expression or tumor mutational burden, in order to provide powerful predictive/prognostic signatures for immunotherapy in NSCLC. Finally, if confirmed, our findings raise the need for further mechanistic studies to determine the biological relevance of *Phascolarctobacterium* and *Dialister* in the modulation of anti-tumor immune responses.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13112514/s1>: Figure S1: Correlation analysis between immune-related adverse events and clinical outcomes; Figure S2: Correlation analysis between alpha-diversity and immune-related adverse events; Figure S3: Correlation analysis between alpha-diversity and clinical outcomes; Figure S4: UpSet plots illustrating quantitative intersection of the exclusive taxa for CB (a) and PD (b) patients; Figure S5: Principal component analysis (PCA) plot of the gut microbiota composition in the CB and PD groups; Table S1: Detailed clinico-pathological characteristics of 69 advanced NSCLC patients in the study; Table S2: Univariate analysis based on clinico-pathological characteristics; Table S3: Sequencing information and alpha-diversity indices of 69 advanced NSCLC patients; Table S4: Correlation analysis between alpha-diversity and clinico-pathological characteristics.

**Author Contributions:** Conceptualization, E.J.-L., R.S. and C.C.; methodology and validation, S.C.-F., and E.J.-L.; formal analysis, F.Z., M.F. and N.D.; investigation, F.Z., M.F., N.D., G.D., M.R.-P., E.D. and A.H.-P.; resources, F.A., A.B. and C.G.; data curation, M.F., S.C.-F., A.B. and F.A.; writing—original draft preparation, F.Z.; writing—review and editing, M.F., R.S. and E.J.-L.; visualization and supervision, E.J.-L., R.S. and C.C.; project administration and funding acquisition, E.J.-L. and C.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by grant no. CB16/12/00350 from the Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer (CIBERONc) and grant no. PI18/00266 from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Clinical Research Ethics Committee of the present institution (General University Hospital Consortium of Valencia) (7 February 2016).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available in this article and attached supplementary files.

**Acknowledgments:** We would like to thank the Arnal Planelles Foundation, AMACMA, and GIDO group funding sources for supporting our work. F.Z. and N.D. are funded by the China Scholarship Council (CSC) of the Ministry of Education of P.R. China.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)]
2. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Fuchs, H.E.; Jemal, A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 7–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Chan, B.A.; Hughes, B.G.M. Targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current standards and the promise of the future. *Transl. Lung Cancer Res.* **2015**, *4*, 36–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Zappa, C.; Mousa, S.A. Non-small cell lung cancer: Current treatment and future advances. *Transl. Lung Cancer Res.* **2016**, *5*, 288–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Wang, X.; Teng, F.; Kong, L.; Yu, J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *OncoTargets Ther.* **2016**, *9*, 5023–5039. [[PubMed](#)]

6. Scheel, A.H.; Schäfer, S.C. Current PD-L1 immunohistochemistry for non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Dis.* **2018**, *10*, 1217–1219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Vaddepally, R.K.; Kharel, P.; Pandey, R.; Garje, R.; Chandra, A.B. Review of indications of FDA-approved immune checkpoint inhibitors per NCCN guidelines with the level of evidence. *Cancers* **2020**, *12*, 738. [[CrossRef](#)]
8. Ribas, A.; Wolchok, J.D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* **2018**, *359*, 1350–1355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Rizvi, N.A.; Mazières, J.; Planchard, D.; Stinchcombe, T.E.; Dy, G.K.; Antonia, S.J.; Horn, L.; Lena, H.; Minenza, E.; Mennequier, B.; et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): A phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol.* **2015**, *16*, 257–265. [[CrossRef](#)]
10. Gettinger, S.N.; Horn, L.; Gandhi, L.; Spigel, D.R.; Antonia, S.J.; Rizvi, N.A.; Powderly, J.D.; Heist, R.S.; Carvajal, R.D.; Jackman, D.M.; et al. Overall survival and long-term safety of nivolumab (anti-programmed death 1 antibody, BMS-936558, ONO-4538) in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 2004–2012. [[CrossRef](#)]
11. Shah, N.J.; Kelly, W.J.; Liu, S.V.; Choquette, K.; Spira, A. Product review on the Anti-PD-L1 antibody atezolizumab. *Hum. Vaccines Immunother.* **2018**, *14*, 269–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Garon, E.B.; Rizvi, N.A.; Hui, R.; Leighl, N.; Balmanoukian, A.S.; Eder, J.P.; Patnaik, A.; Aggarwal, C.; Gubens, M.; Horn, L.; et al. Pembrolizumab for the Treatment of Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 2018–2028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Antonia, S.J.; Villegas, A.; Daniel, D.; Vicente, D.; Murakami, S.; Hui, R.; Yokoi, T.; Chiappori, A.; Lee, K.H.; de Wit, M.; et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 1919–1929. [[CrossRef](#)]
14. Diggs, L.P.; Hsueh, E.C. Utility of PD-L1 immunohistochemistry assays for predicting PD-1/PD-L1 inhibitor response. *Biomark. Res.* **2017**, *5*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Grigg, C.; Rizvi, N.A. PD-L1 biomarker testing for non-small cell lung cancer: Truth or fiction? *J. Immunother. Cancer* **2016**, *4*, 48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Davis, A.A.; Patel, V.G. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: An analysis of all US food and drug administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors. *J. Immunother. Cancer* **2019**, *7*, 278. [[CrossRef](#)]
17. Marabelle, A.; Fakih, M.; Lopez, J.; Shah, M.; Shapira-Frommer, R.; Nakagawa, K.; Chung, H.C.; Kindler, H.L.; Lopez-Martin, J.A.; Miller, W.H.; et al. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: Prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *Lancet Oncol.* **2020**, *21*, 1353–1365. [[CrossRef](#)]
18. Galvano, A.; Gristina, V.; Malapelle, U.; Pisapia, P.; Pepe, F.; Barraco, N.; Castiglia, M.; Perez, A.; Rolfo, C.; Troncone, G.; et al. The prognostic impact of tumor mutational burden (TMB) in the first-line management of advanced non-oncogene addicted non-small-cell lung cancer (NSCLC): A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *ESMO Open* **2021**, *6*, 100124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Strickler, J.H.; Hanks, B.A.; Khasraw, M. Tumor mutational burden as a predictor of immunotherapy response: Is more always better? *Clin. Cancer Res.* **2021**, *27*, 1236–1241. [[CrossRef](#)]
20. Pepe, F.; Pisapia, P.; Gristina, V.; Rocco, D.; Micheli, M.; Micheli, P.; Iaccarino, A.; Tufano, R.; Gragnano, G.; Russo, G.; et al. Tumor mutational burden on cytological samples: A pilot study. *Cancer Cytopathol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
21. Pillai, R.N.; Behera, M.; Owonikoko, T.K.; Kamphorst, A.O.; Pakkala, S.; Belani, C.P.; Khuri, F.R.; Ahmed, R.; Ramalingam, S.S. Comparison of the toxicity profile of PD-1 versus PD-L1 inhibitors in non-small cell lung cancer: A systematic analysis of the literature. *Cancer* **2018**, *124*, 271–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Das, S.; Johnson, D.B. Immune-related adverse events and anti-tumor efficacy of immune checkpoint inhibitors. *J. Immunother. Cancer* **2019**, *7*, 306. [[CrossRef](#)]
23. Sender, R.; Fuchs, S.; Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* **2016**, *14*, e1002533. [[CrossRef](#)]
24. Khan, I.; Ullah, N.; Zha, L.; Bai, Y.; Khan, A.; Zhao, T.; Che, T.; Zhang, C. Alteration of Gut Microbiota in Inflammatory Bowel Disease (IBD): Cause or Consequence? IBD Treatment Targeting the Gut Microbiome. *Pathogens* **2019**, *8*, 126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lazar, V.; Ditu, L.M.; Pircalabioru, G.G.; Picu, A.; Petcu, L.; Cucu, N.; Chifiriuc, M.C. Gut microbiota, host organism, and diet triad in diabetes and obesity. *Front. Nutr.* **2019**, *6*, 21. [[CrossRef](#)]
26. Dumas, A.; Bernard, L.; Poquet, Y.; Lugo-Villarino, G.; Neyrolles, O. The role of the lung microbiota and the gut-lung axis in respiratory infectious diseases. *Cell. Microbiol.* **2018**, *20*, e12966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Helmink, B.A.; Khan, M.A.W.; Hermann, A.; Gopalakrishnan, V.; Wargo, J.A. The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 377–388. [[CrossRef](#)]
28. Hakozi, T.; Richard, C.; Elkrief, A.; Hosomi, Y.; Benlaifaoui, M.; Mimpfen, I.; Terrisse, S.; Derosa, L.; Zitvogel, L.; Routy, B.; et al. The Gut Microbiome Associates with Immune Checkpoint Inhibition Outcomes in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2020**, *8*, 1243–1250. [[CrossRef](#)]
29. Routy, B.; Le Chatelier, E.; Derosa, L.; Duong, C.P.M.; Alou, M.T.; Daillère, R.; Fluckiger, A.; Messaoudene, M.; Rauber, C.; Roberti, M.P.; et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* **2018**, *359*, 91–97. [[CrossRef](#)]
30. Matson, V.; Fessler, J.; Bao, R.; Chongsuwat, T.; Zha, Y.; Alegre, M.L.; Luke, J.J.; Gajewski, T.F. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* **2018**, *359*, 104–108. [[CrossRef](#)]

31. Gopalakrishnan, V.; Spencer, C.N.; Nezi, L.; Reuben, A.; Andrews, M.C.; Karpnits, T.V.; Prieto, P.A.; Vicente, D.; Hoffman, K.; Wei, S.C.; et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* **2018**, *359*, 97–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Jin, Y.; Dong, H.; Xia, L.; Yang, Y.; Zhu, Y.; Shen, Y.; Zheng, H.; Yao, C.; Wang, Y.; Lu, S. The Diversity of Gut Microbiome is Associated With Favorable Responses to Anti-Programmed Death 1 Immunotherapy in Chinese Patients With NSCLC. *J. Thorac. Oncol.* **2019**, *14*, 1378–1389. [[CrossRef](#)]
33. Wilson, B.E.; Routy, B.; Nagrial, A.; Chin, V.T. The effect of antibiotics on clinical outcomes in immune-checkpoint blockade: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cancer Immunol. Immunother.* **2020**, *69*, 343–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Derosa, L.; Hellmann, M.D.; Spaziano, M.; Halpenny, D.; Fidelle, M.; Rizvi, H.; Long, N.; Plodkowski, A.J.; Arbour, K.C.; Chaff, J.E.; et al. Negative association of antibiotics on clinical activity of immune checkpoint inhibitors in patients with advanced renal cell and non-small-cell lung cancer. *Ann. Oncol.* **2018**, *29*, 1437–1444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Vetzou, M.; Pitt, J.M.; Daillere, R.; Lepage, P.; Waldschmitt, N.; Flament, C.; Rusakiewicz, S.; Routy, B.; Roberti, M.P.; Duong, C.P.M.; et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science* **2015**, *350*, 1079–1084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Sivan, A.; Corrales, L.; Hubert, N.; Williams, J.B.; Aquino-Michaels, K.; Earley, Z.M.; Benyamin, F.W.; Lei, Y.M.; Jabri, B.; Alegre, M.-L.; et al. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* **2015**, *350*, 1084–1089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Tanoue, T.; Morita, S.; Plichta, D.R.; Skelly, A.N.; Suda, W.; Sugiura, Y.; Narushima, S.; Vlamakis, H.; Motoo, I.; Sugita, K.; et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature* **2019**, *565*, 600–605. [[CrossRef](#)]
38. Nomura, M.; Nagatomo, R.; Doi, K.; Shimizu, J.; Baba, K.; Saito, T.; Matsumoto, S.; Inoue, K.; Muto, M. Association of Short-Chain Fatty Acids in the Gut Microbiome With Clinical Response to Treatment With Nivolumab or Pembrolizumab in Patients With Solid Cancer Tumors. *JAMA Netw. Open* **2020**, *3*, e202895. [[CrossRef](#)]
39. Mager, L.F.; Burkhard, R.; Pett, N.; Cooke, N.C.A.; Brown, K.; Ramay, H.; Paik, S.; Stagg, J.; Groves, R.A.; Gallo, M.; et al. Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy. *Science* **2020**, *369*, 1481–1489. [[CrossRef](#)]
40. Wang, F.; Yin, Q.; Chen, L.; Davis, M.M. Bifidobacterium can mitigate intestinal immunopathology in the context of CTLA-4 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 157–161. [[CrossRef](#)]
41. Wang, Y.; Wiesnoski, D.H.; Helmink, B.A.; Gopalakrishnan, V.; Choi, K.; DuPont, H.L.; Jiang, Z.D.; Abu-Sbeih, H.; Sanchez, C.A.; Chang, C.C.; et al. Fecal microbiota transplantation for refractory immune checkpoint inhibitor-associated colitis. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1804–1808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Eisenhauer, E.A.; Therasse, P.; Bogaerts, J.; Schwartz, L.H.; Sargent, D.; Ford, R.; Dancey, J.; Arbuck, S.; Gwyther, S.; Mooney, M.; et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer* **2009**, *45*, 228–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glöckner, F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Peña, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 335–336. [[CrossRef](#)]
45. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583. [[CrossRef](#)]
46. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D590–D596. [[CrossRef](#)]
47. Segata, N.; Izard, J.; Waldron, L.; Gevers, D.; Miropolsky, L.; Garrett, W.S.; Huttenhower, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **2011**, *12*, R60. [[CrossRef](#)]
48. Shankar, B.; Zhang, J.; Naqash, A.R.; Forde, P.M.; Feliciano, J.L.; Marrone, K.A.; Ettinger, D.S.; Hann, C.L.; Brahmer, J.R.; Ricciuti, B.; et al. Multisystem Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Inhibitors for Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* **2020**, *6*, 1952–1956. [[CrossRef](#)]
49. Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D.R.; Fernandes, G.R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J.M.; et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **2011**, *473*, 174–180. [[CrossRef](#)]
50. Zhang, W.Q.; Zhao, S.K.; Luo, J.W.; Dong, X.P.; Hao, Y.T.; Li, H.; Shan, L.; Zhou, Y.; Shi, H.B.; Zhang, Z.Y.; et al. Alterations of fecal bacterial communities in patients with lung cancer. *Am. J. Transl. Res.* **2018**, *10*, 3171–3185. [[PubMed](#)]
51. Francino, M.P. Antibiotics and the human gut microbiome: Dysbioses and accumulation of resistances. *Front. Microbiol.* **2016**, *6*, 1543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Palleja, A.; Mikkelsen, K.H.; Forslund, S.K.; Kashani, A.; Allin, K.H.; Nielsen, T.; Hansen, T.H.; Liang, S.; Feng, Q.; Zhang, C.; et al. Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 1255–1265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Huemer, F.; Rinnerthaler, G.; Lang, D.; Hackl, H.; Lamprecht, B.; Greil, R. Association between antibiotics use and outcome in patients with NSCLC treated with immunotherapeutics. *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, 652–653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Kaderbhai, C.; Richard, C.; Fumet, J.D.; Aarmink, A.; Foucher, P.; Coudert, B.; Favier, L.; Lagrange, A.; Limagne, E.; Boidot, R.; et al. Antibiotic use does not appear to influence response to nivolumab. *Anticancer Res.* **2017**, *37*, 3195–3200. [[CrossRef](#)]
55. Salem, I.; Ramser, A.; Isham, N.; Ghannoum, M.A. The gut microbiome as a major regulator of the gut-skin axis. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1459. [[CrossRef](#)]
56. Coates, M.; Lee, M.J.; Norton, D.; MacLeod, A.S. The Skin and Intestinal Microbiota and Their Specific Innate Immune Systems. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2950. [[CrossRef](#)]
57. Chapat, L.; Chemin, K.; Dubois, B.; Bourdet-Sicard, R.; Kaiserlian, D. Lactobacillus casei reduces CD8+ T cell-mediated skin inflammation. *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 2520–2528. [[CrossRef](#)]
58. Hacini-Rachinel, F.; Gheit, H.; Le Luduec, J.B.; Dif, F.; Nancey, S.; Kaiserlian, D. Oral probiotic control skin inflammation by acting on both effector and regulatory T cells. *PLoS ONE* **2009**, *4*, 4903. [[CrossRef](#)]
59. Groeger, D.; O'Mahony, L.; Murphy, E.F.; Bourke, J.F.; Dinan, T.G.; Kiely, B.; Shanahan, F.; Quigley, E.M.M. Bifidobacterium infantis 35624 modulates host inflammatory processes beyond the gut. *Gut Microbes* **2013**, *4*, 325–339. [[CrossRef](#)]
60. Niers, L.; Martin, R.; Rijkers, G.; Sengers, F.; Timmerman, H.; Van Uden, N.; Smidt, H.; Kimpfen, J.; Hoekstra, M. The effects of selected probiotic strains on the development of eczema (the Panda study). *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* **2009**, *64*, 1349–1358. [[CrossRef](#)]
61. Louis, P.; Flint, H.J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 29–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Botticelli, A.; Vernocchi, P.; Marini, F.; Quagliariello, A.; Cerbelli, B.; Reddel, S.; Del Chierico, F.; Di Pietro, F.; Giusti, R.; Tomassini, A.; et al. Gut metabolomics profiling of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients under immunotherapy treatment. *J. Transl. Med.* **2020**, *18*, 49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Gonçalves, C.; Soares, G.M.S.; Faveri, M.; Pérez-Chaparro, P.J.; Lobão, E.; Figueiredo, L.C.; Baccelli, G.T.; Feres, M. Association of three putative periodontal pathogens with chronic periodontitis in Brazilian subjects. *J. Appl. Oral Sci.* **2016**, *24*, 181–186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Joossens, M.; Huys, G.; Cnockaert, M.; De Preter, V.; Verbeke, K.; Rutgeerts, P.; Vandamme, P.; Vermeire, S. Dysbiosis of the faecal microbiota in patients with Crohn's disease and their unaffected relatives. *Gut* **2011**, *60*, 631–637. [[CrossRef](#)]
65. Guerrero-Preston, R.; Godoy-Vitorino, F.; Jedlicka, A.; Rodríguez-Hilario, A.; González, H.; Bondy, J.; Lawson, F.; Folawiyo, O.; Michailidi, C.; Dziedzic, A.; et al. 16S rRNA amplicon sequencing identifies microbiota associated with oral cancer, Human Papilloma Virus infection and surgical treatment. *Oncotarget* **2016**, *7*, 51320–51334. [[CrossRef](#)]
66. Liu, F.; Li, J.; Guan, Y.; Lou, Y.; Chen, H.; Xu, M.; Deng, D.; Chen, J.; Ni, B.; Zhao, L.; et al. Dysbiosis of the gut microbiome is associated with tumor biomarkers in lung cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **2019**, *15*, 2381–2392. [[CrossRef](#)]
67. Taylor, H.; McDonald, J.; Serrano Contreras, J.I.; Li, J.; Marchesi, J.; Hart, A. DOP08 Deep remission in paediatric Crohn's disease is associated with increased abundance of dialister species and increased valerate. *J. Crohn's Colitis* **2020**, *14*, S045–S046. [[CrossRef](#)]
68. Luu, M.; Pautz, S.; Kohl, V.; Singh, R.; Romero, R.; Lucas, S.; Hofmann, J.; Raifer, H.; Vachharajani, N.; Carrascosa, L.C.; et al. The short-chain fatty acid pentanoate suppresses autoimmunity by modulating the metabolic-epigenetic crosstalk in lymphocytes. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–12. [[CrossRef](#)]

## 8. Otras publicaciones

Alejandro Herreros-Pomares, Carlos Llorens, Beatriz Soriano, **Feiyu Zhang**, Sandra Gallach, Leticia Bagan, Judith Murillo, Eloísa Jantus-Lewintre, José Bagan. **Oral microbiome in Proliferative Verrucous Leukoplakia exhibits loss of diversity and enrichment of pathogens.** *Oral Oncology*. September 2021. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2021.105404>. IF: 5.337.

Oral Oncology 120 (2021) 105404



Contents lists available at ScienceDirect

Oral Oncology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/oraloncology](http://www.elsevier.com/locate/oraloncology)



### Oral microbiome in Proliferative Verrucous Leukoplakia exhibits loss of diversity and enrichment of pathogens

Alejandro Herreros-Pomares<sup>a,b</sup>, Carlos Llorens<sup>c</sup>, Beatriz Soriano<sup>c</sup>, Feiyu Zhang<sup>a</sup>, Sandra Gallach<sup>a,b,d</sup>, Leticia Bagan<sup>e</sup>, Judith Murillo<sup>f</sup>, Eloísa Jantus-Lewintre<sup>a,b,d,g,\*</sup>, José Bagan<sup>b,e,f,\*</sup>

<sup>a</sup> *Molecular Oncology Laboratory, Fundación Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain*

<sup>b</sup> *CIBERONC, Valencia, Spain*

<sup>c</sup> *Biotechvna, Pare Científic, Universitat de València, Paterna, Valencia, Spain*

<sup>d</sup> *TRIAL Mixed Unit, Centro de Investigación Príncipe Felipe-Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain*

<sup>e</sup> *Medicina Oral Unit, Stomatology Department, Valencia University, Spain*

<sup>f</sup> *Department of Stomatology and Maxillofacial Surgery, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain*

<sup>g</sup> *Department of Biotechnology, Universitat Politècnica de València, Valencia, Spain*

#### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Oral leukoplakia  
Oral cancer  
Microbiota  
Head and neck cancer  
Pathogens  
Campylobacter  
16S rRNA  
Porphyromonas  
Eubacterium

#### ABSTRACT

**Objectives:** Oral microbiome plays an important role in oral diseases. Among them, proliferative verrucous leukoplakia (PVL) is an uncommon form of progressive multifocal leukoplakia with a worryingly rate of malignant transformation. Here, we aimed to characterize the oral microbiome of PVL patients and compare it with those of healthy controls.

**Material and methods:** Oral biopsies from ten PVL patients and five healthy individuals were obtained and used to compare their microbial communities. The sequence of the V3-V4 region of 16S rRNA gene was used as the taxonomic basis to estimate and analyze the composition and diversity of bacterial populations present in the samples.

**Results:** Our results show that the oral microbial composition and diversity are significantly different among PVL patients and healthy donors. The average number of observed operational taxonomic units (OTUs) was higher for healthy donors than for PVL, proving a loss of diversity in PVL. Several OTUs were found to be more abundant in either group. Among those that were significantly enriched in PVL patients, potential protumorigenic pathogens like *Oribacterium* sp. *oral taxon 108*, *Campylobacter jejuni*, uncultured *Eubacterium* sp., *Tannerella*, and *Porphyromonas* were identified.

**Conclusion:** Oral microbiome dysbiosis was found in patients suffering from PVL. To the best of our knowledge, this is the first study investigating the oral microbiome alterations in PVL and, due to the limited number of participants, additional studies are needed. Oral microbiota-based biomarkers may be helpful in predicting the risks for the development of PVL.

#### Introduction

Proliferative verrucous leukoplakia (PVL) is an oral potentially

malignant disorder which initially manifests as white asymptomatic hyperkeratotic plaques, but in time progresses affecting different and multiple oral mucosa locations with a warty tendency during its

**Abbreviations:** CagA, cytotoxin associated gene A; CDT, cytolethal distending toxin; CRC, colorectal carcinoma; eHOMD, expanded Human Oral Microbiome Database; FadA, Fusobacterium effecto adhesion A; HCC, hepatocellular carcinoma; HPV, human papillomavirus; IpgD, inositol phosphate phosphatase D; LPS, lipopolysaccharide; MP toxin, metalloproteinase toxin; NGS, next-generation sequencing; OTU, Operative Taxonomical Unit; OSCC, Oral Squamous Cell Carcinoma; PCA, Principal Components Analysis; PVL, proliferative verrucous leukoplakia; RDP, Ribosomal database Project; VirA, virulence gene A; VST, Variance stabilizing transformation.

\* Corresponding authors at: Fundación de Investigación, Hospital General Universitario de Valencia, Avda, Tres Cruces s/n 46014, Valencia, Spain (E. Jantus-Lewintre). Servicio de Estomatología y Cirugía Maxilofacial, Hospital General Universitario de Valencia, Avda, Tres Cruces s/n 46014, Valencia, Spain (J.V. Bagan).  
E-mail addresses: [jantus\\_elo@gva.es](mailto:jantus_elo@gva.es) (E. Jantus-Lewintre), [jose.v.bagan@uv.es](mailto:jose.v.bagan@uv.es) (J. Bagan).

<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2021.105404>

Received 16 April 2021; Received in revised form 17 May 2021; Accepted 15 June 2021

Available online 2 July 2021

1368-8375/© 2021 The Authors.

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



evolution [1]. It was first described by Hansen et al. in 1985 and it is characterized by a tremendous treatment resistance, a high rate of recurrences and development of new leukoplakias, and a very high risk of transformation into oral cancer [2,3]. The overall incidence of malignant transformation was first considered around 40% [4–6], but long-term studies have shown transformation rates approaching 70–100% [3,7]. Second primary tumors and field cancerization are also frequent in PVL, with decreasing time intervals between the development of one tumor and the next one over time [8]. The worryingly high rate of malignant transformation is aggravated by the inefficacy of clinical procedures in the long term, rendering scalpel or laser removal insufficient [2,9]. Local block tissue removal, often including nearby teeth, is sometimes the only viable procedure [10]. PVL is preponderant in elderly women, and contrary to common oral leukoplakia, it has not been associated to tobacco-related habits [11,12]. A previous study conducted by our group including 55 PVL patients concluded that patients who develop oral cancers are commonly non-smokers females and those who develop more than one oral squamous cell carcinoma (OSCC) are more likely to develop lesions of the gingiva [13].

In spite of the environmental and genetic risk factors, scientists have realized during the last decades that microorganisms inhabiting the human body take an active role in the maintenance of health and the appearance of diseases. Microbiome studies, motivated by the availability of high-throughput technologies, have exhibited how the disturbance of the microbiota is associated with a great number of human diseases [14]. To date, the vast majority of studies have been performed on the gut, which constitutes the body niche where most of commensal microorganisms reside. As a result, associations between gut microbiota and diseases, either in a positive or in a negative way, have been found, including inflammatory bowel disease, multiple sclerosis, type 1 and 2 diabetes, allergies, asthma, autism, and cancer [15,16]. In particular, altering gut microbiota composition affects the incidence and progression of colorectal carcinoma (CRC) in both genetic and carcinogen-induced models of tumorigenesis [17–19]. Several by-products of the gut microbiota directly target intestinal epithelial cells, mediating oncogenic effects as reported for cytotoxic distending toxin (CTD), inositol phosphate phosphatase D (IppD), virulence gene A (VirA), cytotoxin associated gene A (CagA), *Fusobacterium* effecto adhesion A (FadA), metalloproteinase toxin (MP toxin), among others, or suppress tumorigenesis, as demonstrated for butyrate, propionate, monophosphoryl lipid A, ferrichrome, pyridoxine and lipopolysaccharide (LPS) [20–22]. Experimental alterations of the gut microbiota have also been observed in other malignancies, including hepatocellular carcinoma (HCC) and breast cancer. Through the portal venous system, the liver is exposed to intestinal bacteria and their by-products, which could cause inflammatory changes, hepatotoxicity and carcinogenesis [23]. In the case of breast cancer, it is hypothesized that the gut microbiota may promote carcinogenesis via its ability to alter the profile of circulating estrogens and phytoestrogens, via its influence on energy metabolism or via antitumor immune function [24,25]. More studies have been published which report a link between gut dysbiosis and other malignancies, but these associations are less well established and require further investigation. Although it has been less studied, oral microbiome dysbiosis could be linked to oral cancer and other oral diseases through direct metabolism of chemical carcinogens and general inflammatory effects [26]. The oral cavity is home for more than 700 microbial species, including commensal and opportunistic bacterium, fungi and viruses, and despite PVL having an unknown etiology, controversy around the possible implication of human papillomavirus (HPV) infections, like HPV 16 infection, in its pathogenesis exists [5,9,27,28]. Moreover, dysbiotic oral microflora has already been associated to chronic periodontal disease [29,30] and chronic bacterial infection might be promoter of oral cancer [31] but there are not studies analysing the influence of oral microbiome in the development and/or progression of PVL. In this study, oral biopsies of PVL patients were used to characterize their microbiome and compare it with that of healthy controls in

order to gain insight into the possible role of oral microorganisms in PVL and its malignant transformation to cancer. To the best of our knowledge, this is the first time that alterations in the oral microbiome of PVL patients have been investigated.

## Patients and methods

### Patients and tissue samples

This study included 10 patients with a clinical diagnosis of PVL and a control group comprised of 5 healthy donors. For the PVL patients, two representative biopsies were taken from the same area of the lesions, including epithelium and the underlying connective tissue between 2017 and 2018. One of each pair of specimens was analyzed with the routine histopathological methods to ensure that each patient met the histopathological criteria to establish the PVL diagnosis provided by Cerero-Lapiedra et al. [32]. Briefly, there can be from simple epithelial hyperkeratosis to verrucous hyperplasia with or without epithelial dysplasia. In addition, the criteria used for diagnosing oral epithelial dysplasia reported by Warnakulasuriya S et al. was followed [33]. It is based on changes to the architecture of the epithelium and those that manifest as cellular atypia. Conventionally, dysplasia is divided into mild (architectural disturbance limited to the lower third of the epithelium, accompanied by minimal cytological atypia), moderate (architectural disturbance extending into the middle third of the epithelium), and severe (more than two thirds of the epithelium shows architectural disturbance with associated cytological atypia). Another biopsy was required in order to rule out the presence of OSCC. The other sample was used for the 16S sequencing. For the control group, samples were obtained from healthy mucosa areas adjacent to the teeth (vestibular fundus). All tissue samples were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until their analysis. A previous transcriptomic and epigenetic characterization of the same cohort of patients (see Table 1) has been performed using RNAseq and is available at [34,35].

### Library preparation and illumina sequencing

The sequence of the V3-V4 region of 16S rRNA gene was used as the taxonomic basis to estimate bacterial populations present in the samples, according what stated in Caporaso et al. [36]. DNA concentration was determined in the samples using a fluorimetric method using Quant-IT PicoGreen reagent in a FLUOROSCAN fluorimeter (Thermo Fisher). Afterwards, DNA samples were diluted to 1 ng/ul and 2 ul of each sample were used to amplify the V3-V4 region of 16S rRNA gene using specific primers for 16S rRNA with the following sequences:

Forward primer: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3'.

Reverse primer: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3'.

Those primers were used as fusion primers respectively linked to CS1 and CS2 sequences (Fluidigm) useful for subsequent barcoding. Positive amplification (22–25 cycles) was evaluated by gel electrophoresis of PCR products which showed a marked and clean band of a size around 460 pb. Therefore, a second PCR of low number of cycles was applied to add the individual barcode to each of the samples, as well as to incorporate illumina-specific sequences in the amplicon libraries. Individual libraries were analyzed using a Bioanalyzer 2100 (Agilent) to estimate the concentration of the specific PCR products and a pool of samples was made in equimolar amounts. The pool was further cleaned, quantified and the exact concentration of the library was measured by real time PCR, using illumina specific primers (Kapa Biosystems). Finally, samples were denatured to be seeded onto a Miseq v3 flowcell (illumina) and run under a 2x300 pair end sequencing procedure (Scientific Park of Madrid, Spain). A total amount of 180.000 pair end reads was obtained as average (range 146.000–213.000). After quality filtering and demultiplexing, fastq files were prepared and submitted to the bioinformatic

**Table 1**  
Clinicopathological information of the PVL patients included in this study. A previous transcriptomic and epigenetic characterization of the same cohort of patients was performed and is available at (25,26).

PVL patients					Clinical and histological characteristics of PVL before developing OSCC				OSCC		
Case	Age	Gender	Tobacco smoker	Follow up of PVL (Years)	Number of oral locations	Oral locations	Percentage of oral mucosa affected with PVL lesions	Histological findings when taken the sample for 16S sequencing	Transformation in OSCC	Number of oral cancers	Location of oral cancers
1	66	Male	No	7	3	Gingiva, Buccal mucosa, Lips	40	Without dysplasia	Yes	2	Buccal mucosa
2	71	Male	No	3	2	Gingiva, Buccal mucosa	40	Moderate dysplasia	No	–	–
3	60	Female	No	19	5	Gingival, Buccal mucosa, Tongue, Floor mouth, lip	75	Without dysplasia	Yes	2	Gingiva
4	86	Male	No	10	4	Gingiva, Buccal mucosa, Floor mouth, Tongue	50	Mild dysplasia	No	–	–
5	73	Female	Yes	3	2	Gingiva, Buccal mucosa	25	Severe dysplasia	Yes	2	Gingiva, Buccal mucosa
6	83	Females	No	10	6	Gingiva, Buccal mucosa, Lips, Tongue, Floor mouth, Palate	90	Mild dysplasia	Yes	1	Gingiva
7	63	Female	No	9	5	Gingiva, Buccal mucosa, Palate, Floor mouth, Tongue	50	Moderate dysplasia	Yes	1	Gingiva
8	70	Male	Yes	15	2	Gingiva, Buccal mucosa	30	Moderate dysplasia	Yes	3	Gingiva
9	80	Female	No	20	5	Gingiva, Buccal mucosa, Palate, Floor mouth, Tongue	50	Moderate dysplasia	No	–	–
10	67	Female	Yes	26	4	Gingiva, Buccal mucosa, Palate, Tongue	65	Severe dysplasia	Yes	1	Gingiva

pipeline.

#### Bioinformatic data processing and analyses

**Quality Analysis and preprocessing:** Quality control on Fastq libraries was performed using FastQC [37]. Subsequently, Fastq files were pre-processed using Prinseq-lite-020.4 [38] to eliminate primers and low-quality sequences. Paired-end Fastq files were merged and then converted to fasta format using the QIIME scripts “join\_paired\_ends.py” and “convert\_fastaqual\_fastq.py” available here <http://qiime.org/scripts/index.html>.

**Characterization, quantification and binning of Operative Taxonomical Units (OTUs):** Cd-hit-est of CD-HIT [39] was used to group the pre-processed reads of each fasta library into OTU clusters using a sequence similarity cut-off of 0.95. The most representative sequence of each OTU cluster (provided by CD-HIT together with the counts per OTU) was then mapped against the Ribosomal database Project (RDP) release 11 [40]

using HS-BLASTN [41] to bin each OTU. Finally, counts and taxonomy annotations for each OTU were extracted from the CD-HIT and HS-BLAST outputs and integrated together using the Worksheet App of the GPRO suite [42].

**Differential Distribution:** DESeq [43] was used to assess differential distribution of OTUs between the two sample groups (PVL and control). OTU counts were previously normalized also with DESeq by dividing the counts by the size factors and applying variance stabilizing transformation (VST).

**Statistical analyses:** All statistical analysis performed in this study, including the creation of KRONAs interactive charts [44] per sample and group, were performed using the R scripts implemented in the STATools App of the GPRO suite.

#### Data availability

Raw data have been deposited at the NCBI SRA archive with

BioProject record PRJNA663437, and BioSample records (SAMN16132437, SAMN16132438, SAMN16132439, SAMN16132440, SAMN16132441, SAMN16132442, SAMN16132443, SAMN16132444, SAMN16132445, SAMN16132446, SAMN16132447, SAMN16132448, SAMN16132449, SAMN16132450, SAMN16132451).

#### Ethics statement

This study was approved by the Ethics Committee for Human Research of the University of Valencia (Ref. H1523722754549). Informed written consent was obtained from all participants after an explanation of the nature of the study, as approved by the Ethics Committee for Human Research of the University of Valencia.

#### Results

##### Participant characteristics and sequencing data summary

This study included a cohort of 10 patients with PVL and a cohort of 5 healthy donors as controls. The clinical profile and clinicopathological information from each of the PVL patients is shown in Table 1. The median patient age was 70.5 years [range: 60–86], 60% were females, and 30% were smokers. The median follow-up of the study was 10 years [range: 3–26]. Two patients did not have dysplasia, two showed mild dysplasia, four moderate dysplasia, and two severe dysplasia. None of the selected PVL cases presented histopathological signs of OSCC at the time of the biopsy. However, it is noteworthy that after 3 years of study, 7 out of 10 PVL cases developed at least one OSCC and 4 of them have developed more than one.

Sequencing of oral samples resulted in a total of 2,735,102 raw sequences. Filtering for sequence quality reduced the number of sequences to 2,472,087, being 2,364,853 (95.6%) assigned to 980 OTUs. Rarefaction curves show that the 15 samples were sequenced to a sufficient depth such that a complete microbiome profile was likely captured for most samples (Fig. 1A). Regarding Bacteria, a total of 37 phyla, 53 orders, 94 families, and 630 genera were identified, whereas 7 phyla, 13 orders, 18 families, and 40 genera were identified for Archaea.

##### Microbiome diversity and composition of PVL and healthy oral samples.

An unsupervised principal component analysis (PCA) including all samples was performed in order to group samples according to their microbiome. PCA score plot revealed that microbiome from PVL patients is more homogeneous than that from healthy donors (Fig. 1B). In addition, Mann-Whitney *U* test confirmed that the distributions of both groups is significantly different, being the oral diversity greater in healthy donors than in PVL patients ( $p < 3.688e-05$ ).

Microbial alpha and beta diversity were evaluated using richness

(Chao1, Alpha1), evenness (Shannon-Wiener), dominance (Simpson, Inverse Simpson), and similarity (Jaccard and Sorensen) metrics (Fig. 2). Both indices used to assess richness were significantly different between PVL and healthy samples (Fig. 2A and 2B). Certainly, the average number of observed OTUs found was higher for healthy donors than for PVL (251 vs 282,  $p < 0.05$ ). No significant differences were found in terms of evenness (Fig. 2C) or dominance (Fig. 2D and 2E). Regarding similarity, three out of five samples from healthy donors showed significant differences with the rest of samples (Fig. 2F and 2G). The oral sample from PVL\_1 patient also showed differences with samples from PVL\_3, PVL\_7, and PVL\_10 patients. A prominent feature of oral microbiome evidenced from these results is that there is a high degree of inter-individual variability in community composition among study participants especially in the healthy subgroup.

Krona plots representing an overview of the oral microbiome of healthy controls and PVL patients are available in Supplementary Material S1 and S2, respectively. The most abundant phyla found in PVL included Firmicutes (45%), Fusobacteria (17%), Proteobacteria (14%), Actinobacteria (12%), and Bacteroidetes (9%), whereas in healthy controls included Firmicutes (51%), Fusobacteria (13%), Proteobacteria (11%), Actinobacteria (9%), Bacteroidetes (8%), Spirochaetes (2%), and Planctomycetes (2%).

At the genus level, the most frequently detected genera in PVL were *Streptococcus* (28%), *Gemella* (4%), *Veillonella* (2%), and *Granulicatella* (2%) of Firmicutes; *Fusobacterium* (13%), and *Leptotrichia* (5%) of Fusobacteria; *Haemophilus* (7%), *Campylobacter* (3%), *Aggregatibacter* (2%), and *Neisseria* (2%) of Proteobacteria; *Rothia* (3%) and *Corynebacterium* (2%) of Actinobacteria; and *Prevotella* (5%) and *Porphyromonas* (2%) of Bacteroidetes. Regarding healthy controls, *Streptococcus* (22%), *Gemella* (4%), *Granulicatella* (3%), *Bacillus* (2%), *Exiguobacterium* (2%), *Filifactor* (1%), and *Dialister* (1%) of Firmicutes; *Fusobacterium* (11%), and *Leptotrichia* (2%) of Fusobacteria; *Haemophilus* (6%), and *Candidatus Carsonella* (1%) of Proteobacteria; *Rothia* (5%) and *Corynebacterium* (1%) of Actinobacteria; *Prevotella* (2%), *Porphyromonas* (2%), and *Alloprevotella* (1%) of Bacteroidetes; *Treponema* (2%) of Spirochaetes; *Gemmata* (2%) of Planctomycetes; and *TM7* (1%) were the most abundant.

##### Community structure reveals differently abundant OTUs in PVL and healthy oral samples

In addition to the differences found in microbiome composition in terms of overall diversity, specific OTUs were identified that exhibited differences in abundance between PVL and healthy samples. Prior to further analysis, OTUs were filtered in order to remove microorganisms with very low counts across all libraries since they provide little evidence for differential distribution analysis. After filtering, 110 genera were found to be exclusively present in healthy donors, whereas 14 were exclusive of PVL (Fig. 3A). The differential distribution analysis revealed that oral samples from healthy donors were significantly enriched in

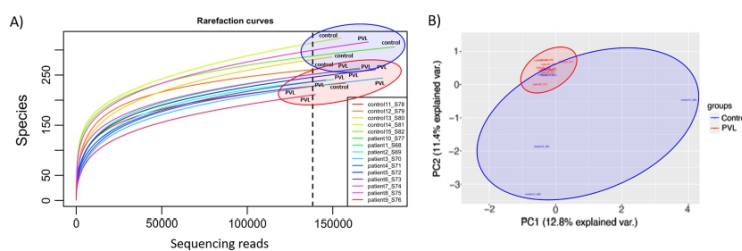


Fig. 1. Microbiome diversity in samples from PVL and healthy controls. (A) Rarefaction curves. Average number of OTUs detected versus sequencing library size for oral samples collected from PVL patients and healthy controls. (B) PCA score plot of samples according to their microbiome.

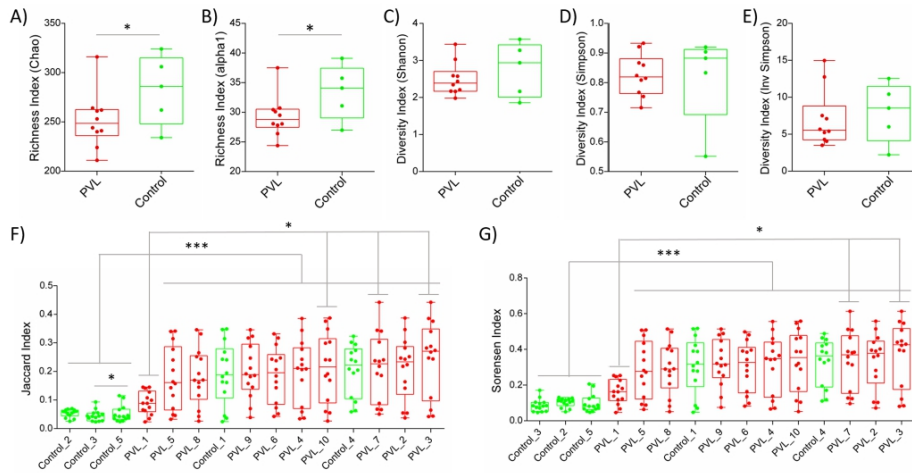


Fig. 2. Microbial richness, evenness, dominance, and similarity of oral samples. (A) Chao, (B) Alpha1, (C) Shannon, (D) Simpson, (E) Inverse Simpson, (F) Jaccard, (G) Sorensen indexes. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001.

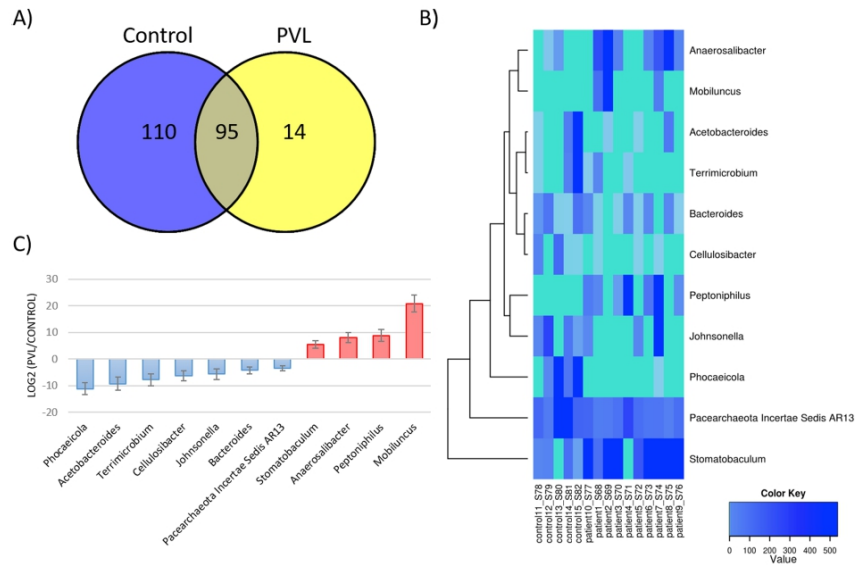
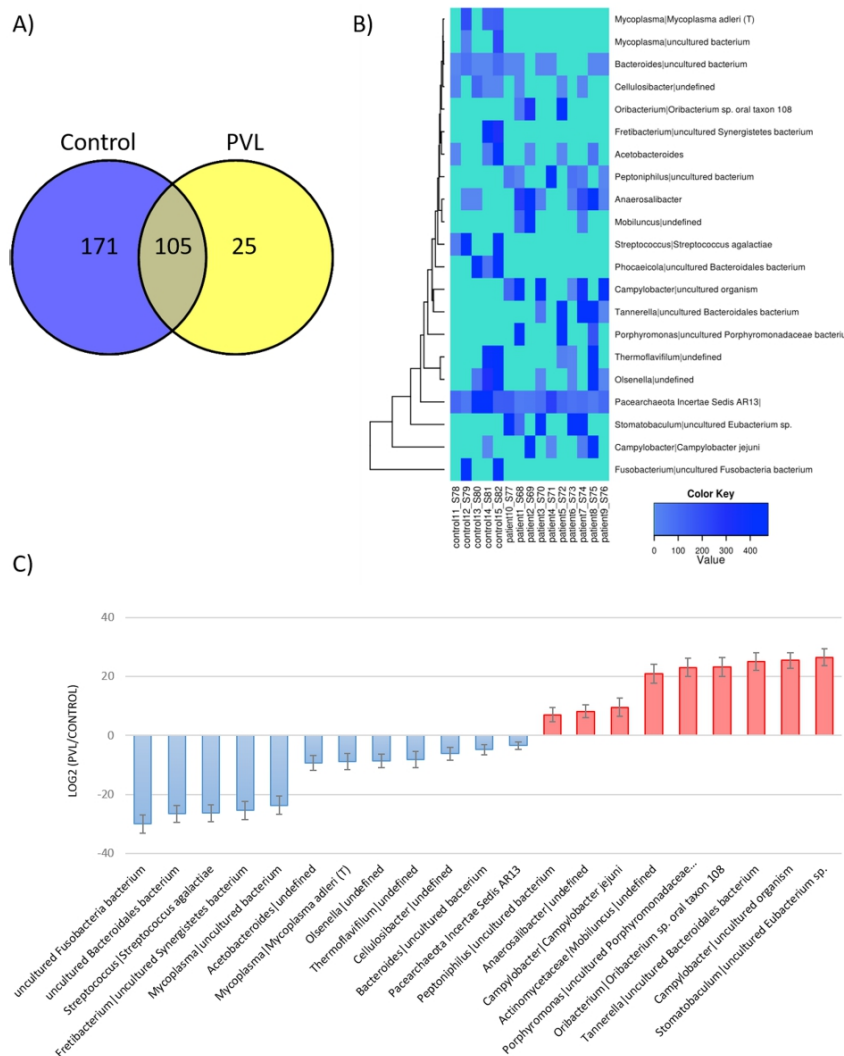


Fig. 3. Differently abundant genera between oral samples from PVL patients and healthy controls. (A) Venn diagram summarizing the distribution of genera along groups. (B) Clustering of the differentially distributed genera along samples. (C) Log2 fold change of the abundances of genera showing significant difference between PVL and control at a false discovery rate of 5%.

*Pacearchaeota Incertae Sedis AR13*, *Bacteroides*, *Johnsonella*, *Cellulosibacter*, *Terrimicrobium*, *Acetobacteroides*, and *Phocaeicola*, whereas PVL patients were enriched in *Mobiluncus*, *Peptoniphilus*, *Anaerosalibacter*,

and *Stomatobaculum* genera (Fig. 3B and 3C). At species level, 171 OTUs were found to be exclusive of healthy samples, whereas 25 were exclusively present in PVL (Fig. 4A). In this



**Fig. 4.** Differently abundant species between oral samples from PVL patients and healthy controls. (A) Venn diagram summarizing the distribution of species along groups. (B) Clustering of the differentially distributed species along samples. (C) Log<sub>2</sub> fold change of the abundances of species showing significant difference between PVL and control at a false discovery rate of 5%.

case, the differential distribution analysis revealed that oral samples from PVL were significantly enriched in *Oribacterium* sp. oral taxon 108, *Campylobacter jejuni*, uncultured *Eubacterium* sp., *Campylobacter*, *Tannerella*, *Porphyromonas*, *Peptoniphilus*, and undefined *Mobiluncus* and *Anaerostipes* bacteria (Fig. 4B and 4C). On the other hand, healthy samples were significantly enriched in *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma adleri* (T), uncultured *Fusobacteria*, *Bacteroidales*, *Synergistetes*,

*Mycoplasma*, *Bacteroides*, and undefined *Acetobacteroides*, *Olsenella*, *Thermoanaerobacterium*, *Cellulosibacter*, and *Pacearchaeota Incertae Sedis AR13*.

**Discussion**

Human oral cavity harbors the second most abundant microbiota after the gastrointestinal tract. As of March 2021, the expanded Human

Oral Microbiome Database (eHOMD) contains information of 775 prokaryotic species, where 70% are cultivable, and 30% belong to the uncultivable class of microorganisms. These hidden oral micro-inhabitants exhibit a direct influence on human health, from host's metabolism to immune responses. Altered oral microbiota has been observed in a wide range of diseases, including diabetes, bacteremia, endocarditis, cancer, autoimmune disease and atherosclerosis [45–49]. Therefore, it becomes crucial to understand the oral microbial diversity and how it fluctuates under diseased/perturbed conditions.

In this study, we characterized oral microbial communities of PVL patients and compared it with those of disease free, age-matched controls. In terms of overall diversity, the average number of observed OTUs found was significantly higher for healthy donors than for PVL. In concordance with our results, reduction in oral microbial diversity have been consistently reported in other oral diseases such as caries, recurrent aphthous stomatitis, oral lichen planus, and nasopharyngeal carcinoma [50–52]. We also found a high inter-individual variability, observed between microbiomes of the participants in our study. These variations have been repeatedly reported in publications on oral microbiome [52–54], which makes it challenging to define what constitutes the 'core' oral microbiome at low taxonomic ranks. At phylum level, *Firmicutes* (36.7%), *Bacteroidetes* (17.1%), *Proteobacteria* (17.1%), *Actinobacteria* (11.6%), *Spirochaetes* (7.9%) and *Fusobacteria* (5.2%) have been reported to constitute the 96% of the total oral bacteria [55] which is in consonance with the most abundant phyla found for both groups in our study.

The investigation carried out by Bik et al. 2010 further extends core microbiome at the genus level. Accordingly, the major constituents of the core microbiome of oral cavity include *Granulicatella*, *Streptococcus*, and *Veillonella* of *Firmicutes*; *Campylobacter*, *Cardiobacterium*, *Haemophilus*, *Neisseria* of *Proteobacteria*; *Actinomyces*, *Atopobium*, *Corynebacterium*, *Rothia* of *Actinobacteria*; *Bergeyella*, *Capnocytophaga*, *Prevotella* of *Bacteroidetes*; TM7, and *Fusobacterium* [56]. However, differences can be found between studies, since many factors, including smoking habits, diet, and varying geographical and climatic conditions significantly alter the oral microbiota, making difficult the comparisons [57]. In our study, these bacteria were the most frequently detected genera in all the patients included, except for *Cardiobacterium*, *Actinomyces*, *Atopobium*, *Bergeyella* and *Capnocytophaga*, which were less frequently detected than *Gemella*, *Leptotrichia*, or *Porphyromonas*. In addition, archaea were also detected, which has been previously reported in the oral cavity [58,59]. The presence of *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Filifactor*, *Dialister*, *Candidatus Carsonella*, *Alloprevotella*, *Treponema*, and *Gemmata* was also remarkable in healthy donors, whereas PVL patients were enriched in *Aggregatibacter*. This genus is often found in association with localized aggressive periodontitis and has been seen to modulate the host immune response through CDT, leukotoxin, and LPS [60]. In consonance, the pathophysiological inflammatory responses associated to *Aggregatibacter* in periodontal disease could also be of relevance for PVL. In addition to the differences exposed in overall microbiome profiles, we also identified several OTUs that were significantly over-represented in PVL or healthy subgroups. Of note, *Oribacterium* sp. oral taxon 108 and *Campylobacter jejuni* were found more abundant in PVL patients. *Oribacterium* sp. oral taxon 108 is a strictly anaerobic microbe that was recently found to be more abundant in saliva samples from acute leukemia patients than in healthy controls [61]. On its regard, *Campylobacter jejuni* has been shown to promote intestinal inflammation and colorectal tumorigenesis through the action of CDT, which has DNA damage potential [62]. Moreover, uncultured *Eubacterium*, *Tannerella* and *Porphyromonas* were also more abundant in PVL patients than in healthy donors. Unculturable *Eubacterium* has been reported as a putative periodontal pathogen [54] whereas *Tannerella* and *Porphyromonas* have been associated to periodontitis and head and neck cancers [63–65]. On the contrary, several archaea and bacteria were found to be enriched in healthy donors. Interactions between different microbial species are increasingly recognized as important determinants of microbial colonization patterns

since these interactions could determine the composition of the oral microbiome, acting with probiotic potential [66]. For instance, *Streptococcus salivarius* has been reported to produce inhibitory molecules that provide antimicrobial activity against *Streptococcus pneumoniae* [67].

To date, numerous articles have focused on OSCC microbiome, but the literature is sparse about the microbiome associated to oral leukoplakia [68]. Amer and colleagues compared swabs from oral leukoplakia to contralateral healthy site and controls [69]. In consonance with our results, healthy controls exhibited greater richness than oral leukoplakia patients. However, oral leukoplakia patients reveal differences between the oral leukoplakia and the healthy donors, with *Rothia mucilaginosa*, *Alloprevotella* sp., *Neisseria meningitidis*, and *Leptotrichia* sp. significantly elevated and *Neisseria oralis*, *Streptococcus infantis*, and *Lautropia mirabilis* significantly diminished in oral leukoplakia compared to control [69]. Another study conducted in saliva samples concluded that the microbiome of oral leukoplakia patients had *Haemophilus* significantly elevated and *Bacillus* and *Abitrophia* significantly decreased compared to controls [70]. The diverse results reported might seem discouraging, but as aforementioned, many factors, including sampling, smoking habits, alcohol consumption, diet or geographical and climatic conditions hamper a reliable comparison. For instance, smoking has been reported to have more significant impact on community structure than whether the sample was recovered from oral leukoplakia [69]. Although smoking is less frequent in PVL patients than in other oral leukoplakias, a 30% of the PVL patients included in this study were smokers with severe or moderate dysplasia who developed OSCC during the follow-up.

To the best of our knowledge, this is the first study investigating the oral microbiome alterations in PVL. As with other studies comparing disease versus healthy microbiome, it is not possible to say whether the microbial alterations found are the cause or the consequence of the disease. In addition, it shows limitations regarding the limited sample size and the tracking of factors like the oral hygiene and periodontal status. As a result, further longitudinal studies with larger sample size and animal model studies are needed to clarify the role of microbiome in PVL development. Given that the diagnosis of PVL is an issue of debate in numerous scientific papers, the identification of oral microbiota-based biomarkers can be extremely helpful, at least when talking about the aetiology of this unknown disorder. Additionally, further studies could also determine if oral microbiome have a role stratifying PVL patient outcomes.

## Conclusion

Using a 16S rRNA gene sequencing-based approach, oral microbial dysbiosis was found to be a common state in patients with PVL. Loss of diversity and enrichment of pathogens such as *Oribacterium* sp. oral taxon 108, *Campylobacter jejuni*, *Eubacterium* sp., *Tannerella*, or *Porphyromonas* may be important risks for PVL development. A better understanding of the role of oral microbiome in oral leukoplakias could direct to novel non-invasive diagnostic and prognostic options, as well as to more personalized treatments and microbiome-targeted therapeutic interventions.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

This work was supported by PI19/00790 from Fondo de Investigación Sanitaria, ISCIII (PI: Jose Bagan), CB16/12/00350 from CIBERONC and IDI-2020-133875-a from MICINN.

## Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2021.105404>.

## References

- [1] Hansen LS, Olson JA, Silverman Jr S. Proliferative verrucous leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;60(3):285–98.
- [2] Proaño-Haro A, Bagan L, Bagan JV. Recurrences following treatment of proliferative verrucous leukoplakia: a systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 2021;25. <https://doi.org/10.1111/jop.13178>. Epub ahead of print. PMID: 33765364.
- [3] Ramos-García P, González-Moles Miguel Ángel, Weber Mello Fernanda, Bagan Jose V, Warnakulasuriya S. Malignant transformation of oral proliferative verrucous leukoplakia: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis*. 2021. <https://doi.org/10.1111/odi.13831>.
- [4] Gandolfo S, Castellani R, Pentenero M. Proliferative verrucous leukoplakia: a potentially malignant disorder involving periodontal sites. *J Periodontol* 2009;80(2):274–81.
- [5] Upadhyaya JD, Fitzpatrick SG, Islam MN, Bhattacharyya I, Cohen DM. A retrospective 20-year analysis of proliferative verrucous leukoplakia and its progression to malignancy and association with high-risk human papillomavirus. *Head Neck Pathol* 2018;12(4):500–10.
- [6] Warnakulasuriya S, Kujan O, Aguirre-Urizar JM, Bagan JV, González-Moles MÁ, Kerr AR, et al. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. *Oral Dis*. 2020.
- [7] Villa A, Menon RS, Kerr AR, De Abreu Alves F, Guolo A, Ojeda D, Woo SB. Proliferative leukoplakia: proposed new clinical diagnostic criteria. *Oral Dis* 2018;24(5):749–60.
- [8] Bagan J, Murillo-Cortés J, Poveda-Roda R, Leopoldo-Rodado M, Bagan L. Second primary tumors in proliferative verrucous leukoplakia: a series of 33 cases. *Clin Oral Invest* 2020;24(6):1963–9.
- [9] García-Vidal R, Moya A, Bagan JV, Pérez-Brocail V. Retrospective case-control study of viral pathogen screening in proliferative verrucous leukoplakia lesions. *Clin Otolaryngol* 2014;39(5):272–80.
- [10] Fettig A, Pogrel MA, Silverman Jr S, Bramanti TE, Da Costa M, Regezi JA. Proliferative verrucous leukoplakia of the gingiva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontol* 2000;90(6):723–30.
- [11] Silverman Jr S, Gorsky M. Proliferative verrucous leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontol* 1997;84(2):154–7.
- [12] Bagan JV, Jimenez Y, Sanchis JM, Poveda R, Millan MA, Murillo J, et al. Proliferative verrucous leukoplakia: high incidence of gingival squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2003;32(7):379–82.
- [13] Bagan JV, Jimenez-Soriano Y, Diaz-Fernandez JM, Murillo-Cortés J, Sanchis-Bielsa JM, Poveda-Roda R, Bagan L. Malignant transformation of proliferative verrucous leukoplakia to oral squamous cell carcinoma: a series of 55 cases. *Oral Oncol* 2011;47(8):732–5.
- [14] Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I, Dekkers E, van der Voort M, Schneider JHM, Piceno YM, DeSantis TZ, Andersen GL, Bakker PAHM, Raaijmakers JM. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science* 2011;332(6033):1097–100.
- [15] Manor O, Dai CL, Kornilov SA, Smith B, Price ND, Lovejoy JC, Gibbons SM, Magis AT. Health and disease markers correlate with gut microbiome composition across thousands of people. *Nat Commun* 2020;11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18871-1>.
- [16] Durack J, Lynch SV. The gut microbiome: relationships with disease and opportunities for therapy. *J Exp Med*. 2019;216(1):20–40.
- [17] Zhan Yu, Chen P-J, Sadler WD, Wang F, Poe S, Núñez G, Eaton KA, Chen GY. Gut microbiota protects against gastrointestinal tumorigenesis caused by epithelial injury. *Cancer Res* 2013;73(24):7199–210.
- [18] Bonnet M, Buc E, Sauvanet P, Darcha C, Dubois D, Pereira B, Dechelotte P, Bonnet R, Pezet D, Darfeuille-Michaud A. Colonization of the human gut by *E. coli* and colorectal cancer risk. *Clin Cancer Res* 2014;20(4):859–67.
- [19] Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, Tomkovich S, Uronis JM, Fan T-J, Campbell BJ, Abujamel T, Dogan B, Rogers AB, Rhodes JM, Stintzi A, Simpson KW, Hansen JJ, Keku TO, Fodor AA, Jobin C. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 2012;338(6103):120–3.
- [20] Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol* 2014;12(10):661–72.
- [21] Zitvogel L, Galluzzi L, Viaud S, Vétizou M, Dillière R, Merad M, et al. Cancer and the gut microbiota: an unexpected link. *Sci Transl Med*. 2015;7(271). 271ps1–271ps1.
- [22] Vivarelli S, Salemi R, Candido S, Falzone L, Santagati M, Stefani S, et al. Gut microbiota and cancer: from pathogenesis to therapy. *Cancers (Basel)* 2019;11(1):38.
- [23] Mima K, Nakagawa S, Sawayama H, Ishimoto T, Imai K, Iwatsuki M, Hashimoto D, Baba Y, Yamashita Y-I, Yoshida N, Chikamoto A, Baba H. The microbiome and hepatobiliary-pancreatic cancers. *Cancer Lett* 2017;402:9–15.
- [24] Kwa M, Plottel CS, Blaser MJ, Adams S. The intestinal microbiome and estrogen receptor-positive female breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2016 Aug;108(8).
- [25] Shapira I, Sultan K, Lee A, Taioli E. Evolving concepts: how diet and the intestinal microbiome act as modulators of breast malignancy. *ISRN Oncology* 2013;2013:1–10.
- [26] Ghilzandeh P, Elami H, Yousefi M, Asgharzadeh M, Aghazadeh M, Kafili HS. Role of oral microbiome on oral cancers, a review. *Biomed Pharmacother* 2016;84:552–8.
- [27] Palefsky JM, Silverman S, Abdel-Salaam M, Daniels TE, Greenspan JS. Association between proliferative verrucous leukoplakia and infection with human papillomavirus type 16. *J Oral Pathol Med* 1995;24(5):193–7.
- [28] Campisi G, Giovannelli L, Ammatuna P, Capra G, Colella G, Di Libertò C, Gandolfo S, Pentenero M, Carozzo M, Serpico R, D'Angelo M. Proliferative verrucous vs conventional leukoplakia: no significantly increased risk of HPV infection. *Oral Oncol* 2004;40(8):835–40.
- [29] Johannsen A, Susin C, Gustafsson A. Smoking and inflammation: evidence for a synergistic role in chronic disease. *Periodontol* 2000 2000;64(1):111–26.
- [30] Bullon P, Newman HN, Battino M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontol* 2014;64(1):139–53.
- [31] Tezal M, Sullivan MA, Hyland A, Marshall JR, Stoler D, Reid ME, Loree TR, Rigual NR, Merziani M, Hauck L, Lillis C, Wactawski-Wende J, Scannapieco FA. Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2009;18(9):2406–12.
- [32] Cerero-Lapiedra R, Baladé-Martínez D, Moreno-López L-A, Esparza-Gómez G, Bagan JV. Proliferative verrucous leukoplakia: a proposal for diagnostic criteria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010 Nov;15(6):e839–45.
- [33] Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol*. 2008;37(3):127–33.
- [34] Llorens C, Soriano B, Trilla-Fuertes L, Bagan L, Ramos-Ruiz R, Gamez-Pozo A, Peña C, Bagan JV. Immune expression profile identification in a group of proliferative verrucous leukoplakia patients: a pre-cancer niche for oral squamous cell carcinoma development. *Clin Oral Invest* 2021;25(5):2645–57.
- [35] Herreros-Pomares A, Llorens C, Soriano B, Bagan L, Moreno A, Calabuig-Fariñas S, Jantus-Lewintre E, Bagan J. Differentially methylated genes in proliferative verrucous leukoplakia reveal potential malignant biomarkers for oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2021;116:105191. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2021.105191>.
- [36] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108(Supplement\_1):4516–22.
- [37] Informatics B. FastQC: a quality control tool for high through sequence data: 2015. Available from: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- [38] Schmeider R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 2011;27(6):863–4.
- [39] Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 2012;28(23):3150–2.
- [40] Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Poiras-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucl Acids Res* 2014;42(D1):D633–42.
- [41] Chen Y, Ye W, Zhang Y, Xu Y. High speed BLASTN: an accelerated MegaBLAST search tool. *Nucl Acids Res* 2015;43(16):7762–8.
- [42] Futami R, Muñoz-Pomer A, Vuu JM, Dominguez-Escribà L, Covelli L, Bernet GP, et al. GPRO: the professional tool for management, functional analysis and annotation of omic sequences and databases. *Biotechniques* 2011;51(May 2014):1–5.
- [43] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 2014;15(12). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
- [44] Ondov BD, Bergman NH, Phillippy AM. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinf* 2011;12(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385>.
- [45] Ganesan SM, Joshi V, Fellows M, Dabdoub SM, Nagaraja HN, O'Donnell B, Deshpande NR, Kumar PS. A tale of two risks: smoking, diabetes and the subgingival microbiome. *ISME J* 2017;11(9):2075–89.
- [46] Long J, Cai Q, Steinwandel M, Hargreaves MK, Bordenstein SR, Blot WJ, Zheng W, Shu XO. Association of oral microbiome with type 2 diabetes risk. *J Periodont Res* 2017;52(3):636–43.
- [47] Zhang S, Kong C, Yang Y, Cai S, Li X, Cai G, Ma Y. Human oral microbiome dysbiosis as a novel non-invasive biomarker in detection of colorectal cancer. *Theranostics* 2020;10(25):11595–606.
- [48] Liu X-R, Xu Q, Xiao J, Deng Y-M, Tang Z-H, Tang Y-L, Liu L-S. Role of oral microbiota in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2020;506:191–5.
- [49] Ruff WE, Greiling TM, Kriegl MA. Host-microbiota interactions in immune-mediated diseases. *Nat Rev Microbiol* 2020;18(9):521–38.
- [50] Duran-Pinedo AE. Metatranscriptomic analyses of the oral microbiome. *Periodontol* 2000 2021;85(1):28–45.
- [51] Debelius JW, Huang T, Cai Y, Ploner A, Barrett D, Zhou X, Xiao X, Li Y, Liao J, Zheng Y, Huang G, Adami H-O, Zeng Yi, Zhang Z, Ye W, Bik H, Heng N. Subspecies niche specialization in the oral microbiome is associated with nasopharyngeal carcinoma risk. *mSystems* 2020;5(4). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00065-20>.
- [52] Hijiiri K, Morrison RW, Mukhopadhyaya I, Martin B, Gemmell M, Shaw S, Santoro F. Oral bacterial diversity is inversely correlated with mucosal inflammation. *Oral Dis* 2020;26(7):1566–75.

- [53] Matsha TE, Prince Y, Davids S, Chikte U, Erasmus RT, Kengne AP, Davison GM. Oral microbiome signatures in diabetes mellitus and periodontal disease. *J Dent Res* 2020;99(6):658–65.
- [54] Ye C, Xia Z, Tang J, Khenwong T, Kapila Y, Kuraji R, Huang P, Wu Y, Kobayashi H. Unculturable and culturable periodontal-related bacteria are associated with periodontal inflammation during pregnancy and with preterm low birth weight delivery. *Sci Rep* 2020;10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72807-9>.
- [55] Verma D, Garg PK, Dubey AK. Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol* 2018;200(4):525–40.
- [56] Bik EM, Long CD, Armitage GC, Loomer P, Emerson J, Mongodin EF, Nelson KE, Gill SR, Fraser-Liggett CM, Relman DA. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J* 2010;4(8):962–74.
- [57] Li J, Quinque D, Horz H-P, Li M, Rzheritskaya M, Raff JA, Hayes MG, Stoneking M. Comparative analysis of the human saliva microbiome from different climate zones: Alaska, Germany, and Africa. *BMC Microbiol* 2014;14(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0316-1>.
- [58] Lepp PW, Brinig MM, Overmeyer CC, Palm K, Armitage GC, Relman DA. Methanogenic Archaea and human periodontal disease. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101(16):6176–81.
- [59] Horz H-P. Archaeal lineages within the human microbiome: absent, rare or elusive? *Life (Basel, Switzerland)* 2015;5(2):1333–45.
- [60] Herbert BA, Novince CM, Kirkwood KL. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. *Mol oral Microbiol* 2016;31(3):207–27.
- [61] Shen Z, Gu X, Cao H, Mao W, Yang L, He M, Zhang R, Zhou Y, Liu K, Wang L, Liu L, Yu J, Yin L. Characterization of microbiota in acute leukemia patients following successful remission induction chemotherapy without antimicrobial prophylaxis. *Int Microbiol* 2021;24(2):263–73.
- [62] He Z, Gharaibeh RZ, Newsome RC, Pope JL, Dougherty MW, Tomkovich S, Pons B, Mirey G, Vignard J, Hendrixson DR, Jobin C. *Campylobacter jejuni* promotes colorectal tumorigenesis through the action of cytolethal distending toxin. *Gut* 2019;68(2):289–300.
- [63] Malinowski B, Wesierska A, Zalewska K, Sokolowska MM, Bursiewicz W, Socha M, Osorowski M, Pawlak-Osińska K, Wiciński M. The role of *Tannerella forsythia* and *Porphyromonas gingivalis* in pathogenesis of esophageal cancer. *Infect Agents Cancer* 2019;14(1). <https://doi.org/10.1186/s13027-019-0220-2>.
- [64] Chattopadhyay I, Verma M, Panda M. Role of oral microbiome signatures in diagnosis and prognosis of oral cancer. *Technol Cancer Res Treat* 2019;18: 1533033819867354.
- [65] Hong B-Y, Furtado Araujo MV, Strausbaugh LD, Terzi E, Ioannidou E, Diaz PI. Microbiome profiles in periodontitis in relation to host and disease characteristics. *PLoS One* 2015;10(5).
- [66] Mammen MJ, Scannapieco FA, Sethi S. Oral-lung microbiome interactions in lung diseases. *Periodontol* 2000 2020;83(1):234–41.
- [67] Santagati M, Scillato M, Patané F, Aiello C, Stefani S. Bacteriocin-producing oral streptococci and inhibition of respiratory pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;65(1):23–31.
- [68] Robledo-Sierra J, Ben-Amy DP, Varoni E, Bavarian R, Simonsen JL, Paster BJ, Wade WG, Kerr AR, Peterson DE, Frandsen Lau E. World Workshop on Oral Medicine VII: Targeting the oral microbiome Part 2: Current knowledge on malignant and potentially malignant oral disorders. *Oral Dis* 2019;25(S1):28–48.
- [69] Amer A, Galvin S, Healy CM, Moran GP. The microbiome of potentially malignant oral leukoplakia exhibits enrichment for fusobacterium, leptotrichia, campylobacter, and Rothia species. *Front Microbiol* 2017;8:2391.
- [70] Hu X, Zhang Q, Hua H, Chen F. Changes in the salivary microbiota of oral leukoplakia and oral cancer. *Oral Oncol* 2016;56:e6–8.