

Programa de Doctorado.  
BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS  
TECNOLOGÍAS EN SALUD.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## Tesis doctoral

# **Microbiota y aspectos inmunológicos relacionados con el tratamiento con terapia dirigida en pacientes con melanoma irresecable o metastásico**

Memoria presentada por la Licenciada **Mora Guardamagna** para  
optar por el título de Doctor de la Universidad de Málaga

Director

**Miguel Ángel Berciano Guerrero**

Tutor

**Antonio Rueda Domínguez**


Málaga, 2024





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTORA: Mora Guardamagna

 <https://orcid.org/0000-0002-2193-2670>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

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

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)



*A mis ángeles de la guarda, Fito, Nano y Susanita.*

*“On ne voit bien qu'avec le coeur.*

*L'essentiel est invisible pour les yeux.”*

*-Antoine de Saint-Exupéry*



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# AGRADECIMIENTOS

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

A mi director de tesis y gran mentor, Miguel, gracias por haber confiado en mí para este proyecto. Porque tu apoyo ha sido siempre incondicional, con palabras de ánimo, consejos, y marcando mi camino para que pueda convertirme en una mejor oncóloga.

A mi tutor de tesis, Antonio, agradecida por tus enseñanzas durante la residencia y por acompañarme en este camino.

Al jefe de la UGCI de Málaga, Emilio Alba, y a todos los profesionales que conforman la unidad, incluidos adjuntos, residentes, enfermeros, secretarias y auxiliares. Gracias por ayudarme a transitar el duro camino de la residencia y por darme una nueva familia lejos de mi país.

A todo el equipo de IBIMA y CIMES, en especial a Rocío, Juanlu, Maribel e Isabel, por sus recomendaciones y contribuciones a mi proyecto.

To Caroline Robert, you are an amazing mentor, who transmits an unexplicable passion for work, research and dermatooncology as a whole. Thank you for your trust in me and for guiding me in my career.

Mención especial a mi familia, porque aunque los 12000 km se sienten todos los días, me acompañan y apoyan en todos mis proyectos para que pueda seguir cumpliendo mis sueños.

A mi querido Manu, por ser mi hogar a donde quiera que vaya.

A mis amigos, ustedes saben quiénes son mis “personas vitamina”.

Por último, pero no menos importante, a los pacientes y sus familiares, los verdaderos guerreros de este mundo. Gracias, porque más de uno me ha enseñado el valor de la vida. Espero poder devolver con mi trabajo y dedicación aunque sea una milésima parte del cariño recibido.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ABREVIATURAS .....	XIII
RESUMEN.....	XIX
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
I.I Epidemiología .....	3
I.II Diagnóstico .....	7
I.III Factores de riesgo .....	8
I.IV Vías moleculares .....	10
I.V Sistema inmune en melanoma .....	15
I.V.1 Mecanismos de evasión del sistema inmune.....	16
I.V.2 Reactivación inmunitaria .....	17
I.V.2.a Reactivación inmunitaria e inmunoterapia.....	17
I.V.2.b Reactivación inmunitaria e inhibidores de BRAF/MEK.....	18
I.V.3 Biomarcadores pronósticos y predictivos.....	20
I.VI Microbiota .....	21
I.VI.1 Microbiota y carcinogénesis .....	24
I.VI.2 Microbiota y sistema inmune .....	26
I.VI.2.a Microbiota e inmunidad innata .....	27
I.VI.2.b Microbiota e inmunidad adaptativa .....	28
I.VI.3 Microbiota y microambiente tumoral.....	30
I.VI.4 Impacto de la microbiota en tratamientos oncológicos .....	32
I.VI.4.a Microbiota e inmunoterapia .....	32
I.VI.4.b Microbiota y terapias dirigidas a vías moleculares.....	36
<b>II.I HIPÓTESIS.....</b>	<b>43</b>

<b>II.II OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
II.II.1 Objetivos Primarios .....	43
II.II.2 Objetivos Secundarios .....	43
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
III.I Diseño del estudio.....	47
III.II Criterios de inclusión.....	47
III.III Criterios de exclusión.....	48
III.IV Comité de ética.....	48
III.V Consentimiento informado.....	48
III.VI Variables recogidas .....	48
III.VII Ámbito del estudio .....	50
III.VIII Recogida de muestras.....	50
III.IX Estudio de expresión génica en muestras de sangre.....	51
III.IX.1 Extracción de ARN.....	52
III.IX.2 Análisis de la expresión génica en nCounter® de Nanostring.....	53
III.IX.2.a Hibridación del ARN .....	55
III.IX.2.b Purificación, organización y alineación de complejos .....	56
III.IX.2.c Análisis de sondas hibridadas .....	56
III.IX.2.d Análisis molecular y control de calidad .....	56
III.X Estudio de microbiota en heces.....	57
III.X.1 Preparación y análisis de muestras de heces .....	57
III.X.2 Extracción de ADN.....	58
III.X.3 Amplificación de la zona hipervariable del ribosoma 16S.....	58
III.X.4 Purificación de los productos amplificados.....	59
III.X.5 Preparación de librerías.....	59
III.X.5.a Agregado de índices y adaptadores.....	60
III.X.6 Secuenciación .....	60

III.XI Análisis bioinformático .....	60
III.XI.1 Análisis descriptivo de variables clínicas y experimentales, y análisis de supervivencia.....	61
III.XI.2 Análisis de expresión diferencial de genes en sangre, en estado basal a la terapia dirigida y en T1 .....	62
III.XI.3 Inspección de los genes en sangre diferencialmente expresados en longitudinalidad.....	63
III.XI.4 Análisis de microbiota .....	64
III.XI.5 Correlación de genes de expresión inmune y microbiota con supervivencia ..	66
III.XII Seguimiento de pacientes .....	67
III.XIII Limitaciones del estudio .....	67
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>71</b>
IV.I Características clínicas de la población de estudio .....	71
IV.II Características analíticas de la población de estudio .....	74
IV.III Variables relacionadas con el tratamiento .....	74
IV.IV Análisis de supervivencia .....	76
IV.V Análisis de expresión génica .....	80
IV.V.1 Estratificación según respuesta .....	81
IV.V.2 Estratificación según tiempo - T0 vs T1 .....	84
IV.VI Análisis de microbiota .....	87
IV.VI.1 Estratificación según respuesta .....	89
IV.VI.1.a Alfa diversidad .....	89
IV.VI.1.b Beta diversidad .....	91
IV.VI.1.c Microorganismos con diferencias significativas entre cohortes .....	92
IV.VI.2 Estratificación según tiempo.....	95
IV.VI.3 Estratificación según presencia de efectos adversos.....	95
IV.VI.3.a Alfa y beta diversidad .....	95
IV.VI.3.b LEfSe .....	97

IV.VII Correlación de genes de reactivación inmune y microbiota con supervivencia. ....	98
<b>V. DISCUSIÓN .....</b>	<b>107</b>
V.I Composición de la microbiota previo y durante el tratamiento con inhibidores BRAF/MEK, y correlación con la respuesta .....	107
V.I.1 Microbiota basal en pacientes con respuesta completa .....	109
V.I.2 Microbiota basal en pacientes sin respuesta completa .....	112
V.II Valor pronóstico y/o predictivo de duración de respuesta a iBRAF/MEK de la microbiota .....	114
V.III Identificación de genes relacionados con reactivación inmune y su correlación con la respuesta.....	116
V.III.1 Firma génica en T0 y T1 en relación a la respuesta .....	121
V.III.2 Análisis longitudinal - el rol de TAP1 y PSMB8 .....	125
V.III.3 CCL11 regulado a la baja en respuesta completa .....	127
V.IV Correlación de la expresión génica y la microbiota con supervivencia .....	131
V.V Correlación de variables clínicas con supervivencia .....	134
V.VI Correlación de la composición de la microbiota y variables clínicas en relación a la aparición de toxicidad a terapia dirigida.....	136
V.VII Hipótesis de selección de mejores candidatos a terapia dirigida .....	141
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>147</b>
<i>ANEXO I.....</i>	<i>151</i>
<i>ANEXO II.....</i>	<i>167</i>
<i>BIBLIOGRAFÍA.....</i>	<i>171</i>

# ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Resumen de la evidencia disponible acerca de la microbiota intestinal en pacientes con melanoma metastásico tratados con inmunoterapia.....34

---

**Tabla 2.** Resumen de la evidencia disponible acerca de la microbiota intestinal en pacientes con cáncer colorrectal y mutación de la vía de las MAPK.....37

---

**Tabla 3.** Características generales clínicas, analíticas, y del tratamiento de la población por intención de tratar.....73

---

**Tabla 4.** Análisis univariante de variables clínicas impactando en supervivencia libre de progresión y supervivencia global, en población por protocolo de microbiota....79

---

**Tabla 5.** Análisis univariante en los genes identificados como significativos en los análisis de expresión génica.....99

---

**Tabla 6.** Análisis univariante que correlaciona genes de reactivación inmune y la microbiota asociada a respuesta completa y no respuesta completa con supervivencia global y supervivencia libre de progresión, en la cohorte por protocolo de microbiota.....101

---

**Tabla 7.** Genes relacionados con respuesta inmune identificados a nivel basal en respondedores y no respondedores.....117

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Incidencia y mortalidad del melanoma, ambos sexos, año 2022.....	4
<hr/>	
<b>Figura 2.</b> Escala Fitzpatrick según tipo de piel.....	5
<hr/>	
<b>Figura 3.</b> Vía molecular de proliferación y supervivencia celular BRAF/MEK y vías de resistencia.....	14
<hr/>	
<b>Figura 4.</b> Reactivación del sistema inmune mediada por inhibidores BRAF/MEK...	19
<hr/>	
<b>Figura 5.</b> Actividad de la microbiota en relación a la carcinogénesis, el microambiente tumoral y el sistema inmune .....	23
<hr/>	
<b>Figura 6.</b> Representación del flujo de trabajo en el nCounter ®.....	54
<hr/>	
<b>Figura 7.</b> Representación de la preparación y el análisis de muestras de heces para la microbiota.....	58
<hr/>	
<b>Figura 8.</b> Selección de variables para los análisis univariante y multivariante, y cohorte utilizada en cada análisis.....	67
<hr/>	
<b>Figura 9.</b> Diagrama de cohorte total reclutada, y según la recolección de muestras de sangre y de heces.....	72
<hr/>	
<b>Figura 10.</b> Kaplan-Meier de supervivencia global y libre de progresión.....	76
<hr/>	
<b>Figura 11.</b> Log-rank de supervivencia global y libre de progresión según la presencia o no de progresión en sistema nervioso central y extrapulmonar.....	77

<b>Figura 12.</b> Variabilidad en la expresión génica de pacientes incluidos en el estudio.....	80
<hr/>	
<b>Figura 13.</b> Volcano plot donde se muestra la expresión de genes a tiempo basal..	81
<hr/>	
<b>Figura 14.</b> Heatmap en tiempo basal - T0 - y T1, estratificado según respuesta.....	82
<hr/>	
<b>Figura 15.</b> Heatmap de expresión génica en la cohorte estratificada según la presencia de respuesta completa.....	83
<hr/>	
<b>Figura 16.</b> Heatmap de los 7 genes que se mantienen regulados a la baja en respondedores tanto en T0 como en T1.....	85
<hr/>	
<b>Figura 17.</b> Incremento significativo de los niveles de <i>TAP1</i> y <i>PSMB8</i> en pacientes respondedores, de T0 a T1.....	86
<hr/>	
<b>Figura 18.</b> Abundancia de microorganismos en cada muestra a nivel taxonómico familia, en tiempo basal.....	88
<hr/>	
<b>Figura 19.</b> Abundancia de microorganismos en cada muestra a nivel taxonómico género, en tiempo basal.....	89
<hr/>	
<b>Figura 20.</b> Diversidad alfa en nivel taxonómico familia, según respuesta.....	90
<hr/>	
<b>Figura 21.</b> Diversidad alfa en nivel taxonómico género, según respuesta .....	90
<hr/>	
<b>Figura 22.</b> Diversidad beta en nivel taxonómico familia, según respuesta.....	91
<hr/>	
<b>Figura 23.</b> Diversidad beta en nivel taxonómico género, según respuesta.....	92

<b>Figura 24.</b> Análisis LEfSe en nivel taxonómico familia, según respuesta.....	93
<hr/>	
<b>Figura 25.</b> Análisis LEfSe en nivel taxonómico género, según respuesta.....	94
<hr/>	
<b>Figura 26.</b> Diversidad alfa y beta en nivel taxonómico familia, según la presencia de toxicidad de al menos grado 2.....	96
<hr/>	
<b>Figura 27.</b> Diversidad alfa y beta en nivel taxonómico género, según la presencia de toxicidad de al menos grado 2.....	96
<hr/>	
<b>Figura 28.</b> Análisis LEfSe en nivel taxonómico familia y género, según la presencia de toxicidad de al menos grado 2.....	97
<hr/>	
<b>Figura 29.</b> Forest-plot con análisis multivariante de regresión de Cox analizando factores que impactan supervivencia global y supervivencia libre de progresión...	102
<hr/>	
<b>Figura 30.</b> Box-plot de concentraciones de los genes <i>TAP1</i> y <i>PSMB8</i> en T1 según respuesta.....	104
<hr/>	
<b>Figura 31.</b> Resumen de los hallazgos de nuestros análisis.....	130

# ABREVIATURAS

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# LISTA DE ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**AJCC:** American Joint Committee on Cancer

**ANC:** Recuento Absoluto de Neutrófilos

**BRAF:** V-RAF homólogo B1 del oncogén viral del sarcoma murino

**CCL11:** Quimiocina 11 con motivo C-C

**CDKN2A:** Inhibidor de la Cinasa Dependiente de Ciclina 2A

**CIMES:** Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer

**CMAT:** Células Mieloides Asociadas a Tumor

**CCR:** Cáncer Colorrectal

**CTCAE:** Common Terminology Criteria for Adverse Events

**CTLA-4:** Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico

**CXCR:** Agonista Receptor de Quimiocinas

**DAMPs:** Patrones Moleculares Asociados a Daños

**DCR:** Tasa de Control de la Enfermedad

**dNLR:** Derivada del NLR

**ECOG-PS:** Eastern Cooperative Oncology Group/Performance Status

**EE:** Enfermedad Estable

**EGFR:** Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

**EL:** Buffer de Lisis Eritrocitaria

**EMA:** Agencia Europea del Medicamento

**ERK:** Quinasa regulada por señales extracelulares

**FDR:** Tasa de Descubrimiento Falso

**FDA:** Food and Drug Administration

**FOV:** Fields Of View

**HDL:** Lipoproteínas de alta densidad

**HR:** Hazard Ratio

**IBIMA:** Instituto de Investigación Biomédica

**ICAM:** Molécula de Adhesión Intercelular Leucocitaria

**ICI:** Inhibidores de Puntos de Control Inmunitario

**iBRAF/MEK:** Inhibidores de BRAF/MEK

**IC95%:** Intervalo de Confianza del 95%

**IFN $\gamma$ :** Interferón- $\gamma$

**IgA:** Immunoglobulina A

**IGF:** Factor de Crecimiento similar a la Insulina

**IL:** Interleuquina

**ITGB2:** Subunidad Beta de la Integrina 2

**ITK:** Inhibidores de Tirosín Quinasa

**LAG3:** Gen 3 de Activación de Linfocitos

**LDH:** Lactato Deshidrogenasa

**LDL:** Lipoproteínas de baja densidad

**LEfSe:** Análisis de Efecto Lineal discriminante de tamaño Efectivo

**LSN:** Límite Superior de la Normalidad

**MAPK:** Vía de las Proteína Cinasas Activadas por Mitógenos

**MAT:** Microambiente Tumoral

**MDSC:** Células Supresoras Derivadas de Mieloides

**MEK:** Proteína quinasa activada por mitógenos

**MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad

**mL:** Mililitros

**$\mu$ L:** Microlitros

**MM:** Melanoma Irresecable/Metastásico

**NF1:** Gen de la Neurofibromatosis 1

**NGS:** Next Generation Sequencing

**NK:** Natural Killer

**NLR:** Ratio Neutrófilos/Linfocitos

**NMDS:** Análisis de Escalamiento Multidimensional

**No-RC:** No Respuesta Completa

**NOD:** Dominio de Oligomerización de unión a Nucleótidos

**NR:** No Respondedor

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**OR:** Odds Ratio

**ORR:** Respuesta Objetiva al Tratamiento

**OTU:** Unidad Taxonómica Operativa

**PCR:** Proteína C Reactiva

**PD-1:** Programmed Death 1

**PD-L1:** Ligando del PD-1

**PDGF:** Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas

**PE:** Progresión de la enfermedad

**PI3K:** Fosfoinositol 3-Cinasas

**PLAUR:** Receptor de superficie Activador de Plasminógeno de Uroquinasa

**PSMB8:** Subunidad Beta tipo 8 del Proteasoma

**PTEN:** Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa

**QIIME:** Quantitative Insights Into Microbial Ecology

**RC:** Respuesta Completa

**RCP:** Reacción en Cadena Polimerasa

**RECIST:** Response Evaluation Criteria In Solid Tumors

**R:** Respondedor

**RLT:** Buffer de Tiocianato de Guanidina

**ROS:** Radicales Libres de Oxígeno

**RP:** Respuesta Parcial

**RUVg:** Remove Unwanted Variation Using Control Genes

**SG:** Supervivencia Global

**SLAMF:** Miembro de la familia de moléculas de señalización para la activación linfocítica

**SLP:** Supervivencia Libre de Progresión

**SNC:** Sistema Nervioso Central

**T0:** Tiempo basal

**T1:** Segunda muestra, a los 3 meses

**TAG:** Triacilglicéridos

**TAP1:** Transportador asociado con el Procesamiento de Antígenos 1

**TC:** Tomografía Computada

**TCGA:** The Cancer Genome Atlas

**TERT:** Telomerasa Transcriptasa Inversa

**TGFB:** Factor de Crecimiento Transformante Beta

**Th:** T helper

**TILs:** Linfocitos Infiltrantes de Tumor

**TMB:** Carga Mutacional Tumoral

**TMF:** Trasplante de Microbiota Fecal

**TNF:** Factor de Necrosis Tumoral

**Treg:** Linfocitos T reguladores

**UBE2L3:** Enzima conjugadora de Ubiquitina E2 L3

**UV:** Rayos Ultravioletas

**VEGF:** Factor de Crecimiento Vascular Endotelial

**VPH:** Virus Papiloma Humano

\* Terapia dirigida, tratamiento dirigido e inhibidores de BRAF/MEK se utilizarán  
indistintamente en el transcurso de esta tesis doctoral \*

# RESUMEN

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## BACKGROUND

Metastatic melanoma is the deadliest form of skin cancer, and its incidence and prevalence has been progressively increasing in the last few years. This is due to, on the one hand, increased sun exposure and changes in lifestyle, and on the other hand, improved survival rates. In the era of precision medicine, immune checkpoint inhibitors (ICI) and therapies targeting *BRAF* mutation have managed to change prognosis. Approximately 40-60% of melanoma patients harbor *BRAF* mutations, which is associated with younger age and poorer prognosis. While treatments targeting this oncogenic pathway have shown significant clinical efficacy, recently published clinical trials indicate greater benefits from upfront immunotherapy compared to first-line BRAF/MEK inhibitors. These findings have prompted a shift in our everyday clinical practice, with targeted therapy now primarily reserved in cases where ICIs are contraindicated or for rapidly progressing disease.

Despite the significant clinical improvements achieved with these therapies, most patients eventually develop resistance, making the search of prognostic and predictive biomarkers that enhance therapeutic outcomes an ongoing challenge. In this context, gut microbiota and genes involved in immune activation emerge as promising biomarkers.

Gut microbiota has been associated with carcinogenesis, modulation of the immune system and the tumor microenvironment, as well as influencing response to treatments, including chemotherapy, radiotherapy and ICI. The mechanisms by which the microbiota might promote carcinogenesis include: direct DNA damage as a result of the secretion of bacterial toxins, stimulation of a pro-inflammatory environment by generation of reactive oxygen species, and direct inhibition of the immune system. In addition, gut microbiota has been suggested to alter the tumor

microenvironment and the immune system through the secretion of cytokines and metabolites that modulate regulatory T cells (Tregs), CD8+ and CD4+ T cells, as well as myeloid-derived suppressor cells and macrophages.

Regarding the impact of the gut microbiota in melanoma treatment, the available evidence focuses on ICI-treated patients. Patients that respond to ICI exhibit increased alpha diversity, which represents the diversity of species within a sample, and beta diversity, which comprises the microorganism variability between two samples. In addition, responders tend to exhibit an enrichment of the Firmicutes phylum, while non-responders appear to have an increased abundance of the Bacteroidetes phylum. However, multiple factors can alter the composition of the microbiota, such as diet, exercise, use of antibiotics and the occurrence of treatment-related adverse events such as diarrhea, posing several challenges to understanding its impact on cancer treatment. Strategies involving probiotics or fecal microbiota transplant in order to enhance therapeutic efficacy hold promise for modulating the gut microbiota and potentially improving outcomes.

Although BRAF/MEK inhibitors in melanoma represent one of the first and most significant advances in targeted therapy aiming molecular oncogenic pathways, there is scarce evidence regarding the microbiota in this context. This study explores a novel research area of the gut microbiota and immune reactivation-related genes to understand their impact on patients diagnosed with *BRAF*-mutated metastatic melanoma treated with BRAF/MEK inhibitors in the first-line setting. Our main objective is to search for prognostic or predictive biomarkers to optimize selection of patients that could benefit the most from this treatment, as well as generate hypothesis that could enhance therapeutic outcomes.

# HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

## *Hypothesis*

“Genes associated with immune response identified in blood samples and gut microbiota composition in patients with unresectable or metastatic melanoma treated with BRAF/MEK inhibitors could have prognostic and/or predictive value for treatment response”

## *Primary objectives*

- Determine gut microbiota composition before and during treatment with BRAF/MEK inhibitors in patients with *BRAF*-mutated metastatic melanoma, and correlate it with response.
- Identify microorganisms that are prognostic and/or predictive of duration of response to targeted therapy in *BRAF*-mutated metastatic melanoma.
- Identify immunological biomarkers in blood associated with immune reactivation, before and during treatment with BRAF/MEK inhibitors, and correlate them with response.

## *Secondary objectives*

- Correlate gene expression biomarkers and microbiota with survival.
- Correlate clinical and analytical variables with survival.
- Correlate microbiota composition and clinical variables with treatment-related toxicity.
- Generate hypothesis to optimize selection of candidates to targeted therapy.

## MATERIAL AND METHODS

This observational, prospective study was carried out in the Regional and Virgen de la Victoria University Hospitals, and Institute for Biomedical Investigation (IBIMA) in Malaga, Spain. After approval by the local Ethics Committee in May 2019, 26 patients were recruited between May 2019 and November 2022. All patients provided written informed consent in accordance to the Declaration of Helsinki.

### *Patient selection*

Inclusion criteria were patients over 18 years old, with a diagnosis of *BRAF* V600-mutated unresectable or metastatic melanoma – stage IIIC, IIID or IV, according to the AJCC 8th edition TNM -, and eligible for first-line treatment with BRAF/MEK inhibitors. Previous diagnosis of cancer in the past two years, and uncontrolled autoimmune or infectious disease were exclusion criteria.

### *Disease characteristics and response assessment*

Patient demographic and clinical factors, as well as hematological values, were included for analysis. Inflammatory biomarkers previously identified as prognostic or predictive of response to ICI were also analyzed.

Patients recruited were followed in the medical oncology department every four weeks, or less in case if needed due to toxicity or clinical status. Treatment response was evaluated with computed tomography between weeks 10-14, using the *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (RECIST v1.1) guideline. Objective Response Rate (ORR) was defined as patients who achieved complete response (CR) or partial response (PR). Disease Control Rate (DCR) included ORR and

Stable Disease (SD). Toxicity to targeted therapy was graded using the *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE v5.0) guideline.

The cohort was stratified for analysis into Responders (R) - patients with CR and PR - and Non Responders (NR) - patients with SD and progressive disease (PD) -. In order to identify the genes and the microbiota associated with optimal response to targeted therapy, a second analysis was performed in CR and No-CR, the latter one including PR, SD and PD. Considering previous evidence that highlights better prognosis and prolonged response in BRAF/MEK inhibitor-treated patients who achieve CR, this stratification enhances the identification of microbiota and genes that may potentially impact survival.

### *Sample collection and processing*

Blood and fecal samples were taken before treatment (baseline – T0) and at the first radiological evaluation – 3 months – or progression, whatever happened first (T1). Blood samples were collected in order to measure the expression of genes involved in immune response during BRAF/MEK inhibitors treatment. The samples were processed to obtain RNA, using the RNeasy Plus Universal Mini Kit™ and the QIAamp RNA Blood Mini Kit™, depending on whether the samples were frozen or fresh, respectively.

Stool samples were processed with a column kit to purify bacterial DNA and eliminate residues. The Ion16S™ Metagenomics Kit was used to amplify the hypervariable zone V2-V9 of bacterial 16S ribosomal RNA, and quality and quantity of extracted DNA was measured with Bioanalyzer®. The libraries were created using the Ion Plus Fragment Library kit and the identification codes were added using the Ion Xpress Barcode Adapters 1-96 kit (Thermo Fisher Scientific). The AMPure® XP

beads (Beckman) was used to purify the created libraries. The emulsion and sequencing of the libraries was performed with the Ion Chef and the Ion Torrent S5™ system platform, using the Ion 520™ / 530™ Kit-Chef (Thermo Fisher Scientific) and the Ion 520 chip (Ion 520™ Chip Kit).

### *Statistical analysis*

Statistical analysis was carried out with SPSS® 29.0.1.0 and R studio softwares. A descriptive analysis was carried out for clinical variables. Median and range were calculated for numerical variables, and absolute and relative frequencies for categorical variables. A Shapiro-Wilk test was performed on quantitative variables to test for normality. A likelihood ratio test was used to assess differences between clinical variables and the response variable. ORR and DCR and their corresponding 95% Confidence Intervals (95%CI) were calculated with a binomial test. Overall survival (OS) was calculated from the start of treatment to death from any cause or latest check-up, and progression-free survival (PFS) from the start of treatment till disease progression or latest check-up. Survival curves were estimated with the Kaplan–Meier method and the differences between survival curves were evaluated with log-rank test. Univariate and multivariate Cox-proportional hazards model was performed to evaluate variables impacting PFS and OS. Multivariate model included variables potentially impacting survival, including use of antibiotics during targeted therapy, genes involved in immune response identified as significant in gene expression analysis, and microbiota found enriched in complete-responder patients. Results were presented as Hazards Ratio (HR) and their corresponding 95%CI. Based on the results of the multivariate analysis, a Student's T test was performed to

correlate significant, normally distributed variables in the multivariate analysis with response. Statistical significance was defined as a  $p$ -value of less than 0.05.

### *Gene expression analysis*

Gene expression analysis was carried out with the Nanostring nCounter®, using the nCounter PanCancer Immune Profiling Panel™, which evaluates 770 genes including 24 cell subtypes, 30 tumor-specific antigens, and genes from innate and adaptive immune response. Data obtained was normalized with RUVg (Remove Unwanted Variation Using Control Genes), and analyzed with the nSolver™ Analysis Software 3.0, which performs bioinformatic analyses and quality controls. Final analysis was carried out with Limma™ (Linear Models for Microarray and RNA-Seq). Changes in gene expression were calculated using a logarithmic scale, considering changes over 1 as significant. These analyses were done at baseline and at T1, both on the R and NR cohorts, as well as the CR and No-CR cohorts. Longitudinal analysis from T0 to T1 was performed using the Wilcoxon signed-rank test. A  $p$ -value of less than 0.05 was considered statistically significant.

### *Gut microbiota analysis*

Gut microbiota analysis was carried out with the Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME2) bioinformatics platform, assigning an Operational Taxonomic Unit (OTU) to each sequence based on sequence similarities with UCLUST algorithm. Taxonomy identification was done based on homologies between the sequences obtained and those in the *GreenGenes* database. Alpha diversity was calculated using Shannon and Simpson diversity estimators. Beta diversity was calculated with a non-metric multidimensional scaling (NMDS) based

on Bray-Curtis distance. A LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) analysis, which combines Kruskal-Wallis non-parametric test with linear discriminant analysis, was used to estimate differences among subgroups.

The alpha and beta diversity analyses were performed in the R and NR cohorts, as well as in the CR and No-CR groups, at both T0 and T1. LEfSe analysis was performed only in the CR and No-CR, due to unbalanced subgroups in R and NR. A longitudinal analysis was carried out to analyze differences between T0 and T1.

Another analysis was performed stratifying the cohort according to the occurrence of at least grade 2 treatment-related adverse events, as defined by the CTCAE v5.0. The cut-off point for toxicity analysis was grade 2 to include clinically significant events, and thus identify the microbiota potentially impacting the occurrence of moderate-to-severe toxicity. A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### *Clinical characteristics*

Between May 2019 and November 2022 a total of 26 patients were recruited. Among this cohort, 24 patients provided both blood samples for gene expression analysis, and 20 patients provided both fecal samples for microbiota analysis in optimal conditions. All patients with fecal samples had corresponding blood samples. Among the 6 patients who did not provide fecal samples, 4 had been unable to collect them on time, and 2 had died due to rapidly progressive disease. The 2 patients excluded from gene expression analysis were due to errors in sample

collection and processing. However, all patients (n=26) recruited were included in the descriptive and survival analyses.

Median age of the total cohort was 55 years (range 23-80). Primary resection was carried out in 88.5% (n=23) of patients, with 9 of them receiving adjuvant treatment, mainly nivolumab or pembrolizumab. At start of targeted therapy, 88.5% of patients had an ECOG-PS of 0-1, and 61.5% were stage M1c-d. Treatment-related adverse events were reported in 92.3% of patients, with 46.2% and 23.1% exhibiting events of at least grade 2 and grade 3-4, respectively.

ORR was 76.9% (95%CI 56.4-91) and DCR 92.3% (95%CI 74.9-99.1). At data cut-off, half of the patients (n=13) had progressed on targeted treatment, 34.6% of which had progressed on the central nervous system. Among patients who progressed, only 7 (26.9%) were eligible for second-line treatment.

With a median follow-up of 24.3 months, median OS from start of targeted therapy was 28.9 months (95%CI 19.1-38.7), and median PFS was 15.7 months (95%CI 6-25.4). Progression on the central nervous system was significantly associated with worse OS (HR 5.19, 95%CI 1.34-20.16) and PFS (HR 4.38, 95%CI 1.45-13.24), while extrapulmonary progression was associated with worse PFS (HR 8.22, IC95% 1.91-35.44). A Cox-regression univariate analysis for OS and PFS, including clinical variables, inflammatory biomarkers and treatment-related toxicities was performed in order to identify factors influencing survival. No variables reached statistical significance.

### ***Gene expression results***

Blood samples from 24 patients were analyzed to identify genes associated with immune reactivation that might impact response and prognosis. Of these

patients, 18 (75%) were classified as R - CR and PR -, and 6 (25%) as NR - SD and PD -. At baseline, 49 genes showed a significant  $p$ -value, of which 20 genes were upregulated in R and downregulated in NR, and 29 genes were downregulated in R and upregulated in NR. At T1, 41 genes reached significance, 4 of which were upregulated in R and downregulated in NR, and 37 were downregulated in R and upregulated in NR. However, the adjusted  $p$ -value at both T0 and T1 for the identified genes did not reach significance. Notably, there were seven genes that remained consistently downregulated in the R cohort and upregulated in the NR cohort at both T0 and T1: *LAG3*, *CD36*, *SLAMF7*, *NOD1*, *SLAMF6*, *CXCR1* and *ICAM2*.

In the longitudinal differential expression analysis, only 39 genes were analyzed because 10 genes did not meet the quality standards, failing to reach minimum number of reads. No statistically significant differences were found in longitudinal differential expression from T0 to T1 according to the Wilcoxon signed-rank test. However, when analyzing differential expression of genes from T1 to T0, there were two genes, *TAP1* and *PSMB8*, which exhibited an increase in expression in the R group from T0 to T1.

When stratifying the cohort according to the presence of CR, 5 (20.8%) patients were classified as CR and 19 (79.2%) as No-CR. The analyses identified only one gene, *CCL11*, downregulated in CR at baseline. No statistically significant results were found at T1 among cohorts, nor in longitudinal differential expression analysis.

### *Gut microbiota results*

Fecal samples from 20 patients were analyzed to identify the microbiota composition that might impact response, prognosis and toxicity. A total of 17 (85%) patients were stratified as R and 3 (15%) as NR, and 5 (25%) patients were stratified

as CR and 15 (75%) patients as No-CR. All CR in the microbiota cohort overlapped with CR in the gene expression cohort. Alpha and beta diversity analysis did not find any statistically significant differences between cohorts. LEfSe analysis at baseline, performed in the CR and No-CR groups, revealed an enrichment of members of the phyla Firmicutes, especially family *Lachnospiraceae* and genus *Adlercreutzia*, and Actinobacteria, namely *Coriobacteriaceae*, in CR. An abundance of members of Proteobacteria, family *Pasteurellaceae*, and Firmicutes, genus *Clostridium*, was observed in No-CR.

The analyses at T1 and the longitudinal differential analysis from T0 to T1 showed no significant differences in alpha diversity, beta diversity, nor LEfSe.

A gut microbiota analysis stratifying the cohort by the presence of moderate-to-severe toxicity (at least grade 2) was carried out, with 10 patients included in the toxicity group, and 10 patients in the non-toxicity/grade 1 toxicity group. Genus *Oscillospira* was found enriched in patients who experienced moderate-to-severe treatment-related adverse events, whereas families *Lachnospiraceae*, *Leuconostocaceae*, and *Oxalobacteraceae*, and genus *Gemmiger*, were enriched in the non-toxicity/grade 1 toxicity group.

### *Correlation of genes involved in immune reactivation and gut microbiota to survival*

Univariate analysis performed in the gene expression protocol cohort (n=24) found *SLAMF7* (HR 0.51, IC95% 0.28-0.95), *UBE2L3* (HR 0.34, IC95% 0.12-0.93) and *ITGB2* (HR 0.43, IC95% 0.19-0.96) have an impact on PFS. *SLAMF7* also appeared to have an impact OS, with a HR de 0.49 (IC95% 0.25-0.98). Notably, *SLAMF7* and *UBE2L3* were downregulated in R, while *ITGB2* was upregulated in R.

Genes *TAP1* and *PSMB8*, with increasing levels in R from T0 to T1, did exhibit a significant impact in OS, with a HR of 4.09 (95%CI 1.06-15.81) and 11.6 (95%CI 1.40-96.04), respectively.

Univariate analysis performed in the gut microbiota protocol cohort (n=20), did not find any significant microorganism impacting survival.

Multivariate analysis for survival including family *Lachnospiraceae* - enriched in CR -, use of antibiotics during treatment, and genes *TAP1* and *PSMB8*, found that overexpression of *PSMB8* was an independent factor affecting PFS, with a HR of 8.23 (95% CI 1.05-74.32,  $p=0.045$ ). Despite the increasing levels of *TAP1* and *PSMB8* in R from T0 to T1, Student's T test confirmed gene concentrations of both *TAP1* and *PSMB8* at T1 were significantly higher in the NR subgroup.

## DISCUSSION

### *Gut microbiota and response to targeted therapy*

Previous evidence of gut microbiota in melanoma ICI-treated patients have highlighted an increase in alpha and beta diversity, as well as a predominance of the Firmicutes phylum, in responders - ORR, including CR and PR - to treatment. Our study could not confirm differences in alpha nor beta diversity among CR when compared to No-CR. However, an enrichment of members of the phyla Firmicutes and Actinobacteria was found in CR. Notably, these members include families *Lachnospiraceae* and *Coriobacteriaceae*, and genus *Adlercreutzia*, which have been previously associated with an immunomodulatory, antitumoral role, by stimulation of T-cells and inhibition of proinflammatory cytokines, such as NF- $\kappa$ B. This suggests

they might have a role in promoting immune system reactivation, thus enhancing response to treatment and contributing to better outcomes.

On the contrary, No-CR patients exhibited an abundance of family *Pasteurellaceae* and genus *Clostridium*, which include species previously associated to serious infections, such as *Pasteurella multocida*, *Clostridium difficile* and *Clostridium ramosum*. This reinforces the hypothesis that they might be facilitating an inflammatory environment, thus leading to a detrimental effect on response and prognosis. However, there is contradictory data that show *Clostridium* might be present in melanoma patients that respond to ICI, or that certain species of *Adlercreutzia*, enriched in our CR-cohort, can be enriched in non-responders. As a result, further investigations are needed to clarify the role of this microorganisms in BRAF/MEK inhibitors-treated patients.

Survival analysis correlating PFS and OS with the gut microbiota did not reach significant results, probably due to our limited sample size. However, it must be highlighted that CR has been associated with prolonged survival in BRAF/MEK inhibitor-treated melanoma patients. Therefore, the enrichment of microorganisms observed in patients with CR suggests a potential role of *Lachnospiraceae*, *Coriobacteriaceae*, and *Adlercreutzia* in promoting this optimal response, thereby contributing to increased survival.

### *Gene expression and response to targeted therapy*

Considering gene expression analysis, it is worth mentioning the role of the seven genes that were consistently downregulated in R at both T0 and T1: *LAG3*, *CD36*, *SLAMF7*, *NOD1*, *SLAMF6*, *CX3CR1* and *ICAM2*. Although evidence shows contradictions, and suggest a protumoral and antitumoral role for these genes, they

have been mostly associated with immunosuppression and tumor progression. Previous studies correlate them with CD8+ T-cell suppression, Tregs promotion, or activation of molecular pathways such as MAPK, all of which lead to increased carcinogenesis and immune tolerance. As a result, strategies targeting these genes in BRAF/MEK inhibitor-treated melanoma patients emerge as an interesting approach.

As regards genes *TAP1* and *PSMB8*, which showed increasing levels from T0 to T1 in the responder cohort, it is noteworthy that concentration levels at T1 remained higher in the non-responder cohort. Notably, these genes were associated with poor prognosis in univariate analysis, and *PSMB8* was found to be an independent factor impacting PFS in multivariate analysis. Considering the available literature, they have been mostly associated to better response and prognosis in melanoma patients treated with immunotherapy. Nonetheless, a protumoral activity of *TAP1*, which favours resistance to MEK inhibitors, has been reported in pancreatic cancer. Our findings could be interpreted in the context of resistance development to BRAF/MEK inhibition. The increasing levels in responders might represent a mechanism of resistance developed by the tumor. This could explain its correlation with worse prognosis and survival, as well as the higher concentration levels found in non-responders.

*CCL11*, the only gene found downregulated in patients with CR and upregulated in No-CR at baseline, has also been associated to an antitumoral function in melanoma. However, evidence underscores its role as a promotor of the ERK pathway in certain tumors, such as prostate cancer and non-small cell lung cancer, as well as its contribution to the epithelial-mesenchymal transition. This

supports our findings as the role of *CCL11* in the ERK pathway could potentially contribute to resistance mechanisms in the No-CR patients.

### *Gut microbiota and treatment-related toxicity*

Focusing on the toxicity-associated microbiota analysis, it is intriguing that genus *Oscillospira*, enriched in patients with moderate-to-severe treatment-related adverse events, has been associated with antiinflammatory properties. Previous studies described reduced levels of this microorganism in patients with obesity, lung cancer or inflammatory bowel disease. In our study, most frequent adverse events of at least grade 2 included pyrexia, asthenia and diarrhea, which contribute to an inflammatory environment. In consequence, whether *Oscillospira* is counteracting the proinflammatory environment associated with these adverse events, or if it is promoting toxicity in BRAF/MEK inhibitor-treated patients through an unknown mechanism, remains to be fully elucidated.

On the other hand, the microbiota found enriched in the cohort with no-toxicity/ toxicity grade 1 were families *Lachnospiraceae*, *Leuconostocaceae* and *Oxalobacteraceae*, and genus *Gemmiger*. The microorganisms *Lachnospiraceae*, *Leuconostocaceae* and *Gemmiger* are known for their butyric-acid producing properties. Butyric acid has antiinflammatory properties, by inhibiting the secretion of several cytokines such as TNF $\alpha$ , IL-6 and NF $\kappa$ B. As a result, its use has been proposed as a strategy to reduce inflammation in radiotherapy-treated patients or in patients affected with Crohn's disease. As regards *Oxalobacteraceae*, this bacteria has been associated with a carcinogenic role in cholangiocarcinoma and esophageal cancer, but there is no evidence on its role in melanoma patients. Further research is needed to clarify our findings.

Overall, a pattern of antiinflammatory and immunomodulatory properties was seen in the gut microbiota associated with CR, as well as in the no-treatment related toxicity/toxicity grade 1 cohort. On the contrary, immunosuppression and proinflammatory features were seen in the gut microbiota found in No-CR patients, as well as in the upregulated genes in NR and No-CR. Consequently, targeting the identified microorganisms and genes might constitute interesting strategies in metastatic melanoma treated with BRAF/MEK inhibitors.

## CONCLUSIONS

In conclusion, the presence of *Lachnospiraceae*, *Coriobacteriaceae*, and *Adlercreutzia* in patients that exhibited CR to targeted therapy - microorganisms previously identified in patients with melanoma treated with immunotherapy - suggest these microorganisms might have a prognostic role. Although the analyses could not confirm their impact on survival, the correlation of CR to prolonged survival favours this hypothesis. Their predictive role in metastatic melanoma treated with BRAF/MEK inhibitors needs to be further studied in larger trials.

Genes involved in immune reactivation, specifically *TAP1* and *PSMB8*, appear to have both a prognostic and predictive role. These genes were found to negatively impact survival and might represent mechanisms of resistance to MEK inhibition, as found in pancreatic cancer, thereby suggesting a negative predictive role in patients treated with BRAF/MEK inhibitors. In addition, there were seven genes previously associated with immunosuppression and T-cell tolerance - *LAG3*, *CD36*, *SLAMF7*, *NOD1*, *SLAMF6*, *CXCR1* and *ICAM2* -, which remained consistently downregulated in responders at baseline and during targeted therapy. This suggests their negative

prognostic role, and reinforce the hypothesis that they might lead to worse outcomes when they are overexpressed.

This is the first study to investigate the potential impact of gut microbiota and genes associated with immune reactivation in response, toxicity, and survival in *BRAF*-mutated melanoma patients treated with BRAF/MEK inhibitors. The identification of microorganisms that can be modulated through diet, probiotics or fecal microbiota transplant, and genes that might be prognostic or predictive of response, can generate hypothesis to enhance therapeutic outcomes in a personalized manner. Its potential applicability requires further research with larger cohorts to corroborate our results.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

# I. INTRODUCCIÓN

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

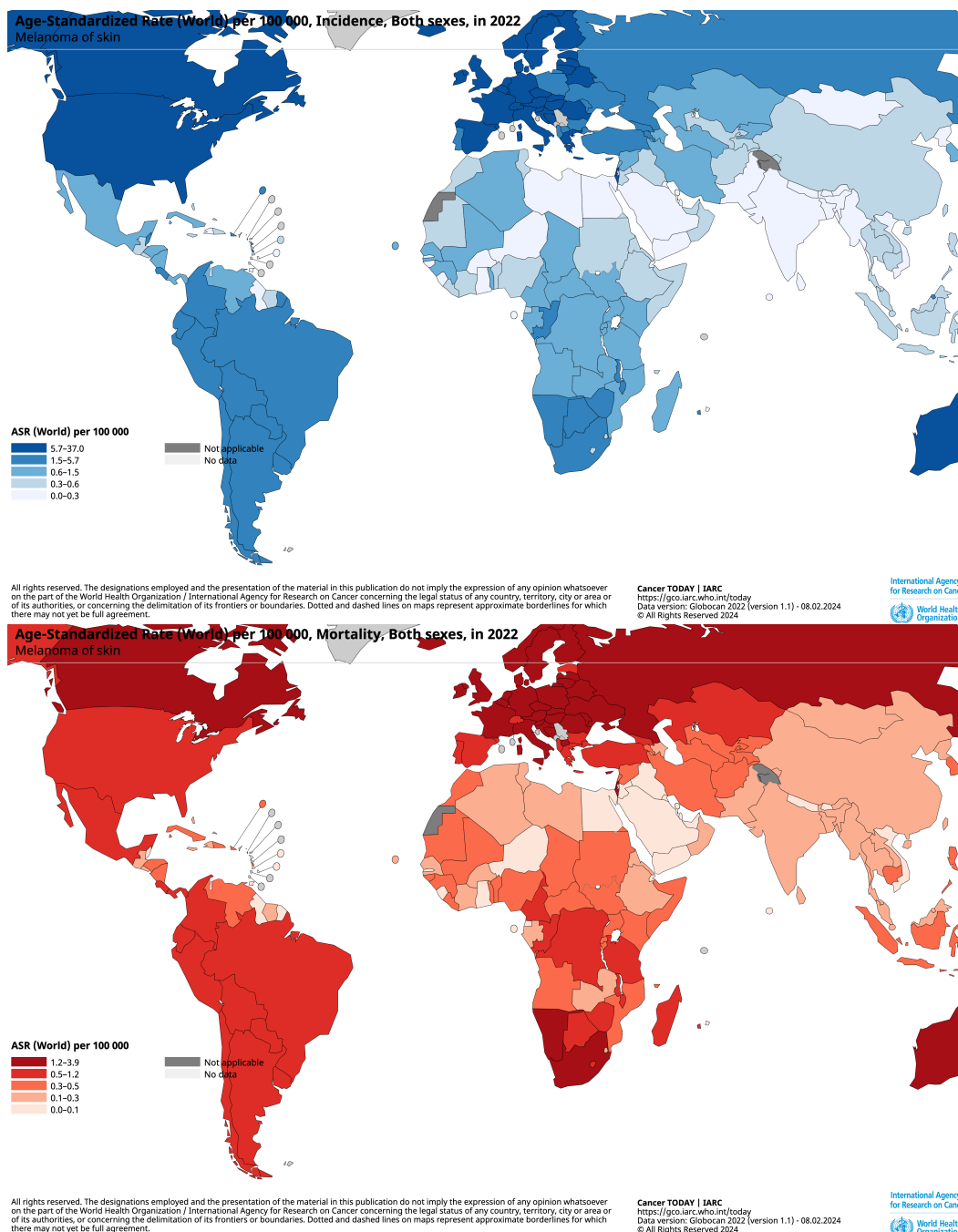
# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 Epidemiología

El melanoma cutáneo es una proliferación maligna de los melanocitos que representa entre el 4-10% de los cánceres diagnosticados en España, con una incidencia y prevalencia en ascenso en los últimos años. Esto se debe, por un lado, al aumento de la exposición al sol y a cambios en el estilo de vida, y por el otro, a una mayor supervivencia de la población (1, 2). La tasa de incidencia anual ajustada por edad por cada 100.000 personas ha incrementado entre 2002 y 2022 un 2,5% en mujeres y un 1,6% en hombres, posicionándolo como el noveno cáncer más frecuente en mujeres y el décimo-primer en hombres. En consecuencia, la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) han elaborado una infografía sobre el melanoma cutáneo en España con el objetivo de concienciar a la población en materia de prevención, remarcando la importancia de evitar la exposición solar directa y enfatizando el uso de factor de protección solar (3).

La edad promedio de aparición del melanoma se sitúa en torno a los 65 años y suele ser más frecuente en hombres, aunque si se consideran las tasas en menores de 50 años la frecuencia en mujeres es superior (4). En cuanto a la localización predominante, se observan diferencias según el sexo. En hombres suele presentarse en cabeza y cuello, mientras que en mujeres suele aparecer con mayor frecuencia en miembros inferiores (5). La incidencia es superior en la raza blanca, con una tasa de 34.7 y 22.1 por cada 100.000 habitantes en hombres y mujeres, respectivamente. Por el contrario, en la raza negra, la incidencia disminuye a 1 por cada 100.000 habitantes, lo cual subraya la importancia del tipo de piel, estratificada

según la escala de Fitzpatrick por color y sensibilidad al sol, en la oncogénesis del melanoma (6, 7). La *Figura 1* muestra las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en incidencia y mortalidad del melanoma para ambos sexos, en el año 2022. La *Figura 2* representa la escala de tipos de piel de Fitzpatrick (8).



**Figura 1.** Incidencia (arriba) y mortalidad (abajo) del melanoma, ambos sexos, año 2022. Información recopilada por el Observatorio Global del Cáncer (Globocan) de la OMS. Imagen tomada de: <https://gco.iarc.who.int/today> (7).



**Figura 2.** Escala de Fitzpatrick según el tipo de piel, dependiendo de la presencia de melanina y la respuesta a la luz ultravioleta. Imagen adaptada de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK481857/table/chapter6.t1> (8).

La supervivencia del melanoma cutáneo se estima, considerando a aquellos pacientes diagnosticados entre 2012-2018 y registrados en las bases del *National Cancer Institute*, en más de un 99% a 5 años para pacientes con enfermedad localizada, en un 71% si existe afectación regional - adenopatías locorregionales -, y desciende hasta un 32% si hay afectación metastásica (9, 10).

Hay varias clasificaciones para categorizar el melanoma. La clasificación tradicional del melanoma cutáneo lo subdivide en cinco subtipos: extensión superficial, nodular, léntigo maligno, lentiginoso acral y amelanótico (11). Si bien se sigue utilizando esta nomenclatura, en 2015 se publicó en la revista *Cell* una clasificación molecular que subdivide al melanoma según el tipo de mutación

presente: *BRAF*, *RAS*, *NF1* y triple *wild-type* (12). Esto ha abierto un nuevo campo de investigación en la búsqueda de dianas terapéuticas dirigidas a las distintas vías moleculares, y ha supuesto un cambio de paradigma en el enfoque y el tratamiento del melanoma.

Si bien el melanoma cutáneo representa la gran mayoría de los melanomas diagnosticados, existen otros subtipos no relacionados con la exposición solar, entre los que se mencionan el melanoma acral, el de mucosas, y el uveal u ocular. El melanoma acral, que representa un 10% de estos tumores, aparece generalmente en zonas palmoplantares o ungueales en pacientes de raza negra. El melanoma de mucosas, que constituye menos del 4% de los casos, tiene una evolución más agresiva y suele diagnosticarse de forma tardía debido a la dificultad de su detección, ya que se localiza en la mucosa nasal, la cavidad orofaríngea, el tracto urinario o digestivo, o el aparato genital (1). Respecto al melanoma uveal, aproximadamente un 5% del total de los casos de melanoma, suele afectar la coroides y se caracteriza por su curso agresivo, ya que hasta un 50% de los pacientes desarrollan metástasis en los 15 años posteriores al diagnóstico (13). La OMS ha desarrollado una clasificación del melanoma que incluye a los subtipos mencionados, incluyendo además las mutaciones involucradas en la carcinogénesis de cada subtipo y su asociación con la exposición solar. Sin embargo, esta clasificación es compleja y poco utilizada en la práctica clínica diaria (14).

## I.II Diagnóstico

El diagnóstico del melanoma se inicia con la observación y la caracterización dermatoscópica, una técnica que realizan frecuentemente los especialistas en Dermatología. Sin embargo, resulta crucial que tanto los pacientes como los médicos estén atentos a los signos de alerta en las lesiones cutáneas. Estos signos se resumen en el acrónimo ABCDEFG (15, 16):

- Asimetría del nevus;
- Bordes irregulares o mal definidos;
- Color, con variaciones entre zonas con distintas tonalidades en marrón, negro, blanco, rojo o azul;
- Diámetro, debido a que habitualmente los melanomas son mayores a 6 mm;
- Evolución, que implican cambios de forma, tamaño o color en el tiempo;
- Firme, haciendo referencia a la firmeza que presenta sobre todo el melanoma nodular;
- Growth, en inglés, o crecimiento, destacando la importancia del incremento en tamaño como signo que orienta a malignidad.

Además, el signo del “patito feo” facilita la identificación de lesiones sospechosas de melanoma entre múltiples nevus. Este signo se utiliza en la práctica clínica para detectarlas visualmente y dermatoscópicamente al distinguirse de las benignas, lo que permite optimizar la exactitud del diagnóstico (16).

Una vez detectada y caracterizada la lesión sospechosa, es imprescindible una correcta toma de biopsia para su análisis en anatomía patológica. Se sugiere la realización de biopsia excisional, reservando biopsias incisionales únicamente en aquellos casos en los que no sea posible la excisión de toda la lesión, ya sea por gran tamaño o en localizaciones de difícil acceso como la subungueal.

Tras la valoración anatomopatológica se precisa una correcta estadificación. La más utilizada a día de hoy para determinar el estadio del melanoma es la de la American Joint Committee on Cancer (AJCC), octava edición, publicada en 2017. Esta clasificación, conocida como TNM, toma en consideración en la **T** el grosor y el estado de ulceración del primario, en la **N** el grado de afectación ganglionar, y en la **M** la presencia de metástasis (17). Es un factor pronóstico reconocido a nivel clínico debido a que, como ya se mencionó anteriormente, en estadios localizados la supervivencia a 5 años se estima en alrededor del 98%, en comparación con aproximadamente el 30% en estadios avanzados (18). Según los registros de los Estados Unidos, se estima que el 84% de los pacientes con melanoma son diagnosticados con enfermedad localizada, mientras que el 9% y el 4% se presentan con enfermedad regional ganglionar y metastásica a distancia, respectivamente (19).

### **I.III Factores de riesgo**

Los factores de riesgo que condicionan la aparición del melanoma cutáneo se pueden clasificar en factores intrínsecos (genéticos y fenotípicos) y extrínsecos (ambientales o de exposición) siendo el principal de todos ellos la exposición solar, sobre todo la intermitente durante la infancia (20).

La exposición solar aguda e intermitente que produce quemaduras está relacionada, con evidencia científica suficiente, con el aumento del riesgo de melanoma (20). Los rayos ultravioletas (UV) son los responsables de al menos el 60-70% de los melanomas cutáneos. Estos rayos UV determinan la presencia de un daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN) con una “firma mutacional” específica, caracterizada por una elevada tasa de transiciones C>T en las dipiridiminas. Si bien

los rayos UV-B son los responsables, en su mayoría, de esta firma mutacional, se ha descrito también la influencia de los rayos UV-A en la formación de dímeros de piridimina y secuencias TT que conllevan a un efecto deletéreo en el ADN (5). La elevada tasa de mutaciones es la razón por la cual el melanoma es uno de los tumores más inmunogénicos, con una alta carga mutacional y una gran producción de neoantígenos tumorales (12). Esto ha impulsado el desarrollo de estrategias terapéuticas que implican al sistema inmune, como los inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI), que inicialmente se implementaron en el tratamiento del melanoma y, dada su eficacia, posteriormente se aplicaron a otros tumores.

En lo que respecta a los factores fenotípicos que favorecen el melanoma, se incluyen la edad mayor a 60 años, el sexo masculino, el fototipo de piel según la escala de Fitzpatrick - sobre todo el fototipo I-II -, y la presencia de un elevado número de nevos melanocíticos. En cuanto a los factores genéticos, existen varios síndromes familiares que confieren susceptibilidad al melanoma maligno cutáneo, como por ejemplo el Síndrome de Melanoma Familiar con Lunares Atípicos Múltiples (FAMMM), el Síndrome de Nevus Displásico (DNS), o el Xeroderma Pigmentoso (XP). La portación de mutaciones en ciertos genes, entre los que se mencionan *TERT*, *PTEN* o *CDKN2A*, también ocasionan un aumento de la susceptibilidad al melanoma. Es importante mencionar que la mutación en *CDKN2A* es responsable de hasta el 40% de los melanoma familiares (21, 22, 23). La historia familiar y personal de melanoma, incluso en ausencia de mutaciones causantes de melanoma familiar, también son factores que predisponen a este tipo de tumor (21).

## I.IV Vías moleculares

La clasificación genómica presentada por *The Cancer Genome Atlas* en 2015, motivada por la presencia de mutaciones frecuentes en el melanoma, lo categoriza en 4 subtipos moleculares: *BRAF*, *RAS*, *NF1* y triple *wild-type* -, éste último con cambios en números de copia, reordenamientos estructurales complejos, y amplificaciones en el oncogén *KIT*. Los subtipos *BRAF* y *RAS*, que son los más frecuentes, son susceptibles de tratamiento con inhibidores de BRAF/MEK (iBRAF/MEK) (12).

*BRAF* codifica para una proteína quinasa serina/treonina que se activa a partir de RAS ante la estimulación por factores de crecimiento. Esta vía activa sucesivamente a MEK, una quinasa con dos subtipos, MEK1 y MEK2, que activa una serina-treonina proteína quinasa denominada ERK, dando como resultado un aumento en la proliferación y supervivencia celular (24). Cuando se presenta una mutación en *BRAF* la vía se activa constitutiva e independientemente de los factores de crecimiento y de RAS, lo cual conlleva a una proliferación incontrolada de las células tumorales, favoreciendo su supervivencia (25). Esta mutación, presente en el 40-60% de los pacientes con melanoma, suele afectar al aminoácido valina situado en la posición 600, que es sustituido por ácido glutámico o lisina (V600E y V600K). Es más frecuente en jóvenes, y confiere un peor pronóstico (26). Este predominio de la mutación *BRAF* en pacientes con melanoma ha impulsado la búsqueda de dianas terapéuticas que actúan sobre esta vía molecular, surgiendo así en 2011 el vemurafenib, primer inhibidor BRAF aprobado para el melanoma metastásico *BRAF*-mutado (27). En 2013, en un esfuerzo por mejorar la corta duración de respuesta al tratamiento con iBRAF, se desarrolló un inhibidor de MEK (iMEK), trametinib, que se comparó con quimioterapia en un estudio fase III en

pacientes con melanoma metastásico con *BRAF*-mutado V600E y V600K. Este ensayo clínico demostró un aumento de supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG) (28). Posteriormente, se estudió el uso combinado de iBRAF e iMEK. Esto desencadenó en 2014 la aprobación de la combinación como terapia inicial de melanoma *BRAF* mutado por la Food and Drug Administration (FDA) (29). A partir de ese hito histórico en la medicina de precisión, momento en el cual se aprobó también en melanoma el primer ICI, ipilimumab, se han ido desarrollando numerosos fármacos dirigidos contra dianas específicas (30). Esto ha supuesto una revolución en el pronóstico del melanoma, prolongando la supervivencia y mejorando la calidad de vida de los pacientes.

Los fármacos y combinaciones ya aprobadas y en uso en la práctica clínica diaria dirigidos contra la vía BRAF/MEK son el dabrafenib/trametinib, vemurafenib/cobimetinib, y encorafenib/binimetinib. Estos fármacos están aprobados para su uso en pacientes portadores de la mutación *BRAF* V600. No obstante, los ensayos clínicos pivotaes que derivaron en la aprobación de estos fármacos se centraron en las mutaciones V600E y V600K, que representan aproximadamente el 95% de los casos. El 5% restante corresponde a mutaciones poco frecuentes, como la V600M, V600R o V600D, las cuales no han sido evaluadas en los ensayos dada su baja frecuencia (31). En cuanto a los ICI, los primeros fármacos aprobados fueron nivolumab y pembrolizumab, fármacos anti PD-1 (Programmed death-1), e ipilimumab, un anti CTLA-4 (Antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico) (30, 32, 33). Tras los resultados del ensayo clínico fase III CheckMate 067, la combinación nivolumab-ipilimumab se posicionó como estrategia en primera línea (34). Recientemente, con la publicación de los resultados del ensayo clínico RELATIVITY-047, la combinación de nivolumab con relatlimab, un anti-LAG3 (Gen 3

de activación de linfocitos), ha recibido la aprobación por la FDA y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) (35, 36).

La aprobación de estos fármacos motivó el inicio de dos ensayos clínicos clave que evaluaron las secuencias de tratamiento con iBRAF/MEK e inmunoterapia, con el objetivo de determinar la mejor estrategia terapéutica. Los resultados de los estudios DREAMseq y SECOMBIT demostraron que el uso de inmunoterapia en primera línea parece otorgar un beneficio en SG a 2 años de entre el 10-20%, así como una mayor duración de respuesta, en comparación con el uso terapia dirigida (37, 38). Por lo tanto, la terapia dirigida en primera línea suele reservarse, a día de hoy, para casos en los que se requiera una respuesta rápida al tratamiento, dada su rapidez de acción respecto a la inmunoterapia, o para aquellos pacientes que presenten contraindicaciones para recibir inmunoterapia.

En cuanto a las quimioterapias previamente utilizadas como la dacarbazina, la combinación de carboplatino-paclitaxel o la temozolamida, éstas han quedado prácticamente en desuso y reservadas en caso de fracaso a las terapias previas, dado el escaso beneficio en supervivencia con tasas de respuesta por debajo del 20% (39). Existen otras estrategias, como la terapia celular, que aún están en desarrollo con resultados alentadores (40, 41).

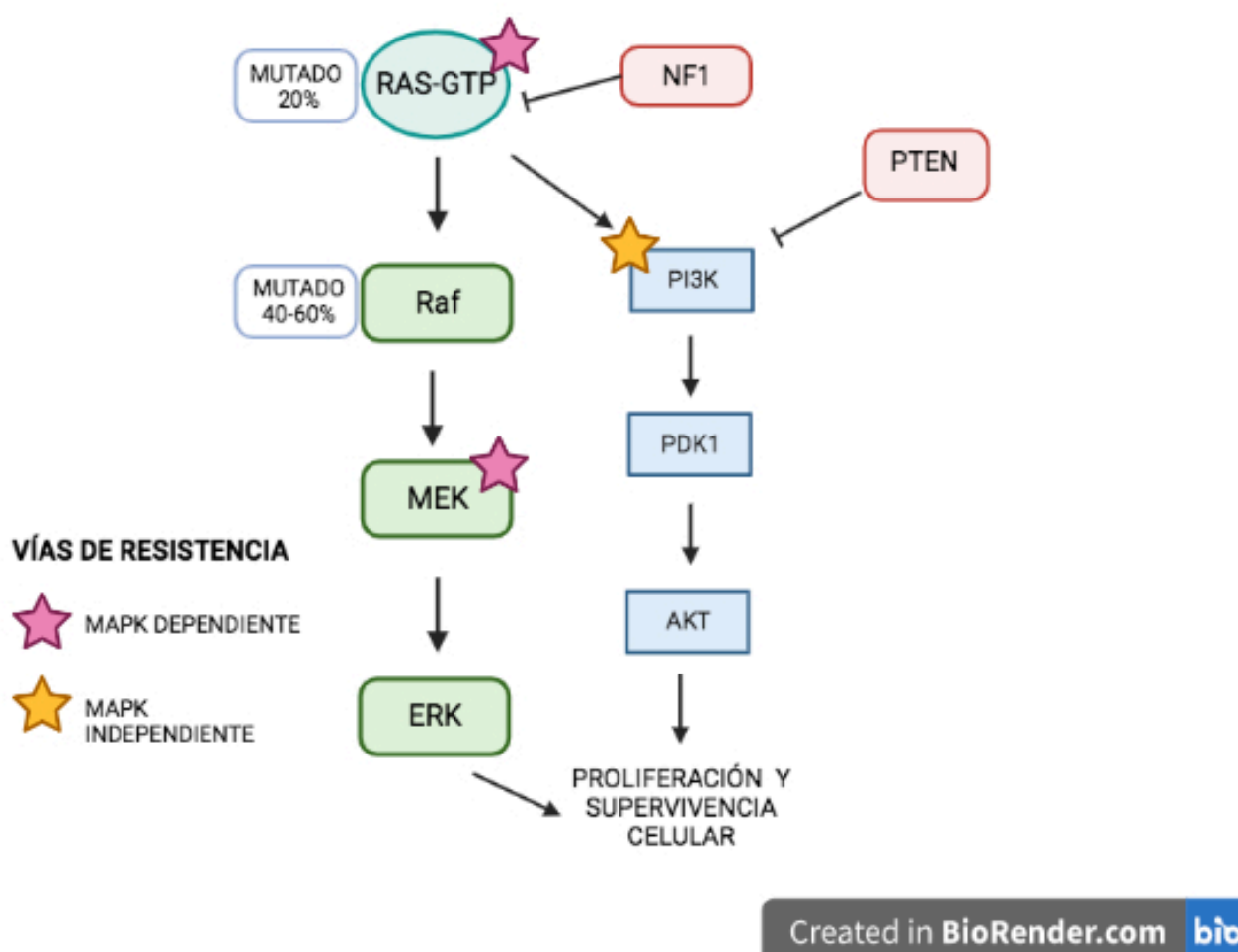
La inmunoterapia ha sido ampliamente estudiada y continúa siendo objeto de investigación. Un área en expansión constituye la detección de biomarcadores predictivos que permitan detectar pacientes respondedores y optimizar el tratamiento a los no respondedores para lograr mejorar las tasas de respuesta. Entre estos biomarcadores se pueden mencionar el rol del PD-L1 (Ligando de PD-1), la carga mutacional tumoral (TMB) o incluso la influencia de ciertos microorganismos que constituyen el microbioma intestinal (42). Sin embargo,

ninguno de estos biomarcadores ha demostrado aún la robustez suficiente como para implementarse de manera generalizada.

En cuanto a la terapia dirigida, más allá de la presencia de la mutación de *BRAF* como biomarcador predictivo de respuesta a iBRAF/MEK, existe una necesidad de identificar otros biomarcadores que permitan determinar qué pacientes se beneficiarán de estos tratamientos. Si bien está descrita la relación entre la inhibición de la vía molecular de la proteína cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y el sistema inmunitario, así como sus efectos sobre el microambiente tumoral (MAT), los mecanismos precisos de la reactivación inmune que conllevan a un efecto antitumoral, y el impacto de la microbiota intestinal en este contexto, aún no se conocen con certeza. Por lo tanto, una mayor investigación en este campo podría revelar nuevos biomarcadores predictivos de respuesta, lo que permitirá anticipar la tasa de éxito al administrar estos fármacos (43, 44).

Esta necesidad de investigación en oncología surge debido a que, a pesar de la mejora en el pronóstico del melanoma gracias a las nuevas estrategias terapéuticas, la gran mayoría de los pacientes desarrollan resistencia a la terapia dirigida con iBRAF/MEK. Los mecanismos de resistencia suelen manifestarse entre los 12-14 meses después del inicio del tratamiento. Estos incluyen la activación de vías MAPK-dependientes, como la aparición de mutaciones en *NRAS* o *MEK*, así también como independientes, en la vía de señalización PI3K-mTOR, con una mayor activación de los receptores del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) o del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF) (Figura 3) (12, 45). En consecuencia, la búsqueda de vías que permitan eludir estos mecanismos de resistencia es imprescindible para poder optimizar el abordaje de

los pacientes, al mismo tiempo que podría conducir al descubrimiento de biomarcadores predictivos que permitan anticipar las tasas de éxito.



**Figura 3.** Vía molecular de proliferación y supervivencia celular BRAF/MEK y vías de resistencia. La imagen muestra tanto las vías de resistencia MAPK-dependientes (RAS-MEK) como las independientes (PI3K).

## I.V Sistema inmune en melanoma

El sistema inmune desempeña un rol esencial en el melanoma debido a su alta inmunogenicidad. En este contexto, se observa un proceso denominado “inmunoección tumoral”, que comprende varias fases: eliminación, equilibrio y escape (46).

En la fase de eliminación, el sistema inmune intenta eliminar las células tumorales mediante la secreción de interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), la activación de células efectoras *natural killer* (NK) y linfocitos CD4+ y CD8+, y la inducción de apoptosis en las células cancerosas. Esto conduce a la liberación de neoantígenos tumorales en el torrente sanguíneo y a un aumento de la presentación antigénica en los ganglios linfáticos, lo que refuerza la respuesta inmune adaptativa y promueve la formación de linfocitos T específicos de tumor. En la fase de equilibrio, el cáncer desarrolla clones menos inmunogénicas pero más proliferativas, con un acúmulo de mutaciones somáticas que propician la inestabilidad genómica y una mayor plasticidad tumoral, favoreciendo así su adaptación al entorno. Durante esta fase predominan los altos niveles de IFN $\gamma$  en un intento del sistema inmunitario por erradicar a las células tumorales. Por último, en la fase de escape, aparecen nuevas mutaciones que confieren una marcada resistencia al sistema inmune. El escenario resultante ocasiona una mayor proliferación tumoral, angiogénesis e inmunosupresión, lo que conlleva a la progresión tumoral ante unas células inmunitarias exhaustas (47).

Esta última fase de evasión inmunitaria representa a día de hoy un campo de investigación en auge en la oncología. La búsqueda de tratamientos que revierten la tolerancia inmunológica ha supuesto el descubrimiento de los ICI y la aparición de

estrategias terapéuticas que tienen como objetivo la reactivación del sistema inmune como método para combatir el cáncer.

### **I.V.1 Mecanismos de evasión del sistema inmune**

Entre los mecanismos descritos en la literatura para la evasión del sistema inmune en melanoma se mencionan (48, 49):

- La estimulación del eje de PD-1, PD-L1 y CTLA-4, reguladores negativos inmunitarios que, en condiciones normales, protegen al huésped de reacciones autoinmunes y en el caso del cáncer constituyen un mecanismo que conlleva al agotamiento y anergia de las células T.
- La secreción de citoquinas en el MAT que modulan a las células T reguladoras (Treg), con el objetivo de propiciar un ambiente inmunosupresor.
- El aumento de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) que contribuyen a la diseminación metastásica e inhiben la función de células T.
- La polarización de los macrófagos a un fenotipo inmunosupresor M2, células predominantes en el MAT que estimulan la angiogénesis y la respuesta de las Treg.
- El reconocimiento inmune defectuoso del melanoma por alteraciones en la presentación antigénica y la regulación a la baja del Complejo Mayor de Histocompatibilidad I (MHC I).
- El aumento del factor de necrosis tumoral (TNF) y del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), y la secreción de prostaglandinas E2 e interleuquinas IL-1, IL-6 e IL-10, cuyo objetivo es promover la angiogénesis y propiciar un ambiente inmunosupresor.

En resumen, el escape inmunitario constituye una de las principales características del cáncer que facilitan el crecimiento tumoral y la diseminación

metastásica (50). Por lo tanto, actuar en la reactivación del sistema inmune con el objetivo de revertir la inmunosupresión provocada por las células tumorales emerge como una estrategia terapéutica prometedora.

### **I.V.2 Reactivación inmunitaria**

La reactivación del sistema inmune implica la intervención de vías inmunomoduladoras para revertir la tolerancia inmunogénica y, a la vez, estimular elementos clave del sistema inmunitario para combatir a las células malignas. A pesar de que los biomarcadores que anticipan esta reactivación del sistema inmune son limitados en la actualidad, su búsqueda podría contribuir a optimizar las estrategias terapéuticas. Por esta razón, resulta fundamental comprender la interacción entre la respuesta inmune y las terapias actuales, para poder formular hipótesis que identifiquen biomarcadores predictivos de respuesta, y mejorar así el abordaje del melanoma (51).

#### **I.V.2.a Reactivación inmunitaria e inmunoterapia**

La reactivación de la respuesta inmune ha sido principalmente asociada a los ICI. Estos tratamientos, al interferir con elementos clave en vías inmunomoduladoras, tienen la capacidad de restaurar la actividad de las células T exhaustas durante un tiempo prolongado, incluso después de la interrupción del tratamiento (52, 53). Esto ha supuesto un cambio de paradigma en melanoma, con más de un 50% de los pacientes con melanoma metastásico experimentando respuestas sostenidas en el tiempo durante más de 5 años de seguimiento (54).

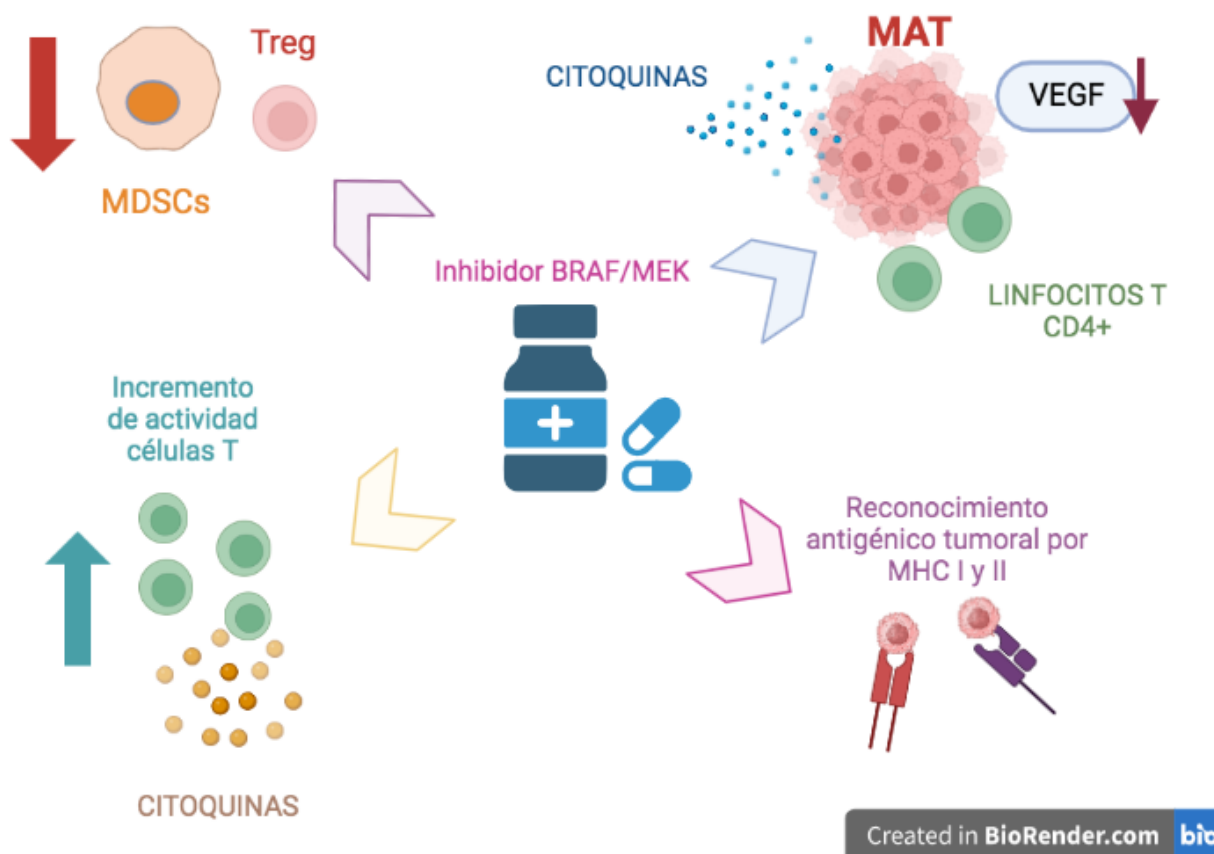
El proceso de reactivación inmunitaria implica a señales supresoras en las células T CD8<sup>+</sup> exhaustas. Estas señales incluyen PD-1, CTLA-4, y Eomes, un

factor de transcripción crucial para la diferenciación y función de memoria de las células T. La inhibición de estas señales por medio de los ICI no solo suprime el efecto inmunosupresor de las células Treg, sino que también amplifica la respuesta antitumoral de las células T CD8<sup>+</sup> (55). Además, se ha descrito que la coestimulación de la señal CD28 es necesaria para la reactivación de las células T tras el bloqueo del eje PD-1/PD-L1 (56). En modelos preclínicos, se ha observado que la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos desempeña un papel crucial para la depleción de las células Treg en el MAT, un mecanismo inducido por los ICI. Como resultado de esto, se produce una disminución significativa de la capacidad del tumor para metastatizar a través de la vía hematogena (57, 58). Estos hallazgos permiten una mejor comprensión de los mecanismos inmunomoduladores del melanoma y de la influencia del tratamiento con ICI en la reactivación del sistema inmune.

#### **I.V.2.b Reactivación inmunitaria e inhibidores de BRAF/MEK**

En cuanto al impacto de la terapia dirigida en la reactivación del sistema inmune, se ha descrito que los iBRAF podrían revertir los efectos inmunosupresores en el MAT estimulando la expresión de moléculas y citoquinas inmunoestimuladoras, y reduciendo el número de células reguladoras inmunosupresoras como las Treg y las MDSC (59). Además, existe evidencia de que aumentan la respuesta T CD8<sup>+</sup> y la citotoxicidad mediada por células T (60). La terapia con iMEK parecería también tener un rol inmunomodulador, aumentando la infiltración T tumoral, las citoquinas y moléculas inmunoestimuladoras. Asimismo, reduciría la actividad inmunosupresora mediante la regulación a la baja de citoquinas proinflamatorias, como el receptor de superficie activador de plasminógeno de uroquinasa (PLAUR) y el TNF, así como de

marcadores de inmunosupresión, como el factor de crecimiento transformante  $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1) y quimiocinas, incluyendo CCL2, CCL3, CXCL1, CXCL3, CXCR2, entre otras (61, 62) (Figura 4).



**Figura 4.** Reactivación del sistema inmune mediada por iBRAF/MEK. MAT: Microambiente tumoral. VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial. MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Treg: células T reguladoras. MDSCs: células supresoras derivadas de mieloides.

Un artículo de revisión describió la evidencia *in vivo* e *in vitro* del impacto de la terapia dirigida con iBRAF/MEK sobre el sistema inmune en pacientes con melanoma (63):

1. Estimulación inmune en el MAT: promoviendo la expresión del MHC I, células CD4+ intratumorales y citoquinas inmunoestimuladoras, y reduciendo citoquinas inmunosupresoras como IL-6 e IL-8.
2. Aumento de la infiltración T en el MAT y pérdida de expresión del VEGF.
3. Potenciación del reconocimiento antigénico tumoral por células T, mediado por un aumento en la expresión del MHC I y II.
4. Incremento de la actividad de células T, secundario a la secreción de citoquinas como IFN $\gamma$ .

### **I.V.3 Biomarcadores pronósticos y predictivos**

Resulta de crucial importancia identificar biomarcadores que permitan desarrollar estrategias para optimizar la respuesta terapéutica y mejorar los resultados clínicos. Un biomarcador pronóstico informa acerca de la evolución de la enfermedad y el impacto en supervivencia independientemente del tratamiento recibido. Por el contrario, un biomarcador predictivo ayuda a predecir la probabilidad de que un paciente responda a un tratamiento específico (64).

El biomarcador pronóstico serológico con mayor evidencia en la literatura en melanoma es el valor de la Lactato Deshidrogenasa (LDH), y recientemente se han descrito el ratio neutrófilos/linfocitos (NLR) y la derivada del NLR (dNLR) los cuales, ante valores elevados, se han visto asociados a un detrimento en la supervivencia (65, 66, 67, 68). Un biomarcador que está adquiriendo relevancia en melanoma es el ADN tumoral circulante, que parecería constituir una herramienta tanto pronóstica como predictiva, además de permitir una monitorización no invasiva de la enfermedad con detección temprana de recaídas (69, 70).

Entre los biomarcadores predictivos destaca la mutación *BRAF*, un factor determinante para la selección de pacientes candidatos a terapias dirigidas a la vía de las MAPK, lo cual ha supuesto un cambio de paradigma en la medicina personalizada en melanoma. Si bien se han descrito otros posibles biomarcadores, entre los que se mencionan los Linfocitos Infiltrantes de Tumor (TILs), el PD-L1, la TMB y la LDH, aún no se han confirmado con certeza su especificidad y sensibilidad como predictores de respuesta al tratamiento (71). Por lo tanto, la búsqueda de marcadores biológicos que permitan predecir de manera más precisa la respuesta de los tratamientos en melanoma es una necesidad no cubierta. Dentro de este ámbito, la microbiota surge como un campo emergente y prometedor, con un posible papel pronóstico y predictivo de respuesta a ICI, así también como a la terapia dirigida con iBRAF/MEK, a la espera de mayor evidencia científica que permita establecer su rol en este contexto (72).

## I.VI Microbiota

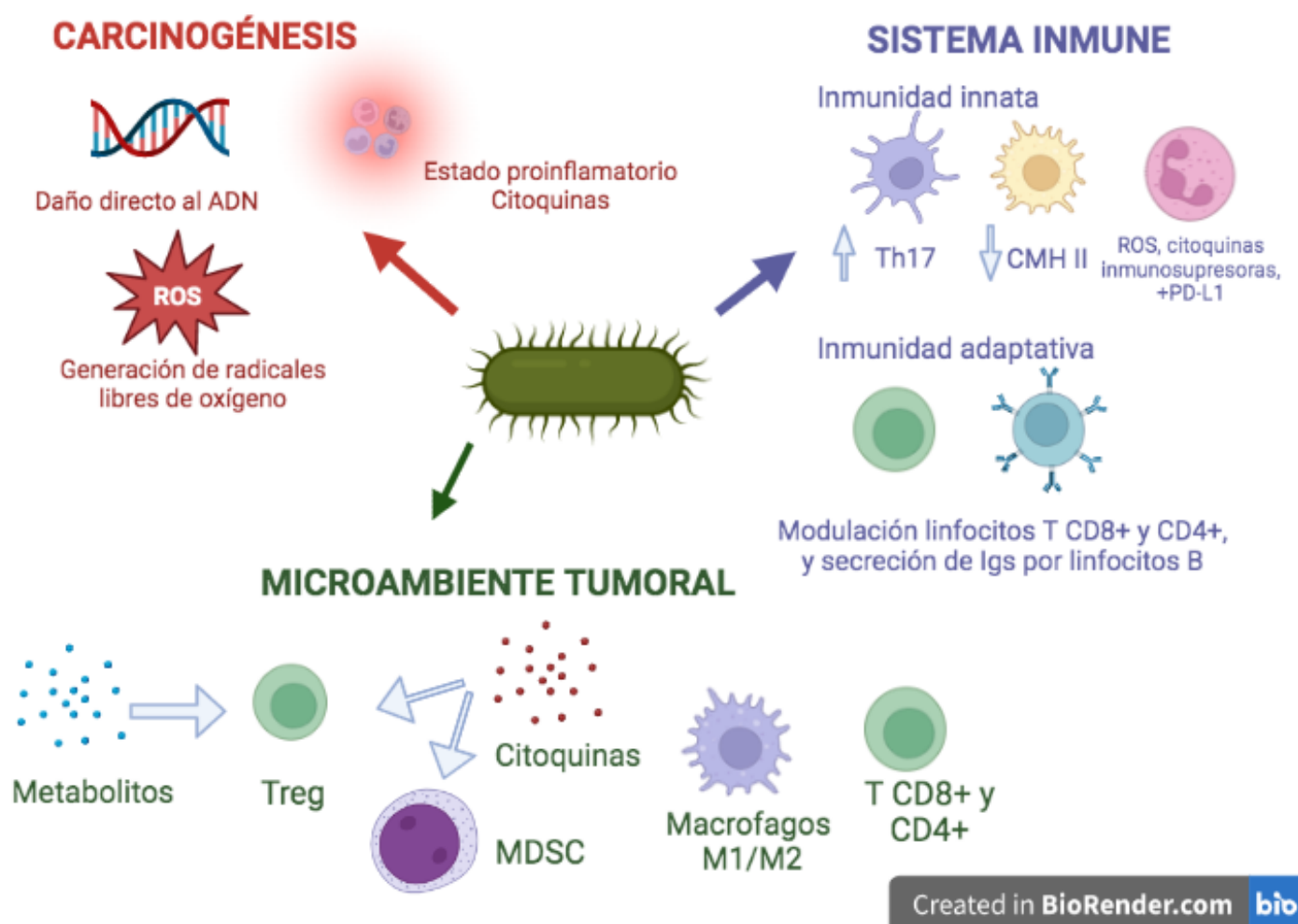
La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) define a la microbiota como “el conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, arqueas, virus y parásitos) que reside en nuestro cuerpo, que a su vez pueden diferenciarse en comensales, mutualistas y patógenos” (73). El microbioma incluye, además de los microorganismos, a sus genes y las condiciones del entorno. Estos dos términos, a pesar de que son diferentes, se suelen utilizar indistintamente en la práctica clínica. La aparición de nuevas técnicas microbiológicas y el *Next Generation Sequencing* (NGS) han supuesto un gran avance a nivel científico, dado que han permitido conocer la repercusión de la microbiota en los estados de salud y enfermedad del ser humano (73).

Para detectar la presencia de microorganismos y correlacionarlo con la salud y la enfermedad, los estudios se basan en las diferencias encontradas a nivel taxonómico (Reino, Filo, Clase, Orden, Familia, Género, Especie), así como en la diversidad alfa y beta. La diversidad alfa se define como la diversidad de especies dentro de una misma muestra. Por el contrario, la diversidad beta hace referencia a la variabilidad de microorganismos entre dos muestras distintas (74). Esta clasificación permite analizar tanto la riqueza de especies dentro de una comunidad microbiana como las diferencias entre comunidades distintas, lo que facilita la detección de patrones distintivos entre pacientes sanos y enfermos.

A pesar de que la microbiota puede encontrarse a nivel intestinal, cutáneo, respiratorio, oral y genitourinario, la más estudiada en relación a enfermedades es la del tracto intestinal. Hay estudios que destacan el papel de la microbiota no-intestinal en relación al sistema inmune y a diversas patologías. Por ejemplo, la microbiota cutánea, y más específicamente la bacteria *Staphylococcus epidermidis*, parecería regular los niveles de IL-17A, relacionada con el crecimiento tumoral y la inmunidad antitumoral (75, 76). Por otro lado, se han descrito diferencias en la composición de la microbiota pulmonar con un aumento en la abundancia de los filos Bacteroidetes, Fusobacteria, Cyanobacteria, Spirochaetes, y Lentisphaerae en pacientes afectados de cáncer de pulmón en comparación con individuos sanos. Estas observaciones plantean interrogantes sobre si estos microorganismos podrían ser causa o consecuencia de la enfermedad (77). En pacientes asmáticos, se ha identificado un enriquecimiento del filo Proteobacteria en el tracto respiratorio, lo cual podría sugerir una relación entre el asma y esta bacteria (78, 79, 80). Otros microorganismos como el *Helicobacter pylori* y el *Virus del Papiloma Humano* (VPH)

presentan evidencia científica suficiente como promotores de la carcinogénesis gástrica y de cérvix respectivamente (81, 82).

En los siguientes apartados nos focalizaremos en la microbiota intestinal - dado que es la que presenta mayor evidencia científica -, y su relación con la carcinogénesis, el sistema inmune y el MAT (*Figura 5*).



**Figura 5.** Actividad de la microbiota en relación a la carcinogénesis, el microambiente tumoral y el sistema inmune. CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad, ROS: Radicales Libres de Oxígeno, MDSC: Células Supresoras Derivadas de Mieloides.

### I.VI.1 Microbiota y carcinogénesis

Los mecanismos por los cuales la microbiota puede promover la carcinogénesis están descritos en numerosos estudios. Entre estos mecanismos se incluyen: el daño directo al ADN como consecuencia de la liberación de toxinas bacterianas, el estado proinflamatorio secundario a infecciones crónicas bacterianas, la generación de metabolitos o radicales libres de oxígeno (ROS) que pueden dañar a las células, y la inhibición directa de respuestas inmunes antitumorales (83).

El cáncer colorrectal (CCR) ha sido el más estudiado en relación con la microbiota, probablemente por la conocida asociación entre este tumor, los cambios dietarios, y el impacto que estos cambios pueden tener sobre la composición de los microbios comensales intestinales. La alteración de la barrera epitelial intestinal, la producción de genotoxinas y la secreción de metabolitos tóxicos son los procesos que conllevan a la carcinogénesis colorrectal (84). *Streptococcus bovis* se ha asociado a la carcinogénesis al ocasionar un incremento en la producción de ROS y de citoquinas angiogénicas en la mucosa colorrectal (85, 86). Otras bacterias como *Bacteroides fragilis* y *Fusobacterium nucleatum* parecerían propiciar el desarrollo de este cáncer al actuar sobre la vía E-cadherina/ $\beta$ -catenina, alterando así la expresión genética en las células epiteliales colónicas (87, 88, 89).

En lo que respecta a otros tumores, se ha descrito en modelos preclínicos la participación de *Escherichia coli* y de *Enterococcus faecalis* en la carcinogénesis pancreática, mediante la modificación del microambiente pancreático y la supresión del sistema inmune innato y adaptativo (90). En cáncer de mama, se ha observado un rol multifactorial de la microbiota al regular tanto la iniciación como la progresión

tumoral, influenciando de esta manera la respuesta y la resistencia a los tratamientos, y modulando el metabolismo de ciertas quimioterapias (91). Otro tumor que se ha visto estrechamente asociado a carcinogénesis mediada por microorganismos es el cáncer gástrico. El mecanismo por el cual *Helicobacter Pylori* desencadena la tumorigénesis gástrica implica la inducción de daño genómico mediante estrés oxidativo, así como la producción de proteínas virulentas como VacA, CagA y CagPAI (81). En cuanto al VPH, principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de cérvix - entre otros tumores -, este virus codifica proteínas oncogénicas que son responsables de la proliferación celular y, a su vez, propicia un ambiente inflamatorio crónico que aumenta la producción de ROS, favoreciendo la mutagénesis del ADN y la inestabilidad genómica (82, 92).

Si volvemos al campo del melanoma, la evidencia destaca la diferencia entre la composición de la microbiota en comparación con individuos sanos. En un estudio realizado sobre muestras de heces en 20 pacientes con melanoma metastásico que comparaba la composición de la microbiota frente a un grupo control sano, se identificó una abundancia del orden Clostridiales, la especie *Prevotella copri* y de hongos pertenecientes a *Saccharomycetales* spp. en las muestras de pacientes. Además, si bien no hubo diferencias entre la diversidad alfa ni en la beta entre el grupo de pacientes en comparación con el control, sí se observó una microbiota bacteriana menos enriquecida y diversa en pacientes con melanoma invasivo en comparación con aquellos con melanoma *in situ* (93). Estos hallazgos podrían sugerir una posible implicación de la microbiota en la carcinogénesis de este tumor.

Otros estudios se han focalizado en investigar el impacto de la microbiota en los tratamientos oncológicos. Se ha descrito que ciertos microorganismos, como *Akkermansia muciniphila*, pueden potenciar el efecto abscopal de la radioterapia, y

otros, como el filo Firmicutes, la respuesta y la aparición de efectos adversos durante la inmunoterapia (94, 95, 96). Además, agentes quimioterápicos como la Ciclofosfamida y el Cisplatino se han vinculado con un aumento en la traslocación de bacterias Gram positivas a órganos linfáticos secundarios. Esto puede inducir la activación de células patogénicas T helper 17 (Th17) y la generación de ROS, lo que resulta deletéreo para el funcionamiento del sistema inmune antitumoral y promueve un ambiente inmunosupresor (97, 98). Por lo tanto, si bien hay microorganismos que pueden mejorar la respuesta a los tratamientos, como por ejemplo al potenciar el efecto abscopal, otros, inducidos por tratamientos como la Ciclofosfamida o el Cisplatino, pueden favorecer la carcinogénesis.

En resumen, si bien existe evidencia que vincula la microbiota con la carcinogénesis del melanoma y su impacto en tratamientos oncológicos, aún queda un amplio terreno de investigación a descubrir para comprender esta compleja interacción. Parecería ser que en este contexto, el sistema inmune tiene un rol esencial, modulando no solo el MAT, sino también la microbiota y la respuesta al tratamiento.

### **I.VI.2 Microbiota y sistema inmune**

El sistema inmune confiere un mayor protagonismo en oncología desde la aparición de la inmunoterapia y el descubrimiento de su estrecha relación con el MAT, la iniciación y progresión tumoral, y la microbiota. Está descrito en la literatura que la microbiota puede tener un rol tanto protumoral, actuando como carcinogénico al favorecer un estado proinflamatorio o al liberar toxinas citotóxicas como la colibactina secretada por *Enterobacteriaceae*, como antitumoral, modulando células T CD8+ o T helper 1 (Th1) y potenciando la respuesta inmunológica (99, 100). Esta

acción dual que involucra al sistema inmune podría revelar nuevas vías de señalización que podrían ser consideradas como posibles dianas terapéuticas.

### **I.VI.2.a Microbiota e inmunidad innata**

La inmunidad innata constituye la primera barrera defensiva del cuerpo humano. Se ha descrito que las bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, presentes en la leche materna, tienen un rol fundamental en el desarrollo de esta barrera a nivel intestinal en neonatos (101).

En los adultos, la microbiota participa en el desarrollo y la regulación de las células de la inmunidad innata. Se ha descrito en la literatura que la microbiota estimula la expresión de CD70 y CX3CR1 en la superficie de las células dendríticas, lo que favorece el desarrollo de las células presentadoras de antígeno. Este proceso conduce a un aumento de células proinflamatorias Th17, las cuales desempeñan un papel fundamental en la eliminación de patógenos (102). Por otro lado, estudios preclínicos han resaltado la importancia de la microbiota en la regulación de los macrófagos. La depleción de microorganismos resultaría en una disfunción de la actividad macrofágica y una disminución en la expresión del MHC tipo II (103). En otro modelo preclínico, se ha destacado la interrelación entre la microbiota y la hematopoyesis. Se observó que ratones libres de microorganismos, o tratados con antibioterapia de amplio espectro para deplecionar la microbiota, presentaban una reducción de la hematopoyesis de granulocitos y de la serie linfóide B (104).

La microbiota también se ha descrito vinculada estrechamente a los neutrófilos, principales actores de la inmunidad innata. Se ha observado que la microbiota favorece su producción en la médula ósea, regula sus funciones y

modula la respuesta inflamatoria (105, 106). Este fenómeno cobra relevancia dado que los neutrófilos han sido identificados como promotores de la supresión inmunitaria en el MAT, ya sea mediante la generación de ROS, citoquinas inmunosupresoras, o la expresión de PD-L1. Estos procesos conducen a una tolerancia inmunitaria y a un estado de anergia de los linfocitos T en presencia de células tumorales (107, 108). Además, los neutrófilos favorecen la formación de metástasis mediante múltiples mecanismos, como la secreción de proteasas que promueven la invasividad y la angiogénesis, la liberación de TGF- $\beta$  que facilita la transición epitelio-mesénquima, y la inducción de un estado de acidosis al activar la bomba de protones ATPasa, lo que reduce la actividad antitumoral de las células NK y los linfocitos T (109). Por lo tanto, dado el papel regulador de la microbiota en este contexto, la generación de estrategias que modulen su composición podría tener un impacto en los neutrófilos y reducir el estado proinflamatorio del cáncer, con el objetivo de potenciar la respuesta antitumoral.

#### **I.VI.2.b Microbiota e inmunidad adaptativa**

La inmunidad adaptativa se encarga de la detección y eliminación de patógenos tras atravesar la barrera que constituye la inmunidad innata, a la vez que participa en procesos de reconocimiento de antígenos propios y externos para mantener la homeostasis en el organismo. Los principales actores en este escenario son las células presentadoras de antígeno y los linfocitos B y T (110).

Estudios preclínicos han revelado la compleja interacción entre la microbiota y el sistema inmune, al modular células T CD8+ y CD4+, Th1, células B y células mieloides asociadas a tumor (CMAT) (111, 112, 113, 114). La presencia intestinal de la especie *Fusobacterium varium*, una bacteria anaerobia Gram negativa que

pertenece al género *Fusobacterium* y que suele formar parte de la flora habitual orofaríngea, gastrointestinal y genital, se ha asociado a una reducción de la población T CD8+ y CD4+ (115). Otra especie del mismo género, *Fusobacterium nucleatum*, la cual suele estar enriquecida en pacientes con CCR y enfermedad inflamatoria intestinal, se ha asociado a una actividad proinflamatoria, promoviendo el reclutamiento de MDSC en el MAT (116). En un modelo de cáncer de páncreas, se confirmó la acción protumoral de ciertos microorganismos, entre los que se encontraban miembros de los filos Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes. La eliminación de estas bacterias estimuló una respuesta antitumoral, evidenciada por un aumento de los niveles de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . Este aumento de citoquinas condujo a la polarización de las células T CD4+ hacia un fenotipo Th1 y a una potenciación de la actividad citotóxica de las CD8+ contra las células cancerígenas (90).

La influencia de la microbiota sobre los linfocitos B abarca tanto su producción como su modulación. Ciertos metabolitos y antígenos bacterianos pueden desencadenar la activación de células B, estimular la producción de citoquinas proinflamatorias, y mantener así la homeostasis (117). Además, se ha descrito que los microorganismos intestinales pueden actuar como inmunógenos o utilizar sus flagelos para estimular receptores Toll-like en células dendríticas, favoreciendo de esta manera la secreción de inmunoglobulina A (IgA) en la mucosa intestinal. Los pacientes que presentan un déficit de IgA tienen un riesgo aumentado de adquirir enfermedades intestinales, como celiaquía o enfermedad inflamatoria intestinal, lo cual apoyaría una vez más la importancia de una correcta homeostasis del microbioma (118, 119).

La evidencia de la interacción entre la microbiota y el sistema inmune ha impulsado líneas de investigación, con el objetivo de dilucidar el impacto de los tratamientos antineoplásicos. Se ha observado que las especies *Enterococcus hirae* y *Barnesiella intestinihominis* están asociados a una mayor respuesta antitumoral a la Ciclofosfamida, al estimular a las células T CD8<sup>+</sup> (120). Además, la adición de cepas de *Bifidobacterium* en ratones con cáncer de pulmón de células no pequeñas tratados con Oxaliplatino o anti-PD1 también parece potenciar la respuesta T CD8<sup>+</sup> y reducir de esta manera la carga tumoral (121). En cuanto a la radioterapia, modelos preclínicos de cáncer de mama y melanoma han reportado una menor eficacia en los resultados del tratamiento cuando se administraron antibióticos que deplecionaron la microbiota. Este hallazgo sugiere un sinergismo entre la microbiota intestinal y la radioterapia (122).

En conclusión, la compleja relación entre el sistema inmune y la microbiota no sólo involucra a cada uno de sus componentes, sino también a factores externos, como la dieta, el uso de antibioterapia, los tratamientos antineoplásicos administrados, o factores intrínsecos del huésped. Esto conlleva a un escenario multidimensional de homeostasis, y condiciona las respuestas del organismo ante la enfermedad y los tratamientos.

### **I.VI.3 Microbiota y microambiente tumoral**

La importancia de la relación entre la microbiota y el sistema inmune no sólo radica en su acción a nivel de las células efectoras, sino también sobre el MAT. El MAT tiene un rol fundamental en el mantenimiento y la progresión tumoral. Está compuesto de células estromales, vasos sanguíneos, matriz extracelular, y células

del sistema inmune adaptativo e innato que pueden inducir acciones anti- o pro-tumorales (123).

El estado de disbiosis, definido como “la alteración en la composición y/o función de los microorganismos comensales en comparación a un individuo sano”, se ha asociado a evasión inmune e inmunosupresión (124). En este escenario, se promueve la función inmunosupresora de las MDSC, los macrófagos M2 y las Treg, el reclutamiento de macrófagos asociados a tumores y neutrófilos, y la supresión de las células T CD8+ (125,126). Además, la secreción de citoquinas inmunosupresoras propician un ambiente proinflamatorio que potencian la anergia y la tolerancia inmune, favoreciendo el crecimiento tumoral y la formación de metástasis. Algunos metabolitos producidos por ciertos microorganismos estimulan la secreción de citoquinas - principalmente IL-6 y TNF $\alpha$  -, que favorecen el desarrollo y la actividad de las células Treg en el MAT. Los linfocitos Treg inmunosupresores mantienen un estado crónico inflamatorio en el MAT, con el consiguiente aumento de la angiogénesis, la evasión de la apoptosis, y la adopción de respuestas adaptativas que favorecen la iniciación y progresión del cáncer (92, 127, 128). Ejemplo de esta acción inmunomoduladora sobre el MAT se ha descrito en relación con el género *Fusobacterium* en CCR. Estas bacterias parecen estimular a los macrófagos asociados a tumor y a las MDSC, lo cual conduce a una supresión de la respuesta T y favorecen de esta manera la progresión del cáncer (129). Por el contrario, un estudio en 447 pacientes con melanoma reveló un incremento de células T CD8+ y una mejor supervivencia asociada a la presencia intratumoral de bacterias del género *Lachnoclostridium*, *Gelidibacter*, *Flammeovirga*, y *Acinetobacter* (130). Además, la presencia del género *Bifidobacterium* en el MAT en un modelo

preclínico observó una mejor respuesta antitumoral a la inmunoterapia, mediada por IFN-I y células dendríticas (131).

En resumen, el papel de la microbiota en la modulación de la respuesta inmune, la composición del MAT y su implicación en la carcinogénesis ha suscitado un creciente interés en los últimos años. Si bien existe evidencia que busca esclarecer esta compleja interacción, aún queda mucho por dilucidar, especialmente considerando la multiplicidad de factores intrínsecos y extrínsecos involucrados, lo que dificulta establecer una relación de causalidad. A día de hoy, hay ensayos clínicos en curso para evaluar el impacto de diversas intervenciones en la microbiota, como el trasplante de microbiota fecal (TMF), los suplementos dietarios, y el uso de antibióticos, probióticos y simbióticos. Estos estudios podrían aportar biomarcadores predictivos de respuesta a inmunoterapia y otros tratamientos, así como nuevas estrategias terapéuticas destinadas a optimizar los resultados clínicos (132, 133).

#### **I.V.4 Impacto de la microbiota en tratamientos oncológicos**

##### **I.V.4.a Microbiota e inmunoterapia**

Múltiples estudios han intentado identificar a los microorganismos asociados con una mejor respuesta a la terapia anti PD-1 en pacientes con melanoma. Sin embargo, a pesar de que se han descrito patrones en común, como la presencia del filo Bacteroidetes en los no respondedores y una abundancia del filo Firmicutes en los respondedores, hay resultados discordantes entre estudios. Esto se debe probablemente a la heterogeneidad de las cohortes, y a diferencias en la clasificación entre respondedores y no respondedores. Por ejemplo, mientras Gopalakrishnan *et al.* y Andrews *et al.* consideran como respondedores a aquellos

que alcanzan una respuesta objetiva, es decir, respuesta completa (RC) y parcial (RP), o enfermedad estable (EE) de al menos 6 meses, Frankel *et al.* incluye a los pacientes con EE desde su primera evaluación en la cohorte de respondedores. La *Tabla 1* resume los principales estudios de microbiota intestinal en pacientes con melanoma metastásico tratados con inmunoterapia (134, 135, 136, 137, 138, 139).

**Tabla 1.** Resumen de la evidencia disponible acerca de la microbiota intestinal en pacientes con melanoma metastásico tratados con inmunoterapia.

Estudios de microbiota en pacientes con melanoma metastásico tratados con inmunoterapia					
N	Recolección de muestras	Respondedores	No respondedores	Biomarcadores	Otros resultados
Frankel et al. (2018) [134]	39	Previo al inicio de la inmunoterapia. Cinco pacientes con seguimiento longitudinal (4 respondedores y 1 no respondedor)	N=24 <b>Filo Firmicutes:</b> <i>Streptococcus parasanguinis</i> , <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Holdemania filiformis</i> , <i>Dorea formicigenerans</i> <b>Filo Bacteroidetes:</b> <i>Bacteroides caccae</i> , <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	N=15 <b>Filo Firmicutes:</b> <i>Peptoniphilus unclassified</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Slakta exigua</i> , <i>Streptococcus infantis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc gasicomitatum</i> , <i>Anaerococcus vaginalis</i> , <i>Peptoniphilus unclassified</i> , <i>Lactobacillus gasser</i> <b>Filo Actinobacteria:</b> <i>Atopobium parvulum</i> , <i>Actinomyces viscosus</i> , <i>Actinomyces odontolyticus</i> <b>Filo Bacteroidetes:</b> <i>Bacteroides eggerthii</i>	Aumento de ácido anacárdico en respondedores (estimulan neutrófilos y macrófagos)  Longitudinal: incremento de <i>Bacteroides stercoris</i> y descenso de <i>Clostridium botatae</i> y <i>Veillonellaceae</i>
Matson et al. (2018) [135]	42	Previo al inicio de la inmunoterapia. En un segundo tiempo, modelo preclínico con TMF.	N=16 <b>Filo Firmicutes:</b> <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Veillonella parvula</i> , <i>Lactobacillus</i> sp. <b>Filo Actinobacteria:</b> <i>Collinsella aerofaciens</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <b>Filo Bacteroidetes:</b> <i>Parabacteroides merdae</i> , <b>Filo Proteobacteria:</b> <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	N=26 <b>Filo Firmicutes:</b> <i>Ruminococcus obeum</i> y <i>Roseburia intestinalis</i>	Modelo preclínico: crecimiento tumoral entretenido en ratones con microbiota de respondedores.
Gopalakrishnan et al. (2018) [136]	89	Previo y durante la inmunoterapia. En un segundo tiempo, modelo preclínico con TMF.	N=54 <b>Filo Firmicutes:</b> <i>Ruminococcaceae</i> (familia), <i>Faecalibacterium</i> (género)	N=35 <b>Filo Bacteroidetes:</b> <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> , <b>Filo Proteobacteria:</b> <i>Escherichia coli</i> <b>Filo Firmicutes:</b> <i>Anaerotruncus colihominis</i> .	Mayor diversidad alfa en respondedores. Diversidad alfa asociada a SLP. Modelo preclínico: crecimiento tumoral entretenido en ratones con microbiota de respondedores.
Peters et al. (2019) [137]	27	Previo al inicio de la inmunoterapia. Análisis de microbiota en relación con SLP.	Mayor SLP <b>Filo Firmicutes:</b> <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , <i>Coprococcus eutactus</i> , <i>Streptococcus sanguinis</i> , <i>Streptococcus anginosus</i> , y <i>Lachnospiraceae bacterium</i> . <b>Filo Bacteroidetes:</b> <i>Prevotella stercorae</i> .	Menor SLP <b>Filo Bacteroidetes:</b> <i>Bacteroides ovatus</i> , <i>Bacteroides dorei</i> , <i>Bacteroides massiliensis</i> , <b>Filo Firmicutes:</b> <i>Ruminococcus gnavus</i> , y <i>Blautia producta</i> .	Mayor enriquecimiento y diversidad asociado a mayor SLP.  Mayor enriquecimiento y diversidad asociado a mayor SLP.
Andrews et al. (2021) [138]	77	Previo al inicio o después de la primera dosis de inmunoterapia.	N=27 <b>Filo Firmicutes:</b> <i>Anaerocolium jejuniensis</i> , <i>Ruminococcus unclassified</i> , <i>Fourmurella massiliensis</i> <b>Filo Bacteroidetes:</b> <i>Bacteroides stercoris</i> , <i>Parabacteroides distasonis</i> , <i>Alistipes unclassified</i> .	N=11 <b>Filo Proteobacteria:</b> <i>Klebsiella aerogenes</i> , <i>Citrobacter unclassified</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Hafnia unclassified</i> , <b>Filo Firmicutes:</b> <i>Weissella paramesenteroides</i> , <i>Eubacterium hallii</i> , <i>Roseburia hominis</i> , <i>Lactobacillus rogosae</i>	Presencia de <i>Bacteroidetes intestinalis</i> e <i>Intestinibacter bartlettii</i> asociado a mayor incidencia de efectos adversos grado $\geq 3$ .
McCulloch et al. (2022) [139]	94	Previo y tras cuatro meses de tratamiento con inmunoterapia.	N=38 <b>Filo Firmicutes:</b> <i>Ruminococcus torques</i> , <i>Blautia producta</i> , <i>Blautia wexlerae</i> , <i>Blautia hansenii</i> , <i>Eubacterium rectale</i> , <i>Ruminococcus gnavus</i> y <i>Anaerostipes hadrum</i> .	N=25 <b>Filo Bacteroidetes:</b> <i>Prevotella</i> spp., <i>Alistipes</i> spp. <b>Filo Proteobacteria:</b> <i>Sutterellaceae</i> spp. <b>Filo Firmicutes:</b> <i>Oscillibacter</i> spp.	Abundancia de <i>Streptococcus</i> spp. Pretratamiento asociado a mayor incidencia de efectos adversos.

Un meta-análisis de Limeta *et al.* que incluyó cuatro de estos estudios publicados, englobando 130 pacientes con melanoma tratados con inmunoterapia, no encontró diferencias globales significativas entre respondedores - cohorte que incluía pacientes con RC y RP - y no respondedores - pacientes con EE y progresión de la enfermedad (PE) - en términos de diversidad alfa y beta. Sin embargo, sí destacó la diferencia encontrada en cuanto a beta diversidad en el estudio de Gopalakrishnan *et al.* Al analizar la riqueza de especies, las más enriquecidas en los respondedores pertenecían al filo Firmicutes: *Ruminococcaceae*, *Faecalibacterium* y *Ruminococcus bicirculans*, además de *Barnesiella intestinihominis*, del filo Bacteroidetes. Por el contrario, en los no respondedores se describió una mayor abundancia de *Bacteroides thetaiotaomicron* (filo Bacteroidetes), *Adlercreutzia equolifaciens* y *Bifidobacterium dentium* (filo Actinobacteria), y *Mogibacterium* (filo Firmicutes) (140). Un segundo meta-análisis de Liang *et al.* con 128 pacientes observó una mayor riqueza de microbiota en respondedores - RC, RP y EE de al menos 6 meses -, sin diferencias en la diversidad. En cuanto a los microorganismos identificados, se describió un aumento del filo Firmicutes - géneros *Lachnospiraceae* y *Subdoligranulum* -, filo Bacteroidetes - género *Barnesiella* - y del filo Proteobacteria - género *Aestuariispira* - en respondedores. Por el contrario, los géneros *Bacteroides*, *Bilophila* y *Blautia* se observaron enriquecidos en no respondedores (141).

En relación con los modelos preclínicos de melanoma, varios estudios han destacado el papel antitumoral del género *Bifidobacterium*. Se ha observado que este microorganismo puede inducir la diferenciación de células T a Th1, estimular la función efectora de las células T CD8+ y CD4+, promover la secreción de IFN $\gamma$  y ejercer un efecto regulador sobre las células dendríticas (111, 142, 143).

En resumen, si bien la microbiota ha surgido recientemente como un posible biomarcador predictivo de respuesta a la inmunoterapia, aún quedan interrogantes por resolver. Esto se debe, en parte, a que la composición de la microbiota puede alterarse debido a diversos factores, como la dieta del paciente, el uso de antibioterapia, la ingesta de probióticos, u otros fármacos como los corticoides o los inhibidores de la bomba de protones (144, 145, 146). Además, la literatura científica reporta resultados diversos que varían según el tipo de tumor, el estadio o el tratamiento utilizado. Por lo tanto, llegar a una conclusión sobre el papel de la microbiota en cáncer resulta complejo dada la influencia de un gran número de factores externos e internos, así como la presencia de múltiples escenarios oncológicos.

#### **I.VI.4.b Microbiota y terapias dirigidas a vías moleculares**

La influencia de la microbiota en las vías oncogénicas moleculares y su posible impacto en la eficacia de las terapias dirigidas aún no es bien conocido. En melanoma, no existe evidencia sobre cómo la composición de la microbiota puede afectar la respuesta a la terapia con iBRAF/MEK en pacientes con mutaciones en *BRAF*. Este apartado se centra en revisar los resultados disponibles sobre la influencia de la microbiota en las vías moleculares, sobre todo la de las MAPK. Dado que no hay datos específicos sobre el melanoma, la *Tabla 2* resume la evidencia de la microbiota intestinal en pacientes con CCR con mutación de *BRAF* (147, 148, 149, 150). El objetivo es evaluar la asociación entre la microbiota y esta vía molecular, proporcionando un marco de referencia para nuestro estudio.

**Tabla 2.** Resumen de la evidencia disponible acerca de la microbiota intestinal en pacientes con cáncer colorrectal (CCR) y mutación de la vía de las MAPK.

Estudios de microbiota intestinal y vía MAPK			
	N	Resultados	Vías involucradas y biomarcadores
Wei et al. (2016) [147]	180 pacientes con CCR	<p><u>BRAF</u> o <u>KRAS</u> mutados</p> <p><b>Filo Fusobacteriota:</b> <i>Fusobacterium nucleatum</i></p> <p><b>Filo Bacteroidetes:</b> <i>Bacteroides fragilis</i></p>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> asociado a aumento de TNF- $\alpha$ , $\beta$ -catenin y NF- $\kappa$ B, y <i>Bacteroides fragilis</i> a COX-2, MMP-9 y NF- $\kappa$ B (vías de inflamación). Ambas especies asociadas a peor pronóstico.
Trnieri et al. (2020) [148]	33 pacientes con CCR ( <i>BRAF</i> mutados y wild type) y 13 sujetos sanos (grupo control) / segundo estudio en modelos de ratón	<p>Pacientes <i>BRAF</i> mutados y grupo control con mayor diversidad de microbiota que <i>BRAF</i>-wild type.</p> <p><i>BRAF</i> mutados (predominio de Firmicutes sobre Bacteroidetes)</p> <p><b>Filo Firmicutes:</b> <i>Hungateiclostridium saccincola</i>.</p> <p><b>Filo Bacteroidetes:</b> <i>Prevotella enoea</i> y <i>Prevotella dentalis</i></p> <p><b>Filo Proteobacteria:</b> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>, <i>Sutterella megalosphaerooides</i></p> <p><b>Filo Verrucomicrobiota:</b> <i>Victivallales bacterium</i></p> <p><i>BRAF</i> no mutados (predominio de Bacteroidetes sobre Firmicutes).</p> <p><b>Filo Bacteroidetes:</b> <i>Bacteroides ovatus</i>, <i>Bacteroides dorei</i>,</p> <p><b>Filo Firmicutes:</b> <i>Ruthenibacterium lactatiformans</i>, <i>Lachnoclostridium phocaeense</i></p>	Correlación positiva entre microorganismos del filo Firmicutes ( <i>Oscillibacter</i> , <i>Desulfiallas</i> , <i>Anaerostipes</i> , <i>Ethanoligenens</i> , y <i>Akkermansia</i> ) y genes involucrados en la vía <i>BRAF</i> relacionados con inflamación, inmunidad innata y transición epiteilo-mesénquima.
Sui et al. (2020) [149]	30 pacientes con CCR (10 <i>KRAS</i> mutados)	<p><i>KRAS</i> mutados (predominio de Bacteroidetes y Actinobacteria)</p> <p><b>Filo Bacteroidetes:</b> <i>Parabacteroides</i>,</p> <p><b>Filo Actinobacteria:</b> <i>Metascardovia</i></p> <p><b>Filo Firmicutes:</b> <i>Roseburia</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>Bacillales</i></p> <p><i>KRAS</i> no mutados</p> <p><b>Filo Firmicutes:</b> <i>Clostridiales</i>, <i>Lachnospiraceae</i>, <i>Coproccoccus</i>, y <i>Ruminococcaceae</i></p> <p><b>Filo Bacteroidetes</b></p>	Peor supervivencia en pacientes portadores de la mutación <i>KRAS</i> .
Shariati et al. (2021) [150]	30 pacientes con CCR (9 <i>KRAS</i> y 2 <i>BRAF</i> mutados)	<p><i>KRAS</i> mutados</p> <p><b>Filo Fusobacteriota:</b> <i>Fusobacterium nucleatum</i></p>	<i>Bacteroides fragilis</i> era la bacteria más abundante en las muestras.

Un estudio en pacientes con CCR describió una mayor diversidad de especies y un aumento en la abundancia del filo Firmicutes en pacientes con mutación *BRAF* respecto a pacientes *wild-type*. Además, reportó un predominio de las especies *Hungateiclostridium saccincola*, *Prevotella enoteca*, *Prevotella dentalis*, *Sutterella megalosphaeroides*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Victivallales bacterium* en pacientes mutados, en comparación con los pacientes *wild-type* que presentaban una mayor abundancia de *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides dorei*, *Ruthenibacterium lactatiformans*, y *Lachnoclostridium phocaeense* (148). Estas diferencias en la composición de la microbiota entre pacientes mutados y no mutados podría indicar un mecanismo de promoción de la carcinogénesis mediado por *BRAF* y promovido por estos microorganismos. Este proceso se ha descrito en otro estudio de pacientes con CCR *BRAF* y *KRAS* mutado, en relación a las especies *Fusobacterium nucleatum* y *Bacteroides fragilis* (147). Estos microorganismos parecen favorecer el desarrollo de las células tumorales al activar vías oncogénicas como la de  $\beta$ -catenina, y mediante la liberación de citoquinas, como la toxina enterotoxigénica de *Bacteroides fragilis* (151, 152).

En cáncer de pulmón, se ha investigado la influencia de la microbiota en la vía de las MAPK en pacientes con mutaciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), receptor que se encarga de activar, entre otras vías, la de RAS/RAF. Un estudio reveló que los pacientes con estas mutaciones presentaban una mayor diversidad alfa en comparación con aquellos pacientes sin estas mutaciones (153). Además, se observó que los pacientes tratados con inhibidores de EGFR que experimentaban progresión de la enfermedad mostraban una predominancia del filo Actinobacteria en la microbiota intestinal. Por el contrario, aquellos pacientes que respondían favorablemente al tratamiento con inhibidores de tirosín quinasa (ITK)

presentaban una mayor abundancia de las especies *Bacteroides ovatus* y *Bacteroides xylanisolvens*, del filo Bacteroidetes (153, 154).

En cuanto al cáncer de mama, se ha estudiado la vía de las MAPK en relación a la sobreexpresión del receptor Her2, perteneciente a la familia del EGFR. En pacientes con Her2 positivo se observó una disminución en la diversidad microbiana intestinal, con un aumento significativo del filo Bacteroidetes y una reducción del Firmicutes en comparación con las pacientes sin sobreexpresión del *Her2* (155). Además, durante el tratamiento con Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal anti-Her2, se detectó una disminución en la diversidad alfa y niveles reducidos del filo Firmicutes, especialmente de las familias *Lachnospiraceae* y *Turicibacteraceae*, así como una reducción de *Bifidobacteriaceae*, y *Prevotellaceae* en la microbiota de pacientes que no respondieron al tratamiento (156).

En relación al melanoma, destaca un estudio retrospectivo de 168 pacientes diagnosticados de melanoma metastásico y cáncer de pulmón no microcítico tratados con ITK. Este estudio evidenció un descenso en la SLP y en la SG en pacientes expuestos a antibioterapia durante el tratamiento con ITK. Si bien la hipótesis postulada fue que el uso de antibioterapia provocó el descenso en número y diversidad del microbioma intestinal, lo cual ocasionó un detrimento de la supervivencia, esto no fue confirmado con un análisis específico de la microbiota. Además, se destacó la importancia de considerar como factor causal a la modulación del citocromo 3A4 por ciertos fármacos, como los macrólidos, la rifampicina o los antifúngicos, dado que esto puede alterar los niveles de ITK en sangre y, en consecuencia, impactar en la efectividad del tratamiento (157). En consecuencia, es necesario considerar otros factores que pueden influir en la supervivencia en este contexto y que no dependen de la microbiota, como por

ejemplo la presencia de una infección que justifica el uso de antibioterapia, la necesidad de una hospitalización, además de la presencia de enfermedades distintas (melanoma y cáncer de pulmón, en este caso), en estadios diferentes y con tratamientos diversos. Por lo tanto, si bien estos resultados generan hipótesis, se requiere de mayor evidencia científica para poder desarrollar conclusiones definitivas.

---

Una vez expuesta la evidencia disponible en cuanto a la microbiota, el sistema inmune y el cáncer, y ante la escasez de estudios clínicos específicos en pacientes con melanoma tratados con terapia dirigida, surge la hipótesis que guiará la presente tesis doctoral. Este trabajo propone explorar un nuevo campo de investigación centrado en los mecanismos de reactivación del sistema inmune y la composición e influencia de la microbiota intestinal en pacientes con melanoma metastásico portadores de la mutación *BRAF* y tratados con inhibidores de BRAF/MEK. Se espera que los hallazgos obtenidos puedan generar nuevas hipótesis de biomarcadores y contribuyan a optimizar el enfoque terapéutico actualmente empleado en estos pacientes.

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## II.I HIPÓTESIS

*La detección de genes relacionados con respuesta inmune en sangre, y la composición de la microbiota intestinal en pacientes con melanoma irresecable o metastásico tratados con inhibidores de BRAF/MEK, podría tener valor pronóstico y/o predictivo de respuesta al tratamiento.*

## II.II OBJETIVOS

### II.II.1 Objetivos Primarios

- Determinar la composición de la microbiota intestinal previo y durante el tratamiento con terapia dirigida con iBRAF/MEK en pacientes con melanoma irresecable o metastásico (MM) con mutación *BRAF*, y correlacionarlo con la respuesta.
- Identificar microorganismos pronósticos y/o predictivos de duración de respuesta a terapia dirigida en pacientes con MM con mutación *BRAF*.
- Identificar marcadores inmunológicos en la sangre que estén relacionados con la reactivación de la respuesta inmune, antes y durante el tratamiento con terapia dirigida con iBRAF/MEK, y correlacionarlo con la respuesta.

### II.II.2 Objetivos Secundarios

- Correlacionar la expresión génica sanguínea y la microbiota con supervivencia.
- Correlacionar variables clínicas y analíticas con supervivencia.

- Correlacionar la composición de la microbiota y variables clínicas en relación a la aparición de toxicidad a terapia dirigida.
- Generar hipótesis para optimizar la selección de mejores candidatos a terapia dirigida.

# III. MATERIAL Y MÉTODOS

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## III. MATERIAL Y MÉTODOS

### III.I Diseño del estudio

El presente trabajo es un estudio observacional prospectivo, coordinado y llevado a cabo en los Hospitales Universitarios Regional y Virgen de la Victoria y en el Instituto de Investigación Biomédica (IBIMA) en Málaga, España. Se analizaron muestras de sangre y heces de pacientes diagnosticados de MM *BRAF*-mutados.

### III.II Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años, con capacidad para entender todos los procedimientos del estudio.
- Pacientes con MM (estadio IIIC-IIID o IV según la clasificación AJCC - 8va edición TNM) que, durante la duración del proyecto, vayan a recibir terapia con iBRAF en combinación con iMEK.
- Melanoma positivo para la mutación *BRAF* V600 evaluado localmente.
- Enfermedad medible según los criterios de *Response Evaluation Criteria In Solid Tumors* (RECIST v1.1) (158).
- Pacientes que estén de acuerdo con la recolección de las muestras de sangre y que proporcionen las muestras de heces en los períodos estipulados por el estudio.
- Consentimiento informado por escrito antes de cualquier procedimiento, según la Declaración de Helsinki (OMS).

### **III.III Criterios de exclusión**

- Presencia de cáncer activo en los últimos dos años.
- Patología autoinmune o enfermedad infecciosa no controlada.
- Pacientes que no quieran someterse a análisis sanguíneo y de heces.

### **III.IV Comité de ética**

El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética en Mayo de 2019. Los pacientes incluidos en el estudio firmaron el consentimiento informado para participar de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

### **III.V Consentimiento informado**

En el momento de la selección del paciente, en la consulta de Oncología Médica, se explicaron los objetivos y la intención del estudio, además del método de obtención de muestras y el fin de las mismas. Se otorgó al paciente un adecuado tiempo de reflexión y de aclaración de dudas. Una vez dado su consentimiento verbal, se procedió a la firma del consentimiento informado escrito, según la Ley 41/2002 del 14 de Noviembre. Esta normativa regula la autonomía del paciente, sus derechos y obligaciones en materia de información, y documentación clínica (159). En el *Anexo Figura S1* se adjunta un modelo del consentimiento utilizado.

### **III.VI Variables recogidas**

- Variables clínicas/asistenciales: Edad al diagnóstico; sexo; antecedentes cardiovasculares; historia de tabaquismo; ECOG-PS (Eastern Cooperative Oncology Group/Performance Status) al diagnóstico; localización del primario tumoral; estadio TNM AJCC 8va edición al diagnóstico; resección del primario; uso

de adyuvancia tras resección del primario; tipo y duración del tratamiento adyuvante; fecha diagnóstico de enfermedad metastásica; edad de diagnóstico de enfermedad metastásica; edad de inicio de tratamiento dirigido; localización de metástasis al diagnóstico; tipo de mutación de *BRAF*; inhibidor de BRAF/MEK utilizado; antibioterapia los 30 días previos al inicio de la terapia dirigida; antibioterapia durante el tratamiento con terapia dirigida; corticoterapia los 30 días previos al inicio de la terapia dirigida; corticoterapia durante el tratamiento con terapia dirigida; toma de inhibidores de la bomba de protones; polifarmacia (definido como toma de al menos 5 fármacos); fecha de inicio y fin de la terapia dirigida; ECOG al inicio de la terapia dirigida; toxicidad relacionada con el tratamiento; grados de toxicidad relacionada con el tratamiento; requerimiento de reducción de dosis; suspensión de tratamiento por toxicidad o progresión; cambio de inhibidor BRAF/MEK por intolerancia; mejor respuesta medida por Tomografía Computada (TC) según criterios RECIST v1.1 a la terapia dirigida; localización de la progresión; fecha de la progresión; líneas posteriores de tratamiento tras terapia dirigida; uso de inmunoterapia o quimioterapia posterior; y fecha de última visita o exitus.

- En cuanto a las variables analíticas que pudieran tener relevancia en el análisis, se incluyeron: hemoglobina; plaquetas; recuento absoluto de leucocitos; recuento absoluto de neutrófilos (ANC); recuento absoluto de linfocitos; ratio neutrófilo/linfocitos [NLR=ANC/Linfocitos]; derivada del ratio neutrófilo/linfocitos [dNLR=ANC/(Leucocitos-ANC)]; LDH; glucosa; colesterol total; lipoproteínas de alta densidad (HDL); lipoproteínas de baja densidad (LDL); triacilglicéridos (TAG), función hepática; creatín-quinasa; fosfatasa alcalina; ionograma (sodio, potasio, cloro, calcio, fósforo, magnesio); perfil férrico (hierro, transferrina, ferritina);

proteína C reactiva (PCR); ácido úrico; albúmina; prealbúmina; hemoglobina glicosilada; proteínas totales; función tiroidea y vitamina D.

- Las variables cuantitativas continuas se analizaron tanto en la primera como en la segunda muestra de cada paciente, para posteriormente categorizarlas por subgrupos por cuartiles, medias y medianas.

- Variables experimentales: según los resultados obtenidos en el análisis de las muestras.

### **III.VII Ámbito del estudio**

El estudio fue coordinado por los Hospitales Universitarios Virgen de la Victoria y Regional Carlos Haya de Málaga, España, locación donde se realizó el reclutamiento y seguimiento de los pacientes incluidos, así como la recolección de las muestras de sangre y heces. El procesamiento de las muestras de sangre y el análisis de expresión génica se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Cáncer (CIMES), y el estudio de la microbiota en IBIMA. Los datos fueron analizados por el equipo de bioinformática de IBIMA y por un colaborador del Departamento de Oncología Médica del hospital Georges Pompidou, de París, Francia.

### **III.VIII Recogida de muestras**

Tras la aprobación del estudio en Mayo de 2019 por el Comité Ético de Investigación, 26 pacientes fueron reclutados desde Mayo 2019 hasta Noviembre 2022. A los pacientes seleccionados para su participación en este estudio se les recogieron dos tipos de muestra:

- Sangre: de cada paciente se extrajeron 12 mililitros (mL) de sangre periférica, recogidos en tubos de EDTA.
- Heces: se recogió una pequeña muestra en contenedor, con ayuda del escobillón, que se introdujo posteriormente en tubo, tipo BBL Culture Swab Plus™.

Las muestras se recogieron:

- Previo al inicio del tratamiento con iBRAF/MEK (T0).
- Durante el tratamiento con iBRAF/MEK - a los 3 meses o a la progresión, lo que ocurriese primero (T1).

El tiempo transcurrido entre la extracción de la muestra y el envío al laboratorio fue menor a 24 horas, con el objetivo de asegurar la calidad de la muestra. Una vez en el laboratorio, las muestras se mantuvieron en un congelador a -80° C hasta su procesamiento.

### **III.IX Estudio de expresión génica en muestras de sangre**

Las muestras de sangre se utilizaron para estudiar los niveles de expresión de un conjunto de genes relacionados con la respuesta inmunológica, con el objetivo de comprender el impacto de la terapia dirigida en estos pacientes. Este estudio se realizó con el sistema nCounter de Nanostring® utilizando material genético ácido ribonucleico mensajero (ARNm) extraído a partir de la línea blanca (*buffy coat*) aislada de esas muestras. Todas las muestras pasaron por filtros de control de calidad, utilizando para ello el sistema nSolver™.

### III.IX.1 Extracción de ARN

Para el aislamiento y purificación del ARN de las muestras se realizaron dos procedimientos, dependiendo de si la sangre era fresca, obtenida directamente tras la extracción de sangre, o si había sido congelada para su preservación.

Para las muestras congeladas se utilizó una versión adaptada del RNeasy Plus Universal Mini Kit™. El primer paso se llevó a cabo en una campana con extracción de gases, añadiendo a la muestra un reactivo denominado Qiazol Lysis Reagent™ en proporción 1:10 de muestra respecto al Qiazol, 100 microlitros (µL) de gDNA Eliminator Solution - que permite eliminar el ADN genómico - y cloroformo en volumen 5:1 respecto al Qiazol. Se mezcló vigorosamente la muestra y se dejó reposar 2-3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 12.000 x g (múltiplos de gravedad/fuerza centrífuga) durante 15 minutos a 4°C, lo cual permitió la separación de la mezcla en tres fases: una capa inferior con fenol y cloroformo, una interfase con proteínas, y una fase superior acuosa con el ARN. La fase superior con ARN se transfirió a un nuevo tubo para centrifuga, se le añadieron 600 µL de etanol al 70% y se mezcló vigorosamente. Se traspasaron 700 µL de la mezcla a un RNeasy Mini spin column, el cual se centrifugó a 8.000 x g durante 15 segundos. El RNeasy Mini spin column es un kit en modo columna que trae un filtro para muestras con etanol. Este kit permite que el ARN quede adherido al filtro y que el etanol lo traspase para ser descartado. Este procedimiento se repitió hasta lograr filtrar toda la mezcla por el kit columna. Una vez recolectado el ARN en el filtro, se añadieron 500 µL de un buffer denominado RPE (mezcla confidencial) y se centrifugó para eliminar completamente los residuos de etanol. Se agregaron 32 µL de agua libre y tras centrifugación durante un minuto, se midió la concentración y pureza de ARN en Nanodrop™. El Nanodrop™ es un espectrofotómetro que permite

cuantificar y determinar la pureza de muestras con ARN, ADN o proteínas mediante barrido espectral, midiendo la variación de la absorbancia con la longitud de onda empleando una microgota (160).

En cuanto a las muestras de sangre fresca, el ARN se extrajo mediante el kit QIAamp RNA Blood Mini Kit™ (Qiagen). En primer lugar, se añadió  $\beta$ -mercaptoetanol y etanol al 100% a un buffer denominado RLT (Tiocianato de Guanidina). Se mezcló la sangre del paciente con el buffer EL (Lisis Eritrocitaria) en una proporción 1:5, y se incubó en hielo durante 15 min. La mezcla se centrifugó a  $400 \times g$  durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , lo cual permite la formación de un pellet de leucocitos y un sobrenadante, este último siendo descartado. Se añadieron  $600 \mu\text{L}$  de buffer RLT al pellet de leucocitos, con el objetivo de producir la lisis de las células. El material lisado se pipeteó al QIAshredder spin column, un kit columna similar al referido previamente, y se centrifugó durante dos minutos a  $20.000 \times g$ . Posteriormente se añadió etanol al 70% (entre  $350\text{-}600 \mu\text{L}$  según el volumen de muestra), y se traspasó la mezcla a un QIAamp spin column, el cual nuevamente se centrifugó a  $8.000 \times g$  durante 15 segundos. Se preparó una mezcla de ADNasa para añadir a la columna, con agua, buffer y ADNasa con el objetivo de eliminar el ADN y purificar el ARN. Luego se agregó buffer RPE al kit columna para eliminar los residuos, centrifugando nuevamente, y transfiriendo posteriormente la columna a un nuevo tubo con agua libre. Tras nueva centrifugación, se llevó la muestra al Nanodrop™ para cuantificación y medición de pureza del ARN obtenido.

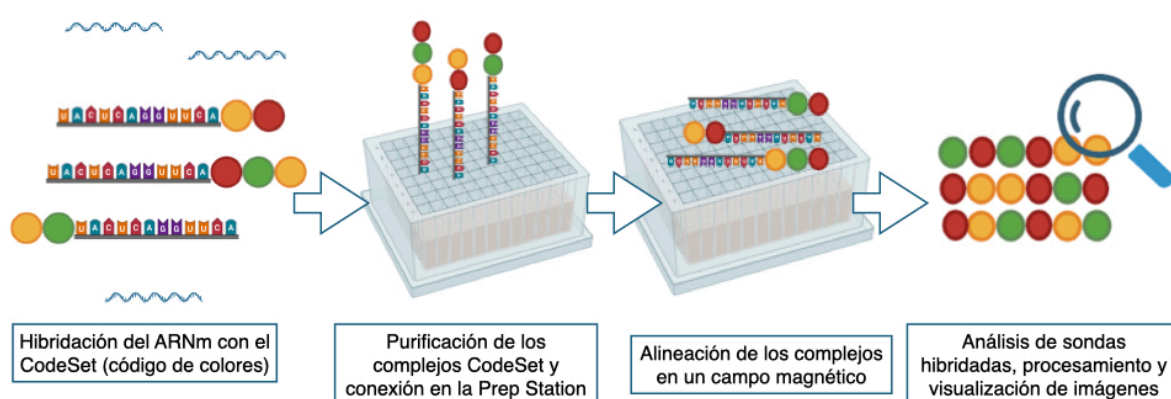
### **III.IX.2 Análisis de la expresión génica en nCounter® de Nanostring**

Para la preparación de las muestras y el análisis molecular se utilizó el sistema nCounter® de Nanostring, una plataforma de cuantificación digital de moléculas,

tanto ADN como ARN, con capacidad para estudiar en una misma reacción hasta 800 dianas de interés. En esta plataforma, cada molécula diana se identifica por un código de 6 unidades de colores que se traducen, según el panel utilizado, en un gen determinado.

El proceso consta de varios pasos (*Figura 6*):

1. Hibridación del ARNm con el CodeSet, para obtener una secuencia con un código de colores en un extremo - también denominado “código de barras”, y una sonda de captura con biotina en el otro extremo.
2. Purificación de los complejos CodeSet en la Prep Station. Conexión y organización de los complejos en una plataforma en la Prep Station. Alineación de los complejos en un campo magnético.
3. Análisis de sondas hibridadas y procesamiento de imágenes en el nCounter® Digital Analyzer para conteo y tabulación de los datos.
4. Visualización de imágenes mediante nSolver™, análisis molecular y control de calidad .



Created in BioRender.com bio

**Figura 6.** Representación del flujo de trabajo en el nCounter ®. 1) Hibridación del ARN. 2) Purificación, conexión, organización de los complejos en la Prep Station. 3) Alineación de los complejos en el campo magnético. 4) Análisis, procesamiento, y cuantificación de sondas hibridadas (161).

### III.IX.2.a Hibridación del ARN

El ARN obtenido fue cuantificado y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para asegurar su correcta conservación. Se realizaron diluciones del material nucleico para conseguir 100 nanogramos de ARN en aproximadamente  $2\ \mu\text{L}$ , con el objetivo de normalizar las muestras a los estándares exigidos por la técnica. Posteriormente, se añadió agua hasta conseguir los  $5\ \mu\text{L}$  requeridos por el sistema Nanostring nCounter® en el nCounter PanCancer Immune Profiling Panel™. El panel utilizado para el proyecto, el nCounter PanCancer Immune Profiling Panel™, es capaz de medir la expresión de 770 genes que incluyen marcadores de 24 tipos celulares y poblaciones inmunes, 30 antígenos tumorales, y otros genes involucrados en respuesta inmune.

Para que el sistema sea capaz de medir estos genes es preciso hibridar las muestras con el Reporter y Capture Probes (en su conjunto denominados CodeSet). El Reporter Probe consta de un complejo codificado por colores y el Capture Probe es una secuencia específica de bases asociada a una molécula de biotina. Este CodeSet hibrida con el ARN o ADN de interés, seleccionando secuencias de 100 nucleótidos. Para iniciar este proceso se formula una “mezcla maestra” añadiendo  $70\ \mu\text{L}$  de buffer de hibridación al Reporter CodeSet. Se añadieron  $8\ \mu\text{L}$  de “mezcla maestra” a los tubos de hibridación, y se incluyeron sucesivamente los  $5\ \mu\text{L}$  de muestra con ácidos nucleicos y  $2\ \mu\text{L}$  de Capture ProbeSet. Los tubos se introdujeron inmediatamente en un termociclador para incubación a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 20 horas con el objetivo de amplificar la muestra de ARN mediante reacción en cadena polimerasa (RCP). El fabricante recomienda una incubación de al menos 16 horas, dado que aumenta la sensibilidad de la muestra, incrementando un 5% los ciclos de RCP si se mantienen entre 16 y 24 horas.

### **III.IX.2.b Purificación, organización y alineación de complejos**

El proceso de purificación se inició en la Prep Station, que se encarga de preparar las muestras eliminando el material no hibridado - ya sea por ser cadenas muy cortas de ácidos nucleicos o por presencia de impurezas -. Una vez eliminado este material, se unieron los complejos ARN-CodeSet a placas compuestas por estreptavidina, con alta afinidad por la biotina, y se sometieron a un campo eléctrico para alinearse.

### **III.IX.2.c Análisis de sondas hibridadas**

El siguiente paso consistió en añadir las sondas alineadas en el nCounter® Digital Analyzer, cuyo objetivo es obtener imágenes de las sondas hibridadas a través de un microscopio. Este dispositivo permite el procesamiento de hasta seis cartuchos, y colecciona datos con una resolución de hasta 280 *fields of view* (FOV) en cada cartucho. El resultado se recoge en un archivo denominado Reporter Code Count que puede ser descargado para su posterior análisis en el nSolver™ Analysis Software 3.0.

### **III.IX.2.d Análisis molecular y control de calidad**

Los datos obtenidos en el Digital Analyzer fueron analizados mediante el nSolver™ Analysis Software 3.0, un software que permite realizar análisis bioinformáticos y ejecutar controles de calidad. Los defectos de calidad detectados por el programa pueden deberse a la presencia de material por debajo del límite de detección requerido o por errores durante el procesamiento de las muestras, como por ejemplo en la alineación de los cartuchos al colocarlo en el nCounter® Digital Analyzer.

### **III.X Estudio de microbiota en heces**

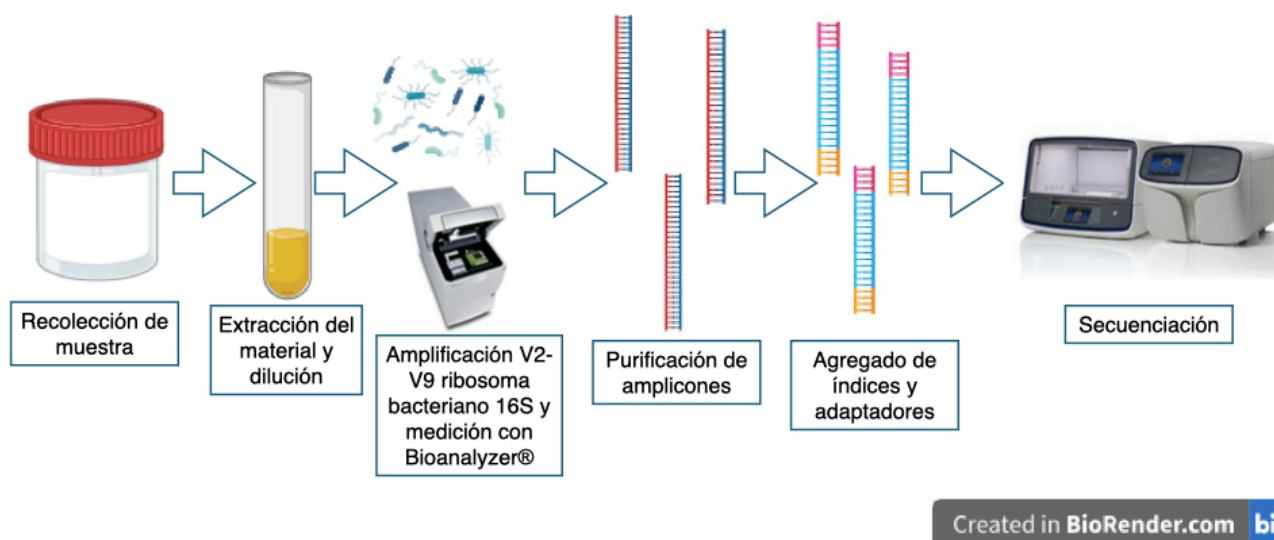
Para el procesamiento y estudio de las muestras de heces se utilizó el Ion 16S™ Metagenomics Kit (Thermofisher). Esta técnica de secuenciación amplifica la zona hipervariable V2-V9 del ARN 16S ribosomal, lo cual permite la distinción de las bacterias presentes en la muestra.

#### **III.X.1 Preparación y análisis de muestras de heces**

Las muestras de heces se recogieron en un frasco estéril de boca ancha y fueron transportados en nieve carbónica hasta el laboratorio, donde se alicuotaron y congelaron a -80 °C para su conservación hasta su procesamiento.

Los pasos del procesamiento incluyeron (*Figura 7*):

1. Extracción del material y dilución de la muestra.
2. Amplificación de la zona hipervariable V2-V9 del ribosoma 16S bacteriano.
3. Purificación de los productos amplificados.
4. Cuantificación y verificación de la calidad del ADN amplificado mediante electroforesis utilizando Bioanalyzer®.
5. Preparación y purificación de librerías: agregado de índices y adaptadores de secuenciación.
6. Secuenciación con el Ion 520™/ 530™ Kit-Chef (Thermo Fisher Scientific) y el Ion 520 chip (Ion 520™ Chip Kit).



**Figura 7.** Representación de la preparación y el análisis de muestras de heces para la microbiota.

### III.X.2 Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se utilizó un kit columna similar al mencionado previamente para las muestras de ARN, con el objetivo de purificar el ADN bacteriano y eliminar los residuos.

### III.X.3 Amplificación de la zona hipervariable del ribosoma 16S

La amplificación de la zona hipervariable V2-V9 del ribosoma bacteriano 16S se realizó mediante el Ion16S™ Metagenomics Kit, según el protocolo del fabricante. Se prepararon dos mezclas para cada muestra, una que incluía 12  $\mu\text{L}$  de la muestra de interés, un control positivo con 2  $\mu\text{L}$  de *Escherichia coli* diluido en 10  $\mu\text{L}$  de agua y un control negativo. A cada mezcla se le añadieron 15  $\mu\text{L}$  de una “mezcla maestra”, 3  $\mu\text{L}$  del 16S Primer Set y agua hasta obtener 30  $\mu\text{L}$  de solución en ambos tubos. Se realizaron 25 ciclados a diversas temperaturas y posteriormente se determinó la calidad y cantidad del ADN disponible mediante el sistema

Bioanalyzer®. Este software realiza NGS y múltiples RCP, que permiten calcular de manera exacta el tamaño y la concentración de los fragmentos de ADN.

### **III.X.4 Purificación de los productos amplificados**

Para purificar los amplicones se utilizó un reactivo denominado Agencourt® AMPure® XP Reagent compuesto de partículas magnéticas en solución acuosa. Se añadieron 54 µL de este reactivo en cada tubo, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, se colocaron las muestras en una estantería magnética durante 3 minutos, y luego se descartó el sobrenadante obtenido, manteniendo así el ADN de interés en el pellet.

Posteriormente, se añadieron 100 µL de etanol al 70% en cada tubo, descartando el sobrenadante. El siguiente paso consistió en añadir 15 µL de agua libre de nucleasa al pellet para separar y eliminar las partículas magnéticas unidas al ADN de interés, para obtener así las muestras purificadas. Para cuantificar y verificar la cantidad de ADN amplificado se utilizó el software Bioanalyzer®.

### **III.X.5 Preparación de librerías**

Para la preparación de las librerías previo a la secuenciación, los amplicones se trataron con el kit Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific). A cada muestra se le añadieron 180 µL de Agencourt® AMPure® XP Reagent y se incubó el resultante durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se colocaron las muestras nuevamente en la estantería magnética y se descartó el sobrenadante. Se añadieron 500 µL de etanol al 70%, y se descartó el sobrenadante tras 30 segundos de incubación, repitiendo el procedimiento para un segundo lavado de la muestra.

A cada muestra se le añadieron 25  $\mu$ L de Low TE, un buffer que permite la separación de las partículas magnéticas y la resuspensión del ADN purificado. El sobrenadante resultante de cada muestra con el ADN se transfirió a tubos nuevos.

### **III.X.5.a Agregado de índices y adaptadores**

El agregado de índices a las muestras permite la unión del ADN a adaptadores para una correcta secuenciación posterior. Este proceso fue llevado a cabo con el Ion XPress Barcode Adapters 1-96 kit (Thermo Fisher Scientific), mediante una serie de reactivos que incluyen un buffer ligasa, una ligasa ADN, una polimerasa, adaptadores e índices/códigos de barras. Las librerías creadas fueron purificadas con el AMPure® XP beads (Beckman).

### **III.X.6 Secuenciación**

La emulsión y la secuenciación de las librerías se realizó con el kit Ion 520™/530™ Kit-Chef (Thermo Fisher Scientific) y el Ion 520 chip (Ion™ Chip Kit), utilizando el Ion Chef y la plataforma Ion Torrent S5™ system. Los datos obtenidos fueron procesados y analizados por el equipo de investigación de IBIMA.

## **III.XI Análisis bioinformático**

El análisis de datos se realizó en cuatro partes:

A) Análisis descriptivo de variables clínicas y experimentales, y análisis de supervivencia.

B) Análisis de expresión diferencial de genes en sangre en estado basal a la terapia dirigida.

C) Inspección de los genes en sangre diferencialmente expresados en longitudinalidad.

D) Análisis de microbiota.

### **III.XI.1 Análisis descriptivo de variables clínicas y experimentales, y análisis de supervivencia**

Para establecer los puntos de corte de los parámetros analíticos se emplearon los rangos de referencia proporcionados por el laboratorio local. Los puntos de corte de la LDH y la PCR se establecieron en función a los límites superiores de la normalidad (LSN) establecidos por el laboratorio local, mientras que el del ANC se estableció en un valor igual o superior a 7500/mL de sangre, según lo establecido en la literatura como determinante de mal pronóstico (162, 163). Se calcularon el NLR y el dNLR, variables identificadas como biomarcadores pronóstico. De acuerdo a la literatura, el NLR se consideró como elevado-severo a partir de un valor de 5. Un dNLR igual o mayor a 3 se consideró como de alto riesgo (67, 68, 164, 165, 166). La tasa de respuesta objetiva al tratamiento (ORR, por sus siglas en inglés) se definió como aquellos pacientes con RC o RP en el TC de evaluación, medido según RECIST v1.1, mientras que la tasa de control de la enfermedad (DCR, por sus siglas en inglés) se definió como los pacientes con RC, RP, o EE. La gradación de la toxicidad al tratamiento se realizó según el *Common Terminology Criteria for Adverse Events* versión 5 (CTCAE v5.0) (167).

El análisis estadístico se realizó con los softwares SPSS® 29.0.1.0 y R studio. Para el análisis descriptivo de las variables numéricas se obtuvieron la mediana y el rango, y para las variables categóricas las frecuencias absolutas y relativas. Se realizó un test de Shapiro-Wilk para verificar la normalidad de las variables

cuantitativas. Posteriormente se replicó la estadística descriptiva estratificando la cohorte en “No respondedora” (NR) y “Respondedora” (R). La cohorte R incluyó a aquellos pacientes con RC y RP. Por el contrario, la cohorte NR incluyó a los pacientes con EE o PE. El objetivo de estratificar de esta manera a los pacientes es evaluar si existe una asociación significativa entre las variables y la respuesta al tratamiento. La ORR y la DCR y sus Intervalos de Confianza del 95% (IC95%) se calcularon mediante el test binomial. Las diferencias en las variables clínicas entre cohortes se calcularon mediante el *likelihood ratio test* (test de verosimilitud), considerando como valor significativo a una  $p$  inferior a 0.05.

Para el análisis de supervivencia se utilizó el método Kaplan Meier, y para el cálculo de las diferencias entre curvas el test de Log-Rank. La SG se calculó desde el inicio del tratamiento dirigido hasta el fallecimiento por cualquier causa o última visita. La SLP se calculó desde el inicio del tratamiento dirigido hasta la progresión o última visita. El análisis univariante de variables clínicas en relación a la supervivencia se llevó a cabo con el modelo de regresión de Cox, con los resultados presentados como Hazard Ratio (HR) y su IC95%.

### **III.XI.2 Análisis de expresión diferencial de genes en sangre, en estado basal a la terapia dirigida y en T1**

El análisis de expresión diferencial de genes se realizó con NanoTube, flujo de trabajo que se encarga del procesamiento, el control de calidad, el análisis y la visualización de los datos obtenidos en NanoString nCounter® (168). El método de normalización empleado fue el RUVg (Remove Unwanted Variation Using Control Genes), que utiliza genes *housekeeping* y controles positivos y negativos que no estén diferencialmente expresados en las muestras para detectar las variaciones de

los genes de interés (169). Todas las muestras pasaron por el control de calidad de nSolver™, que reporta el porcentaje de campos de visión que se capturan en el proceso y la densidad de unión, que representa la concentración de “códigos de barra” (170). En este control, los factores de escala de los *housekeeping* se concentran entre 0.1 y 10, y los factores de escala de los controles positivos y negativos entre 0.3 y 3. Posteriormente, el análisis final se realizó con Limma (Linear Models for Microarray and RNA-Seq), un software que puede analizar la expresión diferencial de genes (171). Los cambios en la expresión de genes se calcularon mediante escala logarítmica ( $\log_2$ ), tomando aquellos cambios superiores a 1 como significativos. Los análisis se realizaron estratificando a la cohorte en R y NR, y un segundo análisis fue realizado en los pacientes con RC y No-RC, tanto en T0 como en T1. La significación estadística se estableció en un valor de  $p < 0.05$ .

### **III.XI.3 Inspección de los genes en sangre diferencialmente expresados en longitudinalidad**

En el análisis longitudinal para determinar los cambios de T0 a T1 se empleó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, prueba no paramétrica que compara las diferencias entre pares de datos para determinar si tienen una distribución simétrica en torno a un valor (172). Para determinar si los genes diferenciales se mantenían en el tiempo, se realizó asimismo un análisis diferencial en T1.

Se realizó una regresión logística binaria utilizando como variable dependiente la respuesta al tratamiento. Este análisis se focalizó en los pacientes que recibieron inmunoterapia adyuvante para evaluar si los niveles de expresión génica en estos pacientes se correlacionaban con la respuesta clínica. Además, se compararon los niveles de genes presentes en los pacientes R según la administración previa o no

de inmunoterapia, mediante el Chi2 si las variables se ajustaban a la normalidad por Shapiro-Wilk, o mediante el U Mann Withney Test, si no cumplían este requisito. El objetivo de este análisis era identificar si la inmunoterapia previa influía en los niveles de expresión génica en los pacientes R.

### **III.XI.4 Análisis de microbiota**

Con respecto al análisis de la microbiota, los resultados obtenidos en la secuenciación se procesaron mediante la plataforma de análisis bioinformático QIIME2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology). Se utilizó la interfaz QIIME2 para identificar lecturas repetidas en bases de datos de metagenómica. Este análisis incorpora varios programas que ofrecen la capacidad de agrupamiento rápido de secuencias similares y de realizar filtrados. Cada una de las secuencias se asignó a una identidad potencial (OTUs) utilizando el clasificador UCLUST de taxonomía por consenso. La asignación taxonómica de las secuencias se realizó mediante la búsqueda de homologías entre la secuencia problema y las secuencias ya conocidas y depositadas en las bases de datos (*GreenGenes*). Las estimaciones de diversidad entre poblaciones de microorganismos se llevó a cabo según la literatura (173). La diversidad alfa fue calculada usando los estimadores de diversidad Simpson y Shannon. La diversidad beta se calculó mediante el análisis de escalamiento multidimensional (NMDS) basado en Bray-Curtis. Se realizó un análisis LEfSe (Análisis de Efecto Lineal discriminante de tamaño Efectivo o LDA Effective Size) que combina el estadístico no paramétrico Kruskal-Wallis para identificar diferencias significativas entre cohortes, con LDA (Análisis Discriminante Lineal) para estimar la magnitud del efecto de estas diferencias. El programa utilizado para realizar este análisis fue *The Huttenhower Lab*, una herramienta

bioinformática desarrollada por el Departamento de Bioestadística de la Escuela de Salud Pública de Harvard. Este análisis permite, por un lado, identificar características taxonómicas significativas entre los dos grupos de muestras, y por el otro, evaluar la relevancia biológica de estas diferencias al estimar su efecto discriminante.

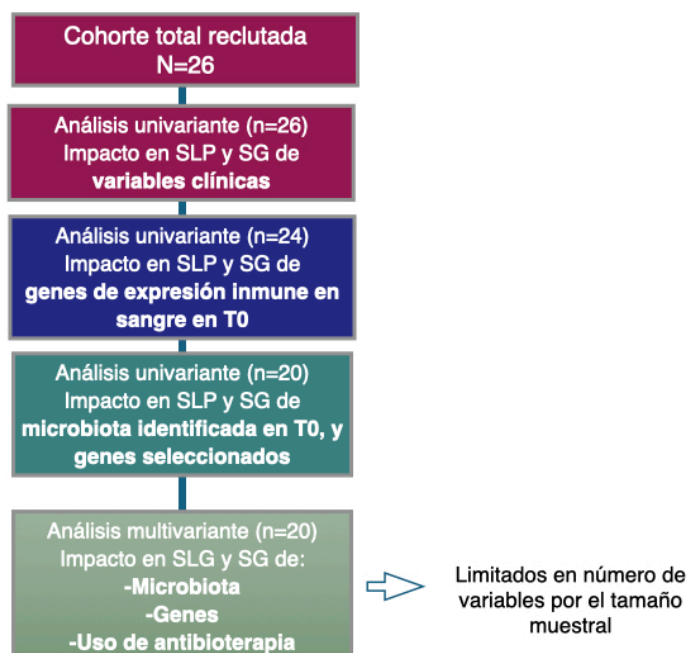
El análisis en T0 y T1 de alfa y beta diversidad se realizó en las cohortes R y NR, y en la de RC y No-RC. El análisis LEfSe se realizó solo en la cohorte RC y No-RC, para mitigar posibles errores estadísticos causados por el desbalance entre las cohortes R y NR, y a su vez identificar a los microorganismos asociados a la mayor respuesta posible a la terapia dirigida. Resulta crucial destacar que la presencia de RC en los pacientes tratados con iBRAF/MEK está asociado a mayor supervivencia en comparación con aquellos pacientes que no alcanzan RC, razón por la cual es de relevancia identificar la microbiota asociada a esta respuesta (174, 175, 176). Además, se replicó el análisis LEfSe en la cohorte que experimentó eventos adversos relacionados con el tratamiento de al menos grado 2, para evaluar el posible impacto de la microbiota en su aparición. Se utilizó como punto de corte el grado 2 según la CTCAE v5.0 para incluir en el análisis toxicidad moderada-severa que pudiera ser significativa a nivel clínico, asegurando de esta manera la inclusión de aquellos eventos que requieren una potencial intervención médica. Se realizó una regresión logística binaria para correlacionar microorganismos asociados a toxicidad con los efectos adversos que mostraron diferencias significativas entre R y NR en el análisis de variables clínicas según el *likelihood ratio test*. Los resultados se presentan como Odds Ratio (OR) y su IC95%. El nivel de significancia se estableció en  $p$  inferior a 0,05.

### **III.XI.5 Correlación de genes de expresión inmune y microbiota con supervivencia**

Los análisis se realizaron utilizando los resultados de microbiota y genes a tiempo basal - T0 -, para identificar genes y microorganismos con impacto pronóstico previo al inicio del tratamiento, sin verse influenciados por el tratamiento dirigido y sus posibles toxicidades (*Figura 8*).

Se realizó un análisis univariante de regresión de Cox en la cohorte por protocolo de genes (n=24), utilizando los resultados significativos a T0 del análisis de expresión génica para correlacionarlos con supervivencia. Además, se replicó el análisis univariante en la cohorte por protocolo de microbiota (n=20). Se incluyeron los microorganismos significativos a T0 del análisis de microbiota, los genes significativos en el análisis univariante de expresión génica en T0, y genes que fueron considerados de relevancia en ambos tiempos - T0 y T1. El objetivo era identificar aquellos genes y microorganismos que podrían tener más impacto en supervivencia, para incluirlos posteriormente en el multivariante.

Se realizó un análisis multivariante de regresión de Cox con el objetivo de determinar el impacto pronóstico de los genes de expresión inmune y la microbiota. Se seleccionaron como variables de interés: el uso de antibioterapia durante el tratamiento dirigido, dada la evidencia que la asocia a cambios en la composición de la microbiota e impacto en supervivencia (132, 157); genes de reactivación inmune identificados como significativos en el univariante; y microorganismos identificados en pacientes con RC. Los resultados se presentan como HR y su IC95%. Además, ante los hallazgos en el análisis multivariante, se realizó una prueba T de student para correlacionar variables cuantitativas significativas, de distribución normal, con la respuesta.



**Figura 8.** Selección de variables para los análisis univariante y multivariante, y cohorte utilizada en cada análisis.

### III.XII Seguimiento de pacientes

Los pacientes se siguieron en consulta cada 4 semanas o, en caso de requerirlo por toxicidad o estado clínico del paciente, en un menor período de tiempo. La primera evaluación mediante TC se realizó entre las 10-14 semanas. La respuesta fue medida mediante criterios RECIST v. 1.1.

### III.XIII Limitaciones del estudio

Las limitaciones del estudio incluyen:

- El pequeño tamaño muestral, dado que es una población muy seleccionada de una patología con una incidencia baja.

- La dificultad para extrapolar los resultados en la práctica clínica diaria, debido a que no todos los centros poseen las herramientas para la recolección, el análisis y el procesamiento de las muestras.

- La presencia de factores de confusión. Al ser un estudio observacional, puede haber variables que pueden influir en las asociaciones observadas.

**NOTA:** Se ha creado un repositorio en GitHub para otorgar acceso a los datos utilizados en el análisis de este proyecto (<https://github.com/moraguarda/TesisMicrobiota>).

# IV. RESULTADOS

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## IV. RESULTADOS

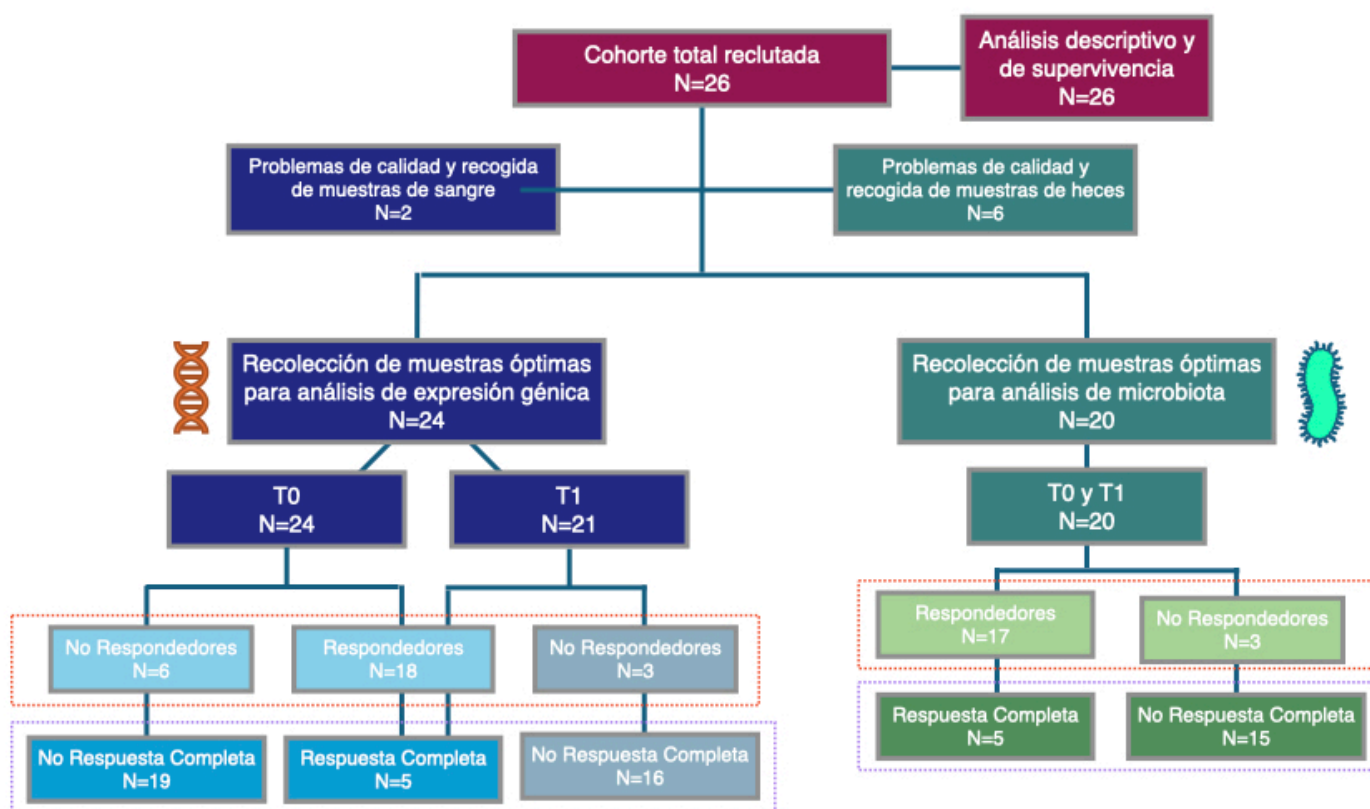
### IV.1 Características clínicas de la población de estudio

Se analizaron un total de 26 pacientes diagnosticados de melanoma metastásico o irresecable, *BRAF* V600 mutado, candidatos a tratamiento en primera línea con iBRAF/MEK. Un total de 20 pacientes recolectaron las dos muestras de heces de T0 y T1 para el análisis de microbiota en condiciones óptimas, y 24 pacientes recolectaron muestras de sangre para el análisis de expresión génica (*Figura 9*). De los 6 pacientes no incluidos en la cohorte de microbiota, 4 no aportaron las muestras en el tiempo requerido, uno falleció antes de recolectar la segunda muestra por enfermedad rápidamente progresiva, y otro estuvo ingresado un tiempo prolongado previo a la toma de la segunda muestra por progresión de la enfermedad y deterioro del estado general que culminó en exitus. En cuanto a las 2 muestras faltantes de la cohorte de genes, éstas no alcanzaron los criterios de calidad por errores en la recolección y el procesamiento. Las características clínicas, analíticas y del tratamiento de la cohorte se representan en la *Tabla 3*.

La mediana de edad de la cohorte al inicio de la terapia dirigida era de 55 años (rango 23-80), con un 69,2% (n=18) de los pacientes diagnosticados de melanoma antes de los 60 años. Al diagnóstico, la mayoría de los pacientes presentaban el primario a nivel dorsal (42,3%; n=11) o en miembros inferiores (19,2%; n=5), mientras que en 3 pacientes (11,5%) el primario era de origen desconocido. La resección se llevó a cabo en el 88,5% (n=23), y 9 de ellos recibieron tratamiento adyuvante, en su mayoría con inmunoterapia con nivolumab o pembrolizumab. Al inicio de la terapia dirigida, 16 pacientes (61,5%) tenían un estadio M1c-d, de los

cuales el 43,7% presentaban metástasis hepáticas, y el 56,3% en el sistema nervioso central (SNC).

En cuanto al uso de fármacos relevantes que han demostrado tener un impacto en la microbiota intestinal (144, 145, 146, 177, 178), se identificaron 3 (11,5%) pacientes que habían utilizado antibioterapia los 30 días previos a la toma de muestra y 9 (34,6%) pacientes que habían utilizado corticoterapia en el mismo período. A su vez, el 42,3% (n=11) de la población era consumidora habitual de inhibidores de la bomba de protones y el 30,8% (n=8), de polifarmacia, definido como la toma de al menos 5 fármacos diarios (179, 180).



**Figura 9.** Diagrama de cohorte total reclutada (n=26) y según la recolección de muestras de sangre (n=24) y de heces (n=20). El total de pacientes con muestras de heces disponían también de muestras de sangre en ambos tiempos.

**Tabla 3.** Características generales clínicas, analíticas, y del tratamiento de la población por intención de tratar (n=26). LDH: Lactato deshidrogenasa, LSN: Límite superior de la normalidad, NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos, dNLR: Derivada del NLR [Neutrófilos/(Leucocitos-Neutrófilos)], PCR: Proteína C Reactiva, RC: Respuesta completa, RP: Respuesta parcial, EE: Enfermedad estable, PE: Progresión de la enfermedad, ORR: Tasa de respuesta objetiva, SLP: Supervivencia libre de progresión, SG: Supervivencia global.

Características generales (n=26)		Características generales (n=26)	
Variables clínicas	n (%)	Tratamiento y toxicidad	n (%)
Edad, mediana (rango)	55 (23-80)	Inhibidor BRAF/MEK administrado Dabrafenib-Trametinib Encorafenib/Binimetinib	21 (80,8) 5 (19,2)
Sexo		Toxicidad al tratamiento, cualquier grado	24 (92,3)
Masculino	13 (50)	Pirexia	9 (37,5)
Femenino	13 (50)	Astenia	9 (37,5)
ECOG		Diarrea	8 (33,3)
0-1	25 (96,2)	Nausea/Vómitos	8 (33,3)
2	1 (3,8)	Hiporexia	3 (12,5)
Antibióticos		Rash	2 (8,3)
30 días previos al tratamiento	3 (11,5)	Mialgias	1 (4,2)
Durante el tratamiento	13 (57,7)	Hiponatremia	1 (4,2)
Corticoides		Hipertransaminasemia	1 (4,2)
30 días previos al tratamiento	9 (34,6)	Uveítis	1 (4,2)
Durante el tratamiento	18 (69,2)	Neutropenia	1 (4,2)
Uso de inhibidor de la bomba de protones	11 (42,3)	Toxicidad grado ≥2	12 (46,2)
Polifarmacia (≥5 fármacos)	8 (30,8)	Toxicidad grado 3-4	6 (23,1)
Melanoma primario reseado	23 (88,5)	Pirexia	2 (33,3)
Tratamiento adyuvante		Astenia	1 (16,7)
Inmunoterapia	9 (34,6)	Hepatitis	1 (16,7)
Interferon	8 (88,9)	Neutropenia	1 (16,7)
	1 (11,1)	Hiponatremia	1 (16,7)
Estadio TNM (AJCC 8th ed)		Reducción de dosis	10 (38,5)
M1a	6 (23,1)	Interrupción del tratamiento por toxicidad	4 (15,4)
M1b	4 (15,4)		
M1c	7 (26,9)	<b>Respuesta al tratamiento</b>	
M1d	9 (34,6)	Respuesta RECIST v1.1	
		RC	6 (23,1)
<b>Variables analíticas</b>		RP	14 (53,8)
Recuento absoluto neutrófilos ≥7500/mL	5 (19,2)	EE	4 (15,4)
LDH ≥LSN	10 (38,5)	PE	2 (7,7)
NLR Severo ≥5	7 (26,9)	ORR (95% IC)	76.9 (56.4-91.0)
dNLR severo ≥3	8 (30,8)	Eventos	
PCR ≥LSN	15 (57,7)	Progresión	14 (53,8)
		Exitus	10 (38,5)
		<b>Supervivencia</b>	
		SLP, mediana (IC95%)	15.7 (6-25,4)
		SG, mediana (IC95%)	28,9 (19,1- 38,7)

## IV.II Características analíticas de la población de estudio

En cuanto a las variables analíticas, 5 pacientes (19,2%) presentaron un ANC  $\geq 7500/\text{mL}$ , 15 (57,7%) una PCR elevada y 10 (38,5%) una LDH  $\geq$ LSN al inicio de la terapia dirigida. Además, el 26.9% (n=7) de los pacientes evidenciaron un NLR elevado-severo  $\geq 5$ , mientras que el 30,8% (n=8) tenían un dNLR  $\geq 3$ .

## IV.III Variables relacionadas con el tratamiento

Al iniciar la terapia dirigida, el 88,5% (n=23) de los pacientes tenían un ECOG-PS 0-1. El 80,8% (n=21) iniciaron dabrafenib-trametinib como tratamiento iBRAF/MEK y los 5 restantes encorafenib-binimetinib. Resulta de importancia destacar que el 80% (n=4) de los pacientes que presentaron RC al tratamiento habían recibido con anterioridad inmunoterapia como tratamiento adyuvante. La mediana de tiempo desde el fin del tratamiento adyuvante hasta el inicio de la terapia dirigida fueron 1,87 meses (rango 0,7-31,3).

Se reportaron efectos adversos relacionados con el tratamiento en el 92.3% de los pacientes, con el 46.2% y el 23.1% experimentando eventos al menos grado 2 y grado 3-4, respectivamente. Los efectos adversos más frecuentes fueron astenia (34,6%; n=9), pirexia (34,6%; n=9), náuseas y vómitos (30,8%; n=8) y diarrea (30,8%; n=8). Los efectos adversos de al menos grado 2 más frecuentes fueron pirexia (n=4, 33,3%), astenia (n=2, 16,7%) y diarrea (n=2, 16,7%). Un total de 10 pacientes (38,4%) requirieron reducción de dosis, y 4 pacientes (15.4%) discontinuaron el tratamiento por toxicidad.

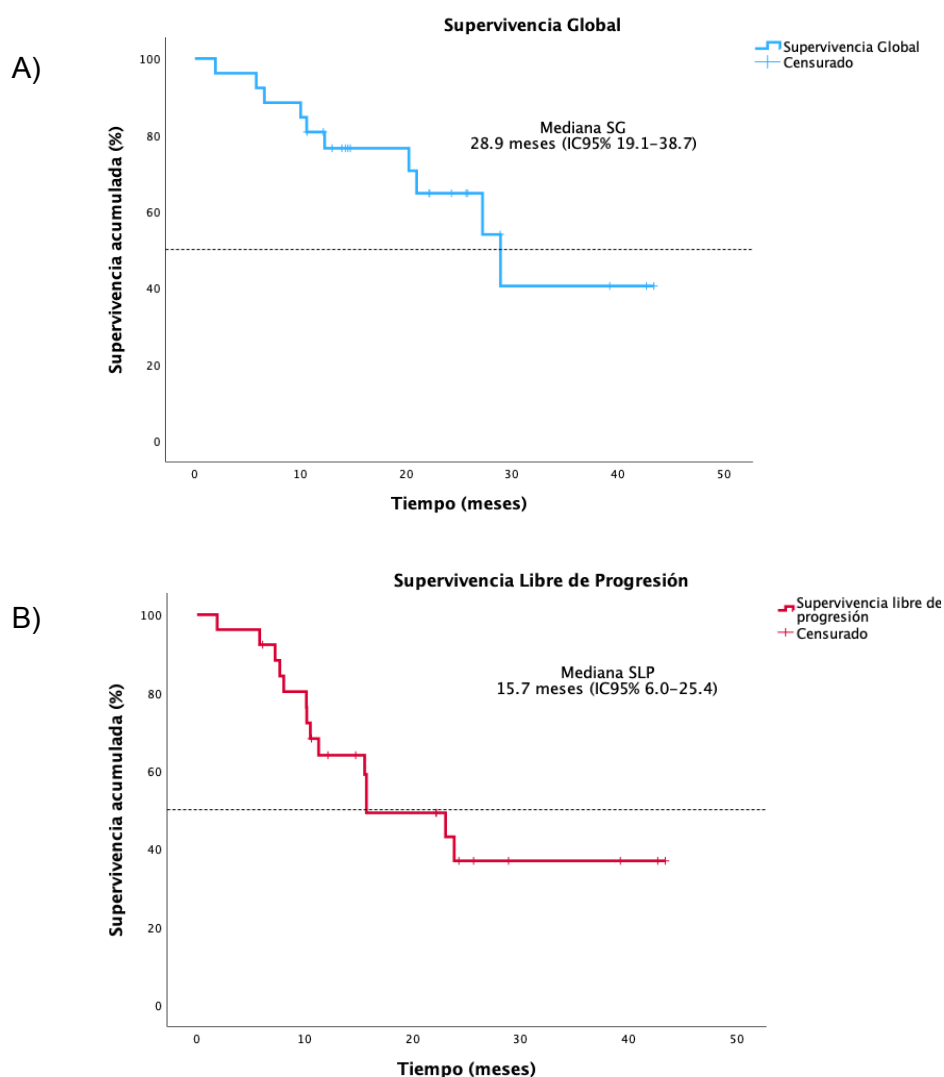
En el análisis por subgrupos estratificado en pacientes R (n=20) y NR (n=6), se observaron diferencias significativas en el *likelihood ratio test* en la presencia de

astenia, que se presentó en un 45% (n=9) de los R y en ningún paciente NR (*Anexo Tabla S1*).

La ORR en la primera evaluación por TC fue del 76,9% (IC95% 56.4-91.0), y la DCR de 92.3% (IC95% 74.9-99.1). El 50% (n=13) de los pacientes habían progresado al tratamiento dirigido al momento del análisis estadístico, el 34,6% (n=9) de los cuales desarrollaron metástasis en SNC. De los 13 pacientes que progresaron a la primera línea, sólo 7 (26,9%) fueron candidatos a continuar una segunda línea.

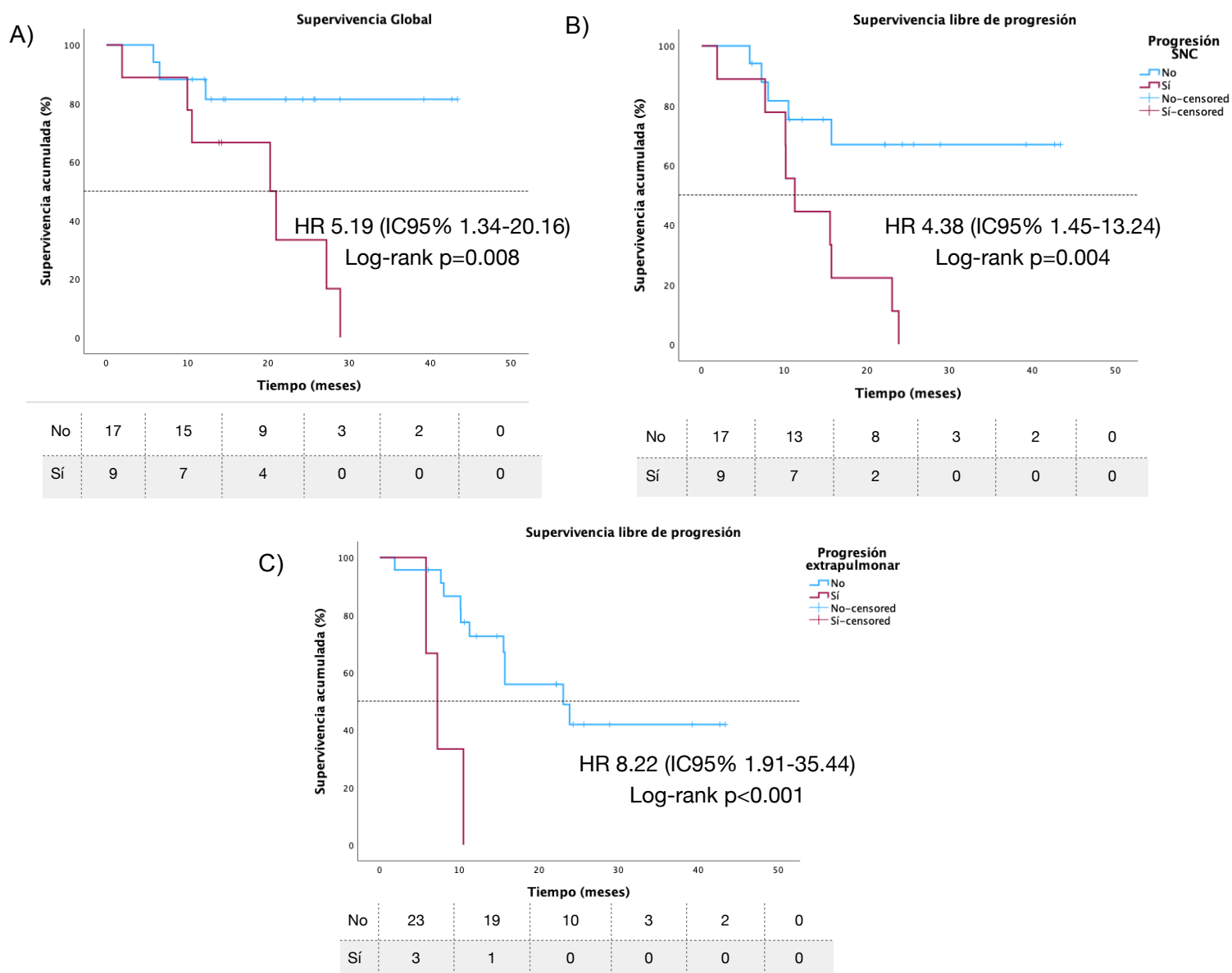
## IV.IV Análisis de supervivencia

Con una mediana de seguimiento de 24,3 meses (rango 13.7-34.8), la mediana de SG del total de la cohorte fue de 28,9 meses (IC 95% 19.1-38.7), mientras que la mediana de SLP fue de 15.7 meses (IC 95% 6-25.4) (Figura 10).



**Figura 10.** Kaplan-Meier de A) Supervivencia global del total de la cohorte, desde el inicio de la terapia dirigida hasta el fallecimiento o última visita; B) Supervivencia libre de progresión del total de la cohorte, desde el inicio del tratamiento dirigido hasta la progresión.

La progresión a nivel extrapulmonar o de SNC durante la terapia dirigida fueron factores que impactaron negativamente la SLP; la progresión en SNC impactó a su vez en la SG (*Figura 11*). Ninguna otra variable clínica ni analítica se asoció significativamente con un detrimento de la supervivencia.



**Figura 11.** Log-rank de SG según la presencia o no de progresión en SNC en A) SG, B) SLP, demostrando diferencias significativas e impactando negativamente en supervivencia con un HR de 5.19 (IC95% 1.34-20.16) y HR de 4.38 (IC95% 1.45-13.24), respectivamente. C) Log-rank de SLP según la presencia o no de progresión extrapulmonar, que confirma la asociación de progresión extrapulmonar con un detrimento en la supervivencia con un HR de 8.22 (IC95% 1.91-35.44).

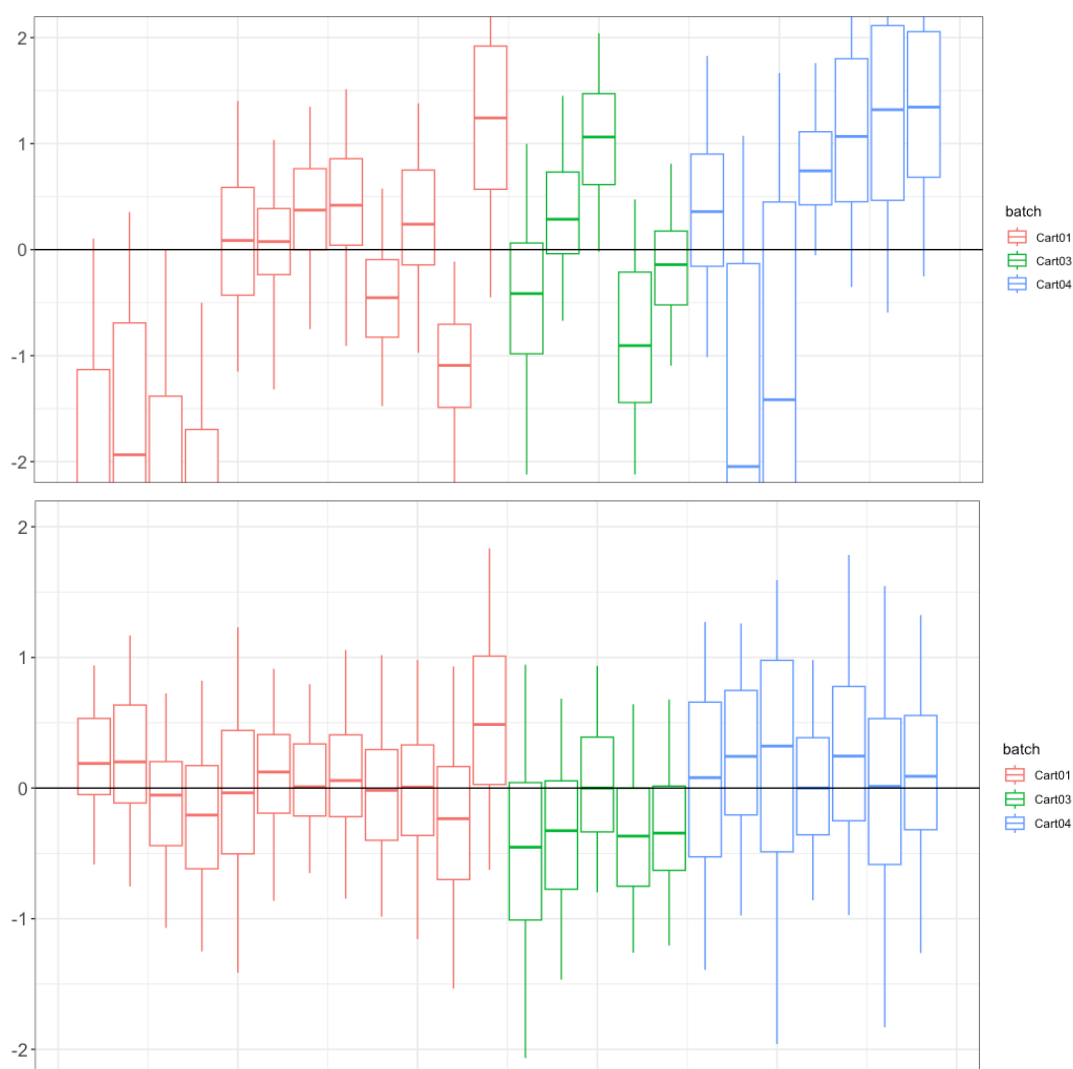
Se realizó un análisis univariante de regresión de Cox de las variables clínicas en la cohorte por intención de tratar (n=26), con el objetivo de identificar aquellas que pudieran impactar en supervivencia. Sin embargo, ninguno de los factores analizados se confirmó como un predictor independiente que impactara significativamente en la SG o la SLP (*Tabla 4*).

**Tabla 4.** Análisis univariante de variables clínicas impactando en SLP y SG, en población por intención de tratar (n=26). Ninguna variable demostró un impacto estadísticamente significativo en supervivencia.

Análisis Univariante (N=26)	Supervivencia Global			Supervivencia Libre de Progresión		
	Características clínicas	HR	CI 95%	P	HR	CI 95%
<b>Edad</b>	1.00	0.95-1.04	0.99	0.98	0.95-1.02	0.54
<b>Sexo masculino</b>	0.38	0.09-1.53	0.17	0.37	0.12-1.19	0.09
<b>ECOG PS 0 vs 1-2</b>	1.98	0.41-9.65	0.39	1.67	0.34-7.56	0.51
<b>Adyuvancia previa</b>	0.25	0.05-1.26	0.09	0.29	0.08-1.08	0.06
<b>Antibióticos 30 días previos</b>	3.08	0.59-15.95	0.18	1.65	0.35-7.79	0.53
<b>Antibióticos durante el tratamiento</b>	0.96	0.27-3.45	0.95	0.89	0.31-2.59	0.83
<b>Corticoides 30 días previos</b>	1.43	0.39-5.14	0.59	0.70	0.22-2.25	0.55
<b>Corticoides durante el tratamiento</b>	1.78	0.37-8.14	0.46	1.13	0.35-3.61	0.84
<b>Inhibidores de bomba de protones</b>	1.81	0.51-6.42	0.36	1.21	0.41-3.56	0.73
<b>Polifarmacia</b>	1.25	0.32-4.85	0.75	1.04	0.32-3.35	0.94
<b>Parámetros de laboratorio</b>						
<b>ANC <math>\geq</math>7500/mL</b>	1.50	0.38-5.85	0.56	0.59	0.13-2.63	0.48
<b>LDH<math>\geq</math>LSN</b>	1.64	0.47-5.69	0.44	1.44	0.50-4.18	0.49
<b>dNLR<math>\geq</math>3</b>	2.26	0.64-7.93	0.20	1.67	0.55-5.04	0.36
<b>NLR<math>\geq</math>5</b>	1.77	0.49-6.41	0.38	1.94	0.65-5.81	0.24
<b>PCR<math>\geq</math>LSN</b>	0.85	0.24-3.05	0.80	1.47	0.45-4.81	0.52
<b>Toxicidad al tratamiento</b>						
<b>Efectos adversos grado<math>\geq</math>2</b>	0.93	0.26-3.37	0.93	1.58	0.55-4.58	0.39
<b>Diarrea</b>	0.84	0.21-3.28	0.79	0.99	0.33-2.99	0.98
<b>Pirexia</b>	1.06	0.29-3.77	0.93	0.86	0.28-2.57	0.78
<b>Astenia</b>	1.06	0.29-3.78	0.93	0.87	0.29-2.61	0.81

## IV.V Análisis de expresión génica

Las muestras de 24 pacientes fueron utilizadas para el análisis de expresión génica (*Figura 12*). La población se estratificó en R y NR según los criterios mencionados previamente, con un total de 18 (75%) R y 6 (25%) NR en T0, y 18 R y 3 NR en T1, por 3 muestras en T1 que no pasaron los controles de calidad. La tabla de características generales comparando las cohortes R y NR se encuentra en el *Anexo Tabla S2*. Un segundo análisis fue realizado en la cohorte RC (n=5) y No-RC (n=19).

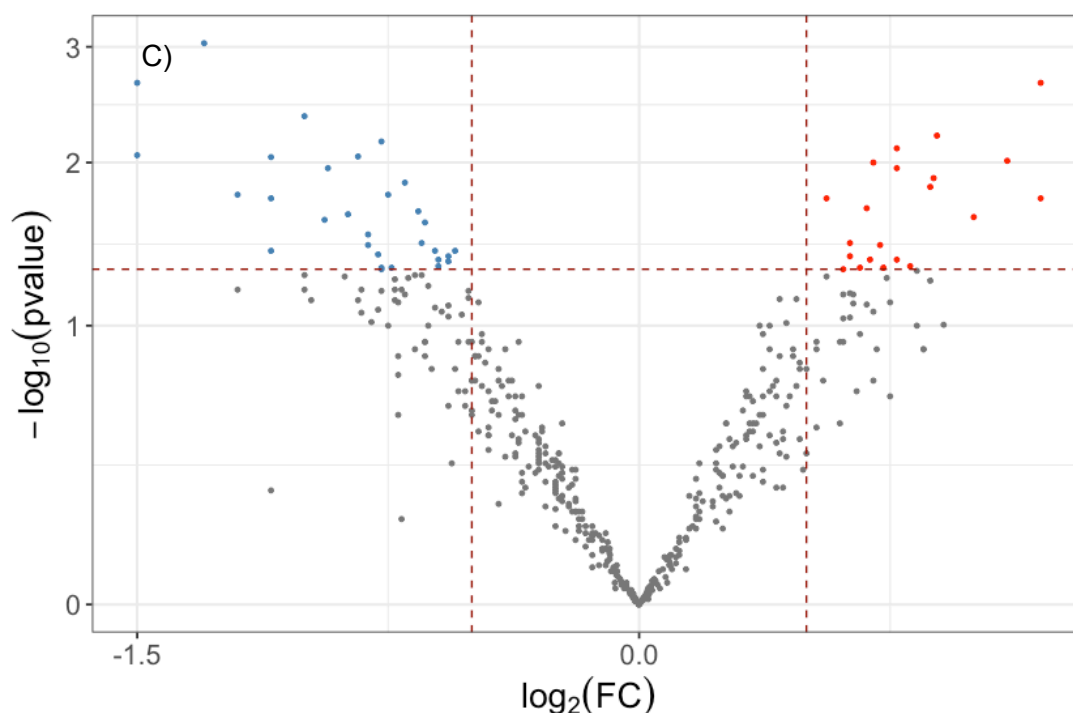


**Figura 12.** Variabilidad en la expresión génica de 24 pacientes incluidos en el estudio, previo (arriba ) y posterior (abajo) a la normalización con RUVg.

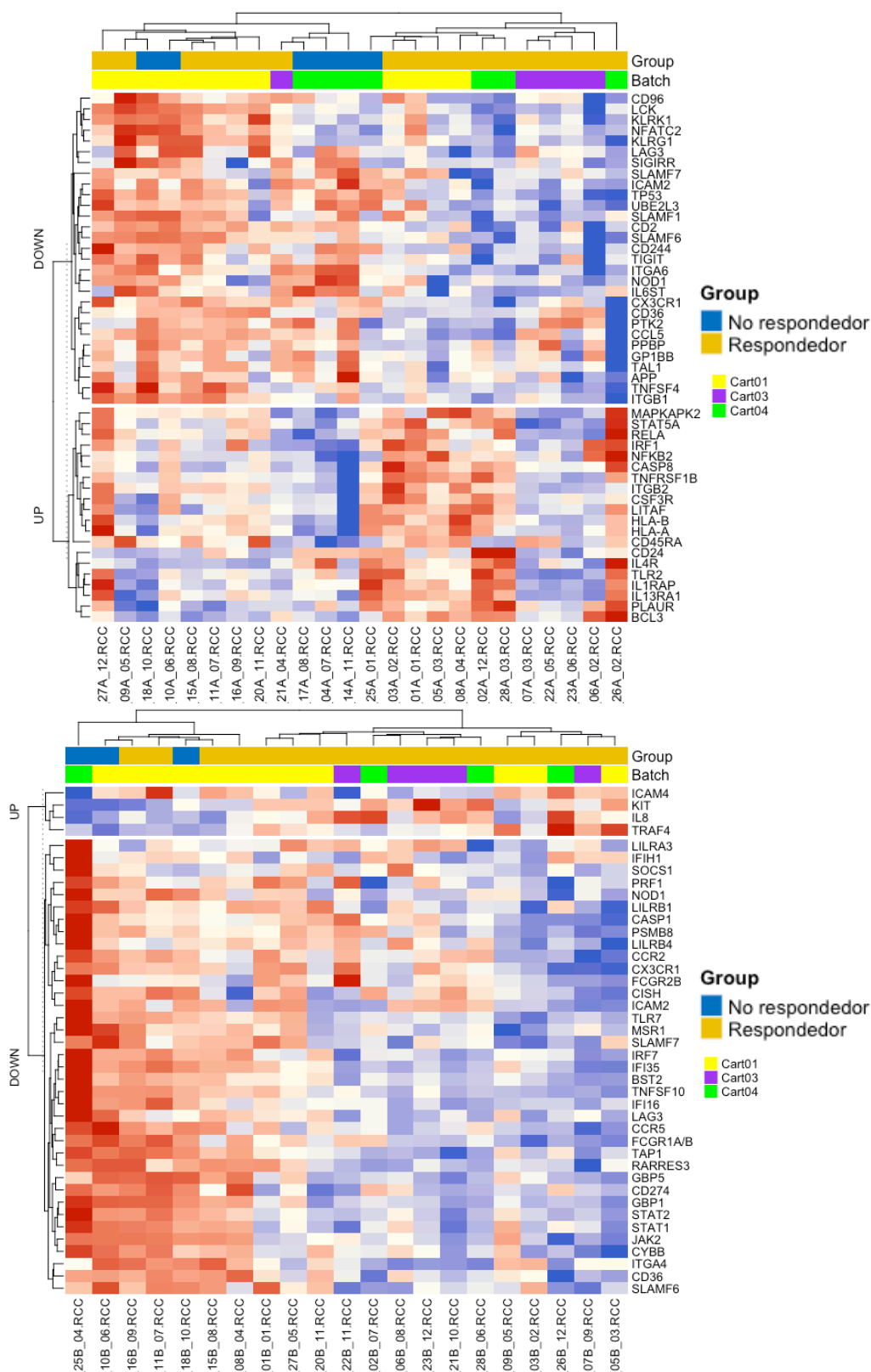
### IV.V.1 Estratificación según respuesta

Un total de 49 genes alcanzaron una  $p$  significativa a tiempo basal - T0 -, con 20 genes regulados al alza en R y a la baja en NR, y 29 genes regulados a la baja en R y al alza en NR (*Figura 13*).

En T1, un total de 41 genes alcanzaron la significancia estadística, 4 de los cuales estaban regulados al alza en R y a la baja en NR, y 37 regulados a la baja en R y al alza en NR (*Anexo Tabla S4*). Ninguno de los genes en T0 y T1 alcanzó la significancia con un valor ajustado de  $p$  (*Anexo Tabla S3*). La *Figura 14* muestra los heatmaps en T0 y T1 respectivamente, donde se observa que la agrupación en clústeres no se ajusta totalmente con la variable respuesta.

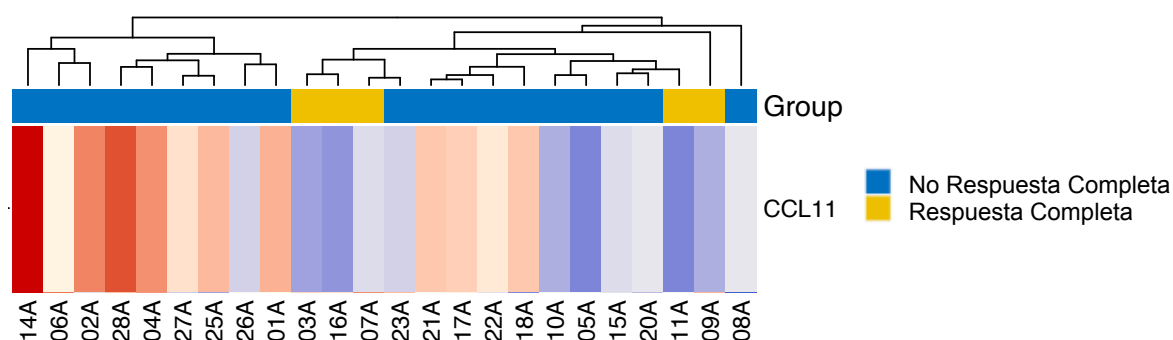


**Figura 13.** Volcano plot donde se muestran los genes regulados al alza (derecha, en rojo) y a la baja (izquierda, en azul) en pacientes respondedores en tiempo basal - T0.



**Figura 14.** Heatmap en tiempo basal - T0 - (arriba) y T1 (abajo), donde se observan los genes regulados al alza y a la baja, estratificado según respuesta. Los clústeres no se ajustan completamente a la variable respuesta.

El análisis de expresión diferencial en la cohorte RC y No-RC identificó a un único gen en tiempo basal, *CCL11*, significativamente regulado a la baja en pacientes con RC y al alza en No-RC (logfold change -0.63,  $p=0.038$ ,  $qvalue=1$ ) (Figura 15). No se identificaron diferencias significativas entre ambas cohortes en los genes evaluados en T1.



**Figura 15.** Heatmap donde se evidencia la expresión del gen *CCL11* en la cohorte estratificada en RC y No-RC, con un incremento en la expresión en pacientes No-RC y una disminución en pacientes con RC.

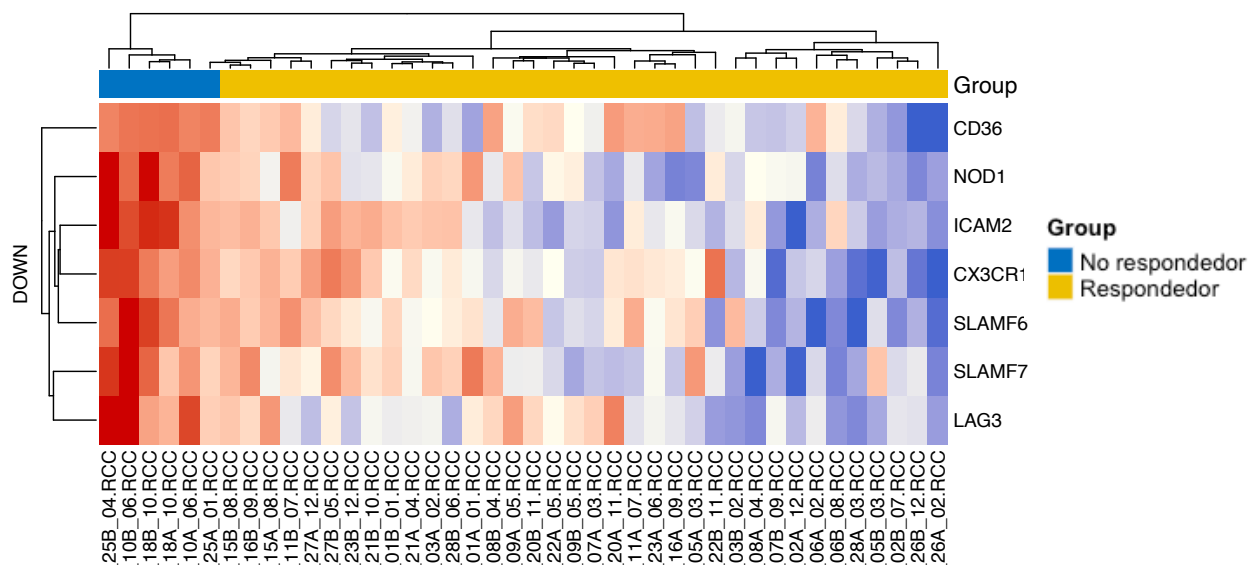
#### IV.V.2 Estratificación según tiempo - T0 vs T1

Al realizar el análisis de expresión diferencial longitudinal de los 49 genes significativos a tiempo basal T0 en las cohortes R y NR, solo 39 fueron analizados dado que los 10 genes restantes no alcanzaron los estándares de calidad, principalmente debido a que no alcanzaron el número de reads (lecturas) por muestra.

Tras realizar la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, no se observaron diferencias significativas en la expresión diferencial longitudinal desde T0 a T1 entre ambos subgrupos, R y NR. No obstante, se evidenciaron 7 genes que se mantuvieron regulados a la baja en los R y al alza en los NR tanto en T0 como en T1: *LAG3*, *CD36*, *SLAMF7*, *NOD1*, *SLAMF6*, *CX3CR1*, e *ICAM2* (Figura 16 y Anexo Tabla S5). El análisis en la cohorte RC y No-RC no evidenció resultados significativos en la expresión diferencial longitudinal.

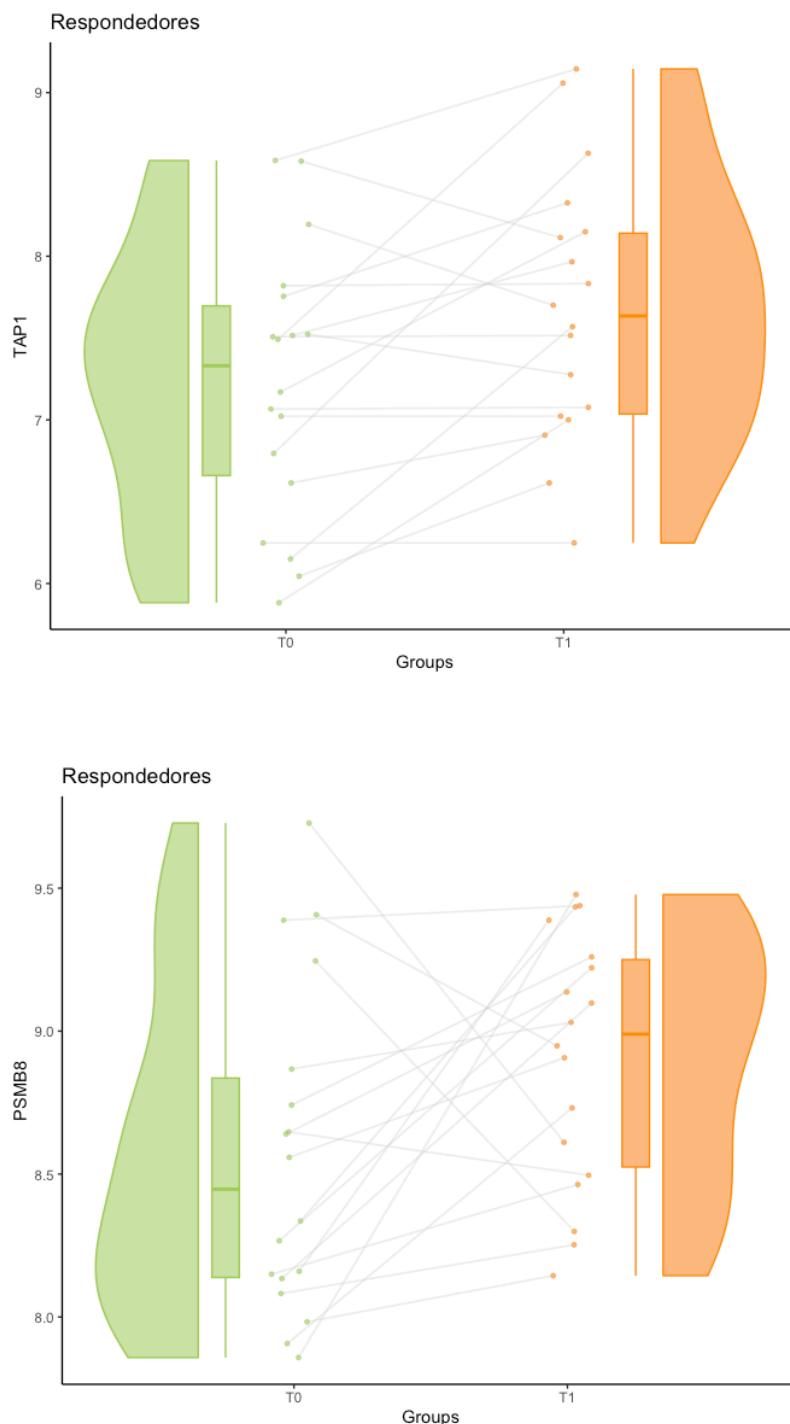
Se correlacionó la administración previa de inmunoterapia adyuvante con la presencia de esta firma génica. Se observó que, de los 8 pacientes que habían recibido inmunoterapia, 6 correspondían a la categoría de R, de los cuales 4 exhibieron una regulación a la baja de los 7 genes mencionados. Se realizó una regresión logística binaria correlacionando la variable respuesta (R versus NR) con los niveles de estos genes en la cohorte de inmunoterapia adyuvante (n=8). No se obtuvieron resultados significativos que sugirieran una asociación entre la respuesta y los niveles génicos en este grupo, probablemente debido al tamaño limitado de la muestra. Asimismo, al analizar los niveles de estos genes en los R, según la administración previa de inmunoterapia, tampoco se observaron resultados significativos que indicaran que el uso de inmunoterapia es un factor determinante

en los niveles de estos genes. Estudios con una cohorte ampliada podrían dilucidar si la inmunoterapia tiene un rol directo en la regulación de esta firma génica.



**Figura 16.** Heatmap de los 7 genes que se mantienen regulados a la baja en respondedores tanto en T0 como en T1, y al alza en no respondedores.

Al observar los 41 genes que alcanzaron significación estadística en T1, hubo 2 genes, *TAP1* y *PSMB8*, que exhibieron un incremento en su expresión en los R desde T0 a T1 (*Figura 17 y Anexo Tabla S6*).



**Figura 17.** Incremento significativo de los niveles de *TAP1* (superior) y *PSMB8* (inferior) en pacientes respondedores, de T0 a T1.

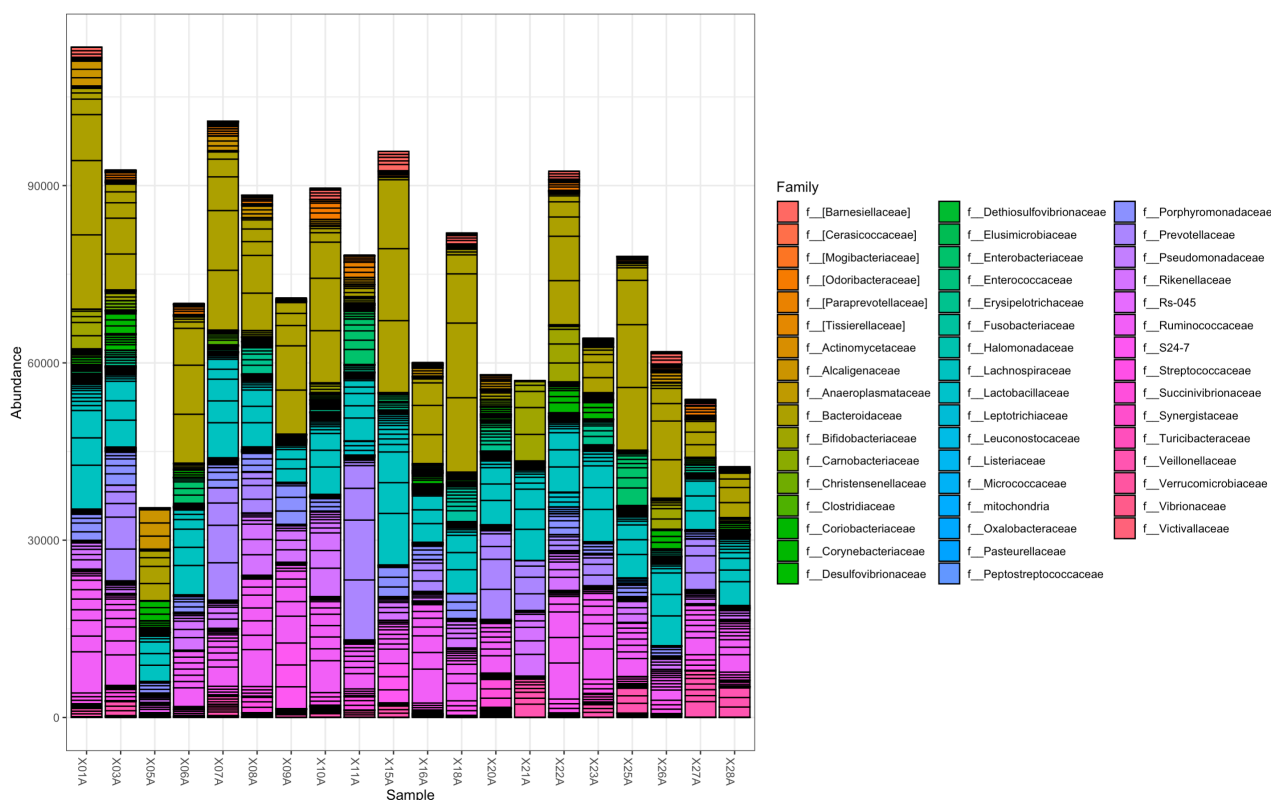
## IV.VI Análisis de microbiota

Para el análisis de la microbiota en respuesta a la terapia dirigida se incluyeron muestras de 20 pacientes. En principio, se clasificaron a un total de 17 pacientes (85%) como R, y 3 (15%) como NR. Dado que el grupo de pacientes NR presentaba un gran desbalance en comparación con los R para llevar a cabo el análisis LEfSe, y con el objetivo de determinar la microbiota asociada a la mejor respuesta posible con los iBRAF/MEK, se subdividió finalmente a la cohorte en pacientes con respuesta completa (RC)(n=5) versus aquellos sin respuesta completa (No-RC) (n=15). De esta manera, la identificación de microorganismos es aún más precisa dado que la muestra se limita a la microbiota asociada a la respuesta, al incluir exclusivamente pacientes con RC. Además, se considera la respuesta asociada a mayor supervivencia. Esto permite un análisis más específico para identificar posibles biomarcadores pronóstico y predictivos que permitan diseñar estrategias terapéuticas personalizadas, orientadas a potenciar la respuesta al tratamiento. La tabla de características generales comparando las cohortes RC y No-RC se encuentra en el *Anexo Tabla S7*.

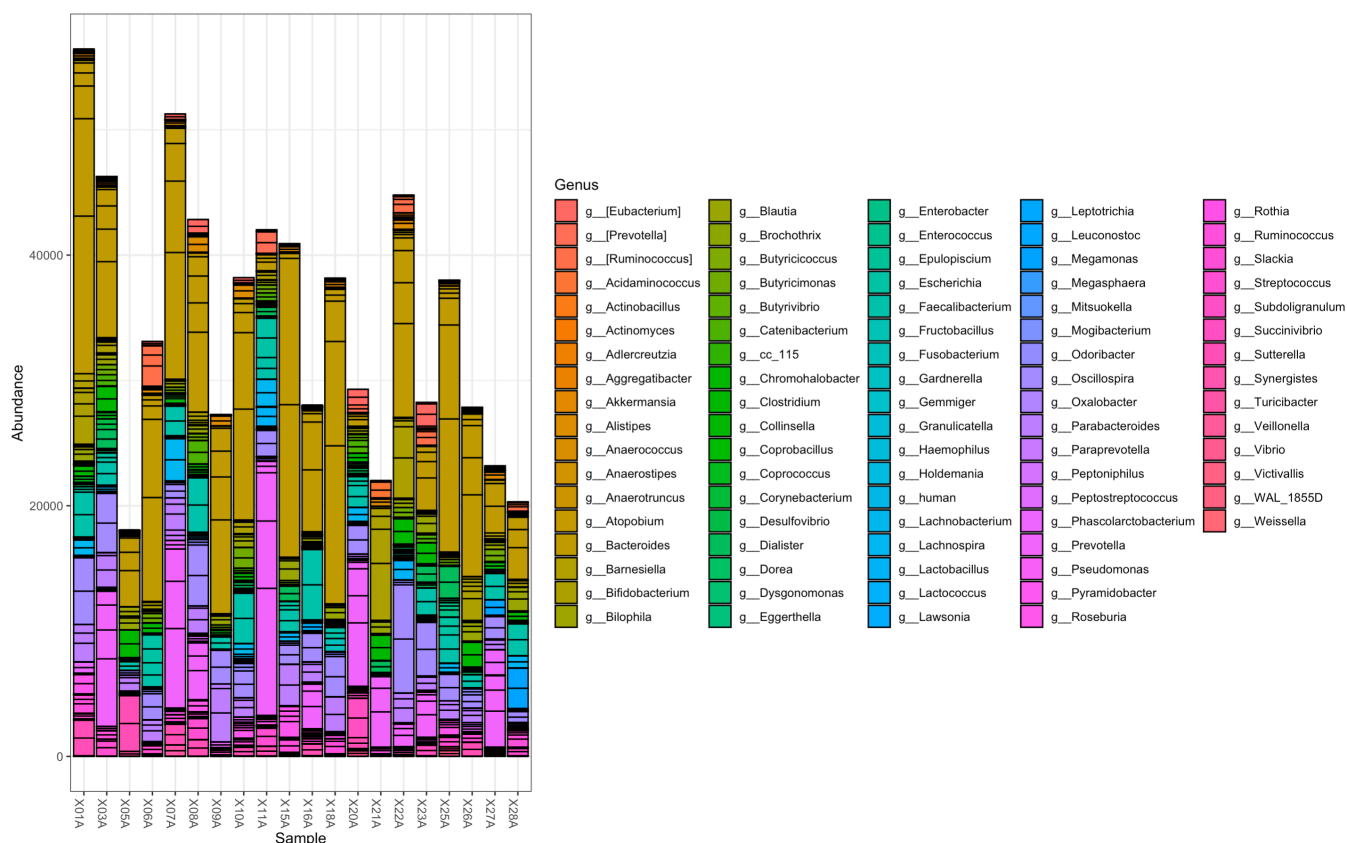
Resulta de importancia destacar que entre los pacientes que alcanzaron una RC (n=5), ninguno era consumidor habitual de polifarmacia. No obstante, uno de los pacientes estaba en tratamiento con inhibidores de la bomba de protones, 2 recibían antibioterapia, y uno corticoides al inicio del tratamiento dirigido. Por el contrario, entre los pacientes No-RC, 9 (60%) consumían inhibidores de la bomba de protones, 6 (40%) polifarmacia, 4 (26,7%) estaban bajo tratamiento con corticoides, y 1 (6,7%) recibía antibioterapia. Además, los pacientes No-RC presentaban un estadio más avanzado de la enfermedad (M1c-d), con mayor frecuencia de metástasis hepáticas y del SNC en comparación con los pacientes con RC. En

cuanto a la edad, las cohortes estaban equilibradas, con una mediana de edad de 55 años.

Se analizó la composición de la microbiota en cada subgrupo a nivel basal y en T1, y luego se compararon las diferencias entre los tiempos T0 y T1. El objetivo era comprender la influencia de la microbiota basal en la respuesta al tratamiento, y evaluar el impacto de la terapia dirigida en su composición. Se analizaron los niveles taxonómicos familia, género y especie, pero se presentarán los datos de familia y género dado que el método utilizado para la microbiota, basado en el análisis de 16S ARNr, tiene una limitada resolución a nivel de especie. Por lo tanto, para garantizar la validez y precisión de los resultados, los análisis se enfocaron en niveles taxonómicos superiores (*Figuras 18 y 19*).



**Figura 18.** Abundancia de microorganismos en cada muestra a nivel taxonómico familia, en tiempo basal.

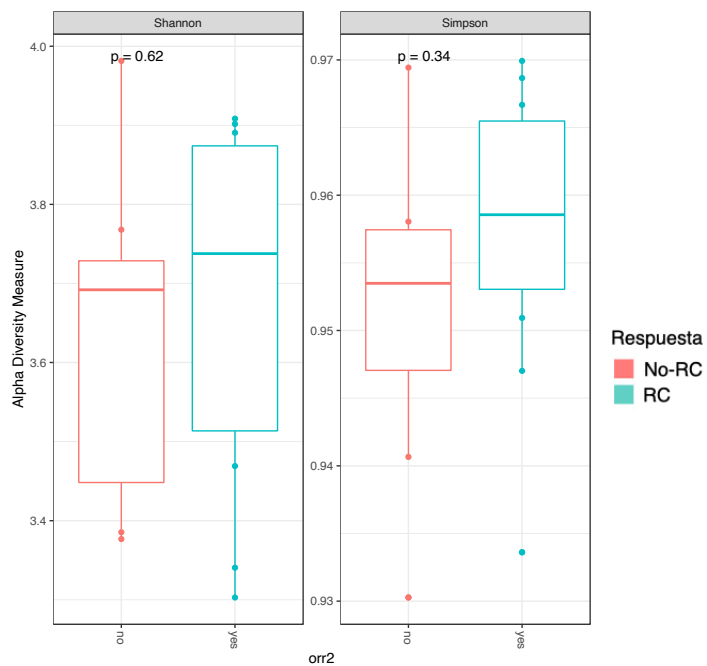
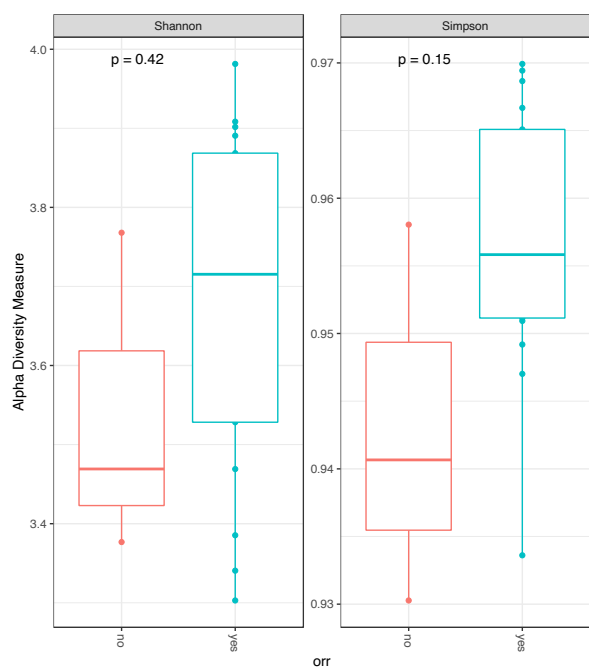


**Figura 19.** Abundancia de microorganismos en cada muestra a nivel taxonómico **género**, en tiempo basal.

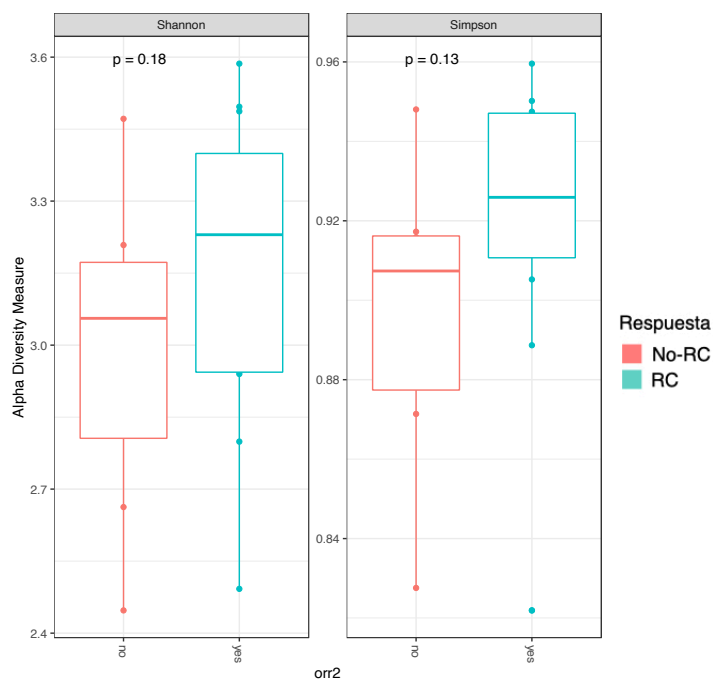
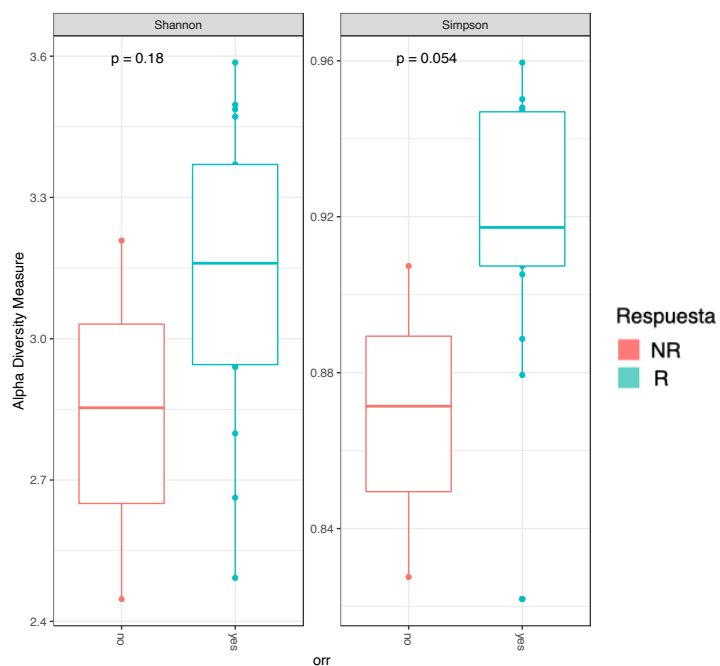
## IV.VI.1 Estratificación según respuesta

### IV.VI.1.a Alfa diversidad

El índice Shannon estima la diversidad de microbios en una comunidad, teniendo en cuenta tanto la riqueza como su abundancia relativa. El test de Simpson también evalúa la diversidad, pero se focaliza en la dominancia de microorganismos en la muestra. Tras aplicar el test U de Mann-Whitney, se observa un valor de  $p$  no significativo a nivel de familia y de género tanto en NR como en R, así también como en la cohorte con RC y No-RC (*Figuras 20 y 21*).



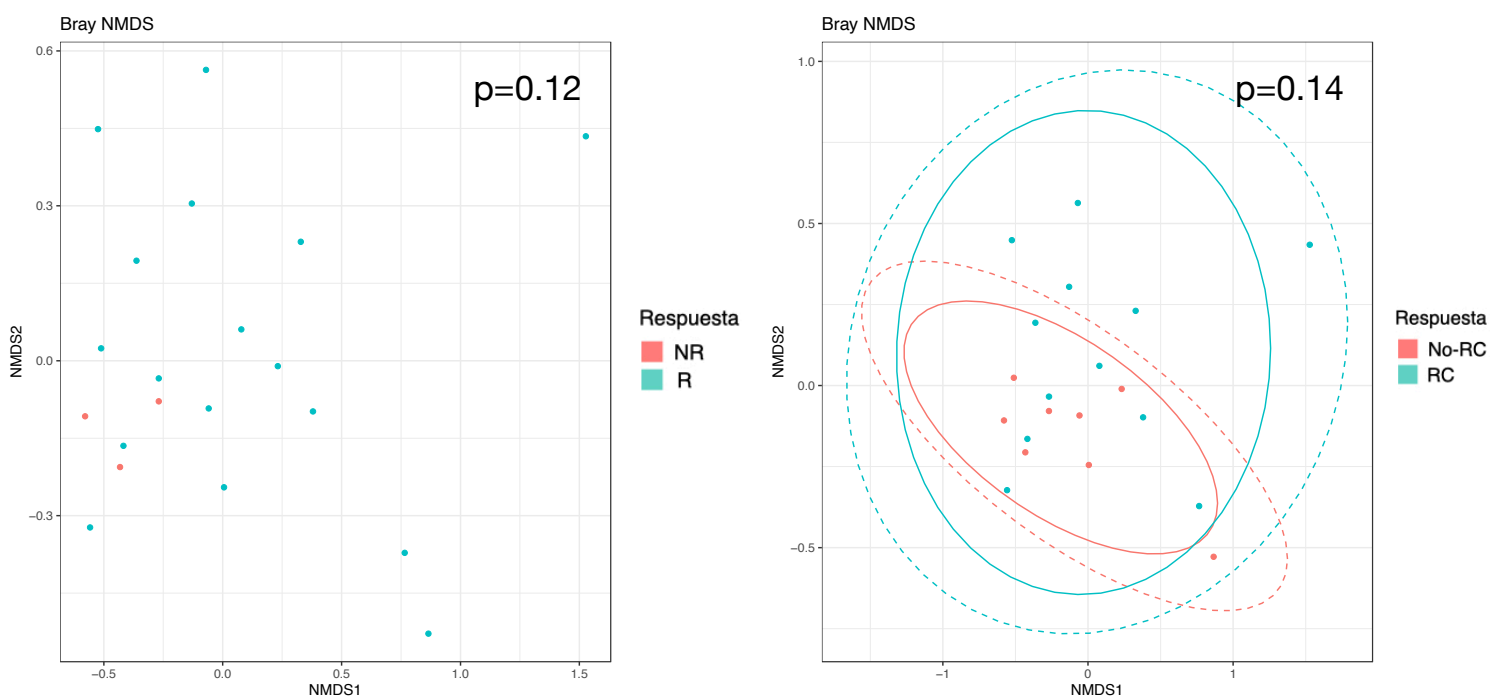
**Figura 20.** Diversidad alfa en nivel taxonómico **familia**, en pacientes R y NR (izquierda), y en pacientes con RC y No-RC (derecha).



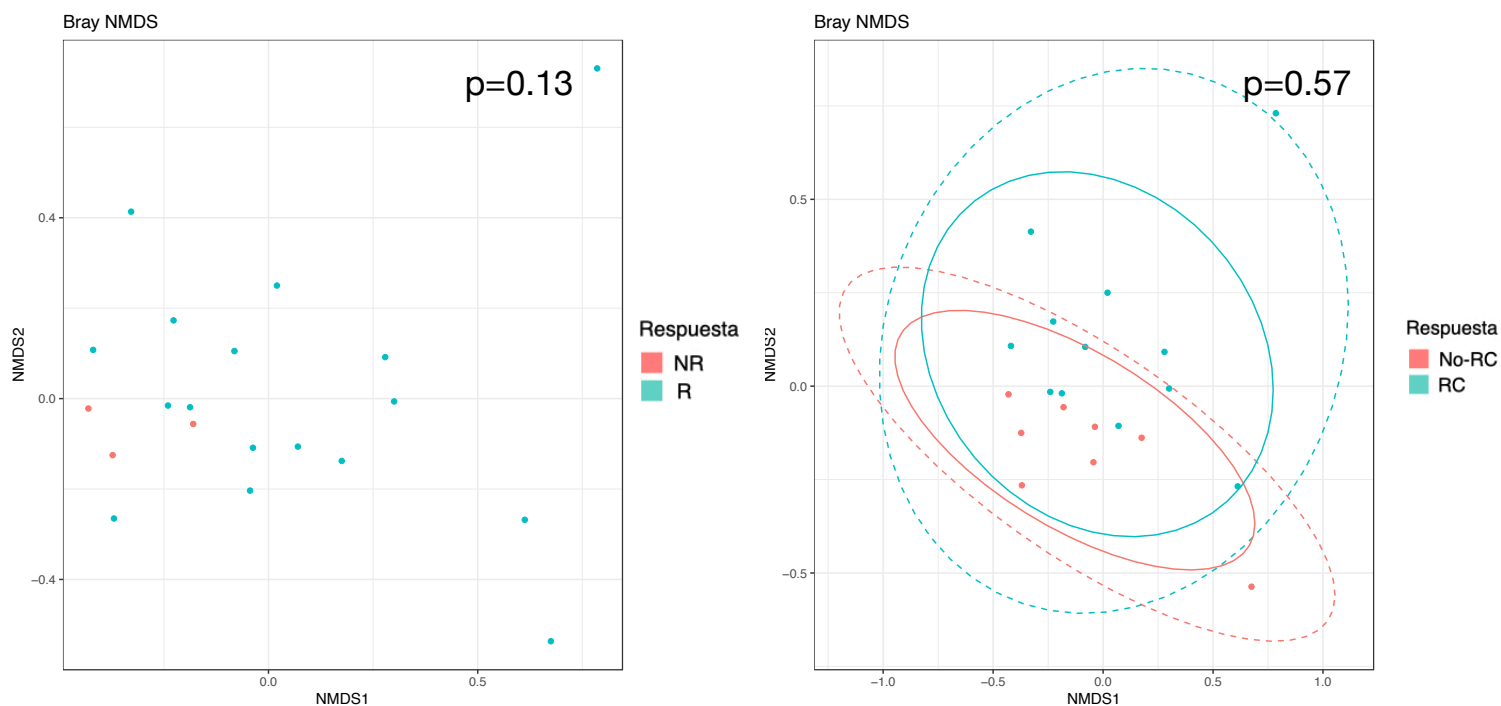
**Figura 21.** Diversidad alfa en nivel taxonómico **género**, en pacientes R y NR (izquierda), y en pacientes con RC y No-RC (derecha).

### IV.VI.1.b Beta diversidad

Para el análisis de beta diversidad, se realizó el análisis NMDS basado en Bray-Curtis, para identificar las poblaciones microbianas en función de la respuesta. Esto dio como resultado un valor de  $p$  no significativo tanto a nivel de familia como de género en NR versus R, y en No-RC versus RC (Figuras 22 y 23).



**Figura 22.** Diversidad beta en nivel taxonómico **familia**, en pacientes R versus NR (izquierda), y en pacientes con RC versus No-RC (derecha).



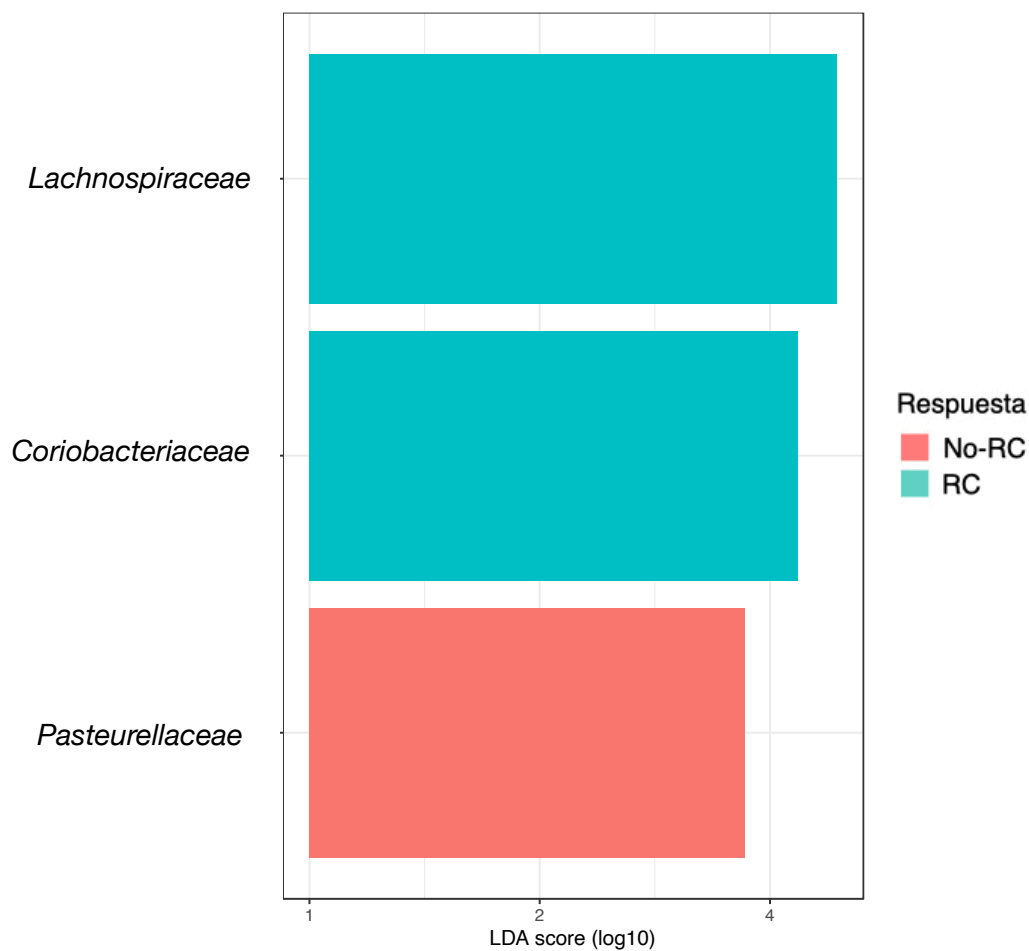
**Figura 23.** Diversidad beta en nivel taxonómico **género**, en pacientes R versus NR (izquierda), y en pacientes con RC versus No-RC (derecha).

#### IV.VI.1.c Microorganismos con diferencias significativas entre cohortes

Se realizó un análisis LEfSe a tiempo basal (T0) para identificar las diferencias estadísticamente significativas en la abundancia de microorganismos de los pacientes con RC en comparación con aquellos No-RC.

#### IV.VI.1.c.i Familia

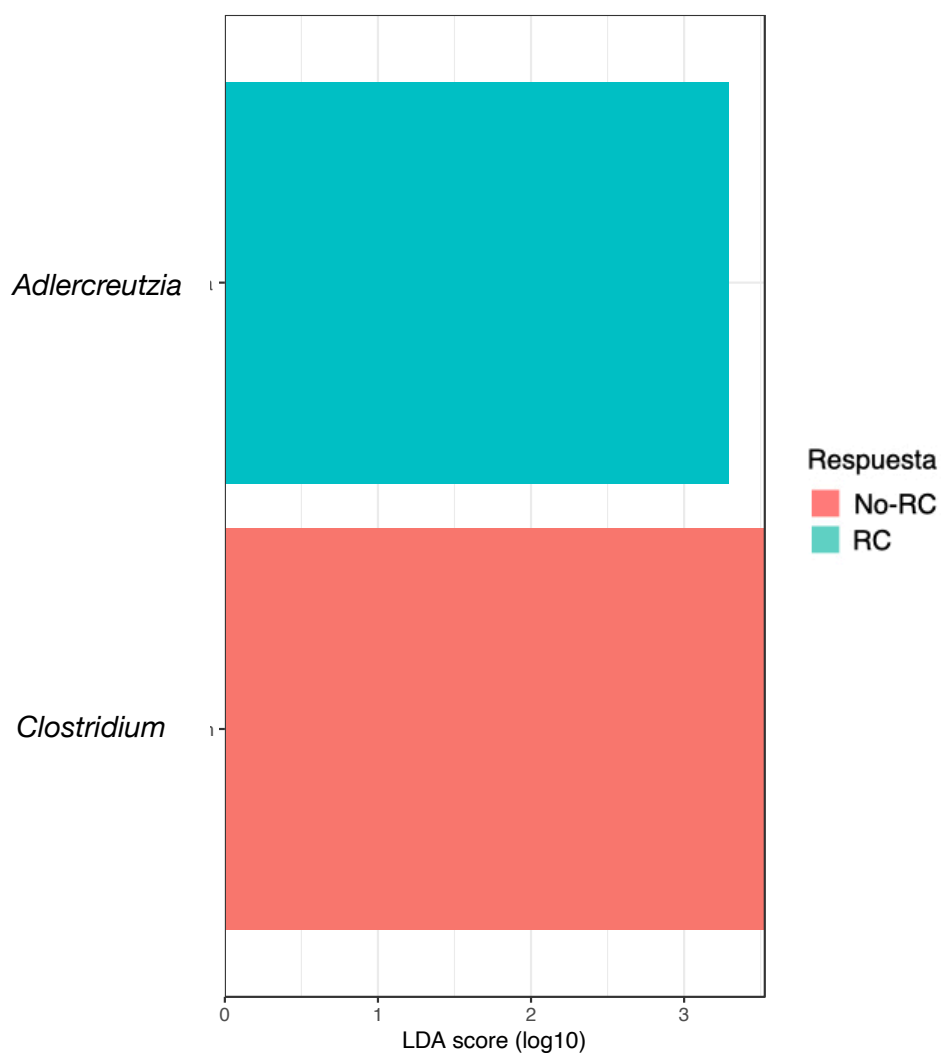
En la población con RC, se observó una abundancia de las familias *Lachnospiraceae* (filo Firmicutes) y *Coriobacteriaceae* (filo Actinobacteria), mientras que en los No-RC predominó la familia *Pasteurellaceae* (filo Proteobacteria) (Figura 24).



**Figura 24.** Análisis LEfSe en nivel taxonómico **familia**, con diferencias significativas en la abundancia de microorganismos en pacientes con RC (verde) versus No-RC (rojo).

#### IV.VI.1.c.ii Género

En el análisis LEfSe a nivel taxonómico de género, se observaron diferencias significativas con un predominio de *Adlercreutzia* (filo Actinobacteria, familia *Eggerthellaceae*) en pacientes con RC, en comparación con los No-RC donde hubo una mayor abundancia de *Clostridium* (filo Firmicutes, familia *Clostridiaceae*) (Figura 25).



**Figura 25.** Análisis LEfSe en nivel taxonómico **género**, con diferencias significativas en la abundancia de microorganismos en pacientes con RC (verde) versus No-RC (rojo).

### **IV.VI.2 Estratificación según tiempo**

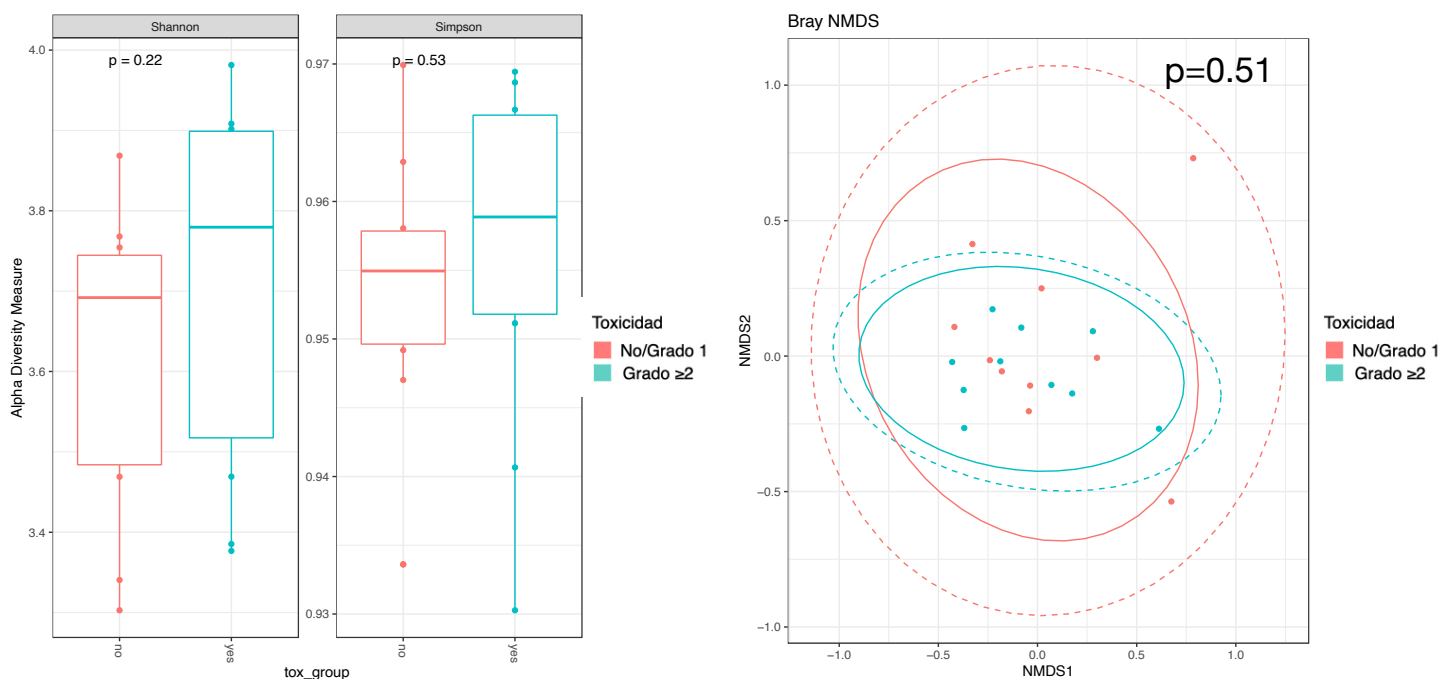
Se analizaron las diferencias entre los tiempos basal (T0) y a los tres meses o a la progresión, lo que ocurriese primero (T1). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en alfa o beta diversidad, ni en abundancia según el análisis LEfSe.

### **IV.VI.3 Estratificación según presencia de efectos adversos**

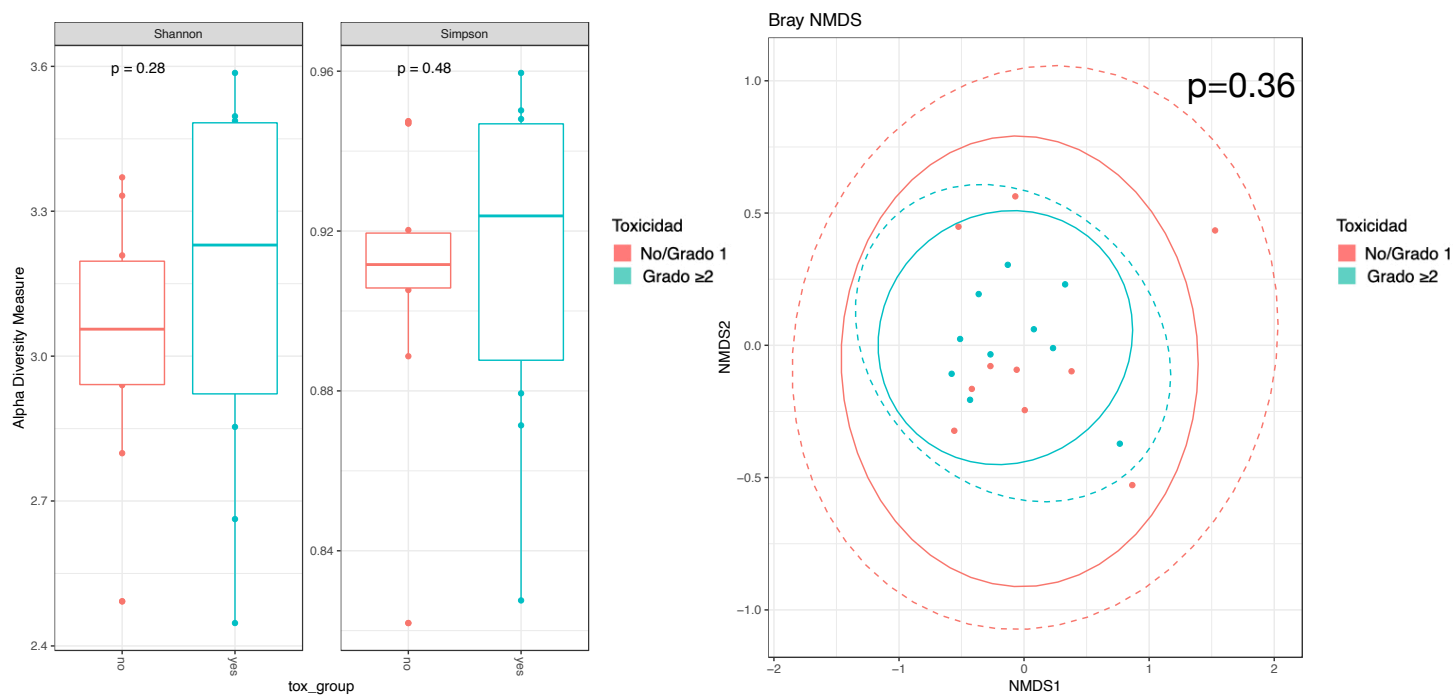
Se replicó el análisis de diversidad alfa, beta y LEfSe, estratificando a la cohorte en aquellos que presentaron toxicidad a la terapia dirigida moderada-severa, es decir de al menos grado 2 (n=10, 50%) versus aquellos que no tuvieron ningún efecto adverso o solo experimentaron un grado 1 (n=10, 50%). En la cohorte que experimentó toxicidad moderada-severa, el 80% (n=8) eran respondedores.

#### **IV.VI.3.a Alfa y beta diversidad**

Al realizar el análisis de alfa y beta diversidad según la presencia de toxicidad, no se observaron diferencias significativas entre ambas cohortes, ni a nivel taxonómico familia ni en género (*Figuras 26 y 27*).



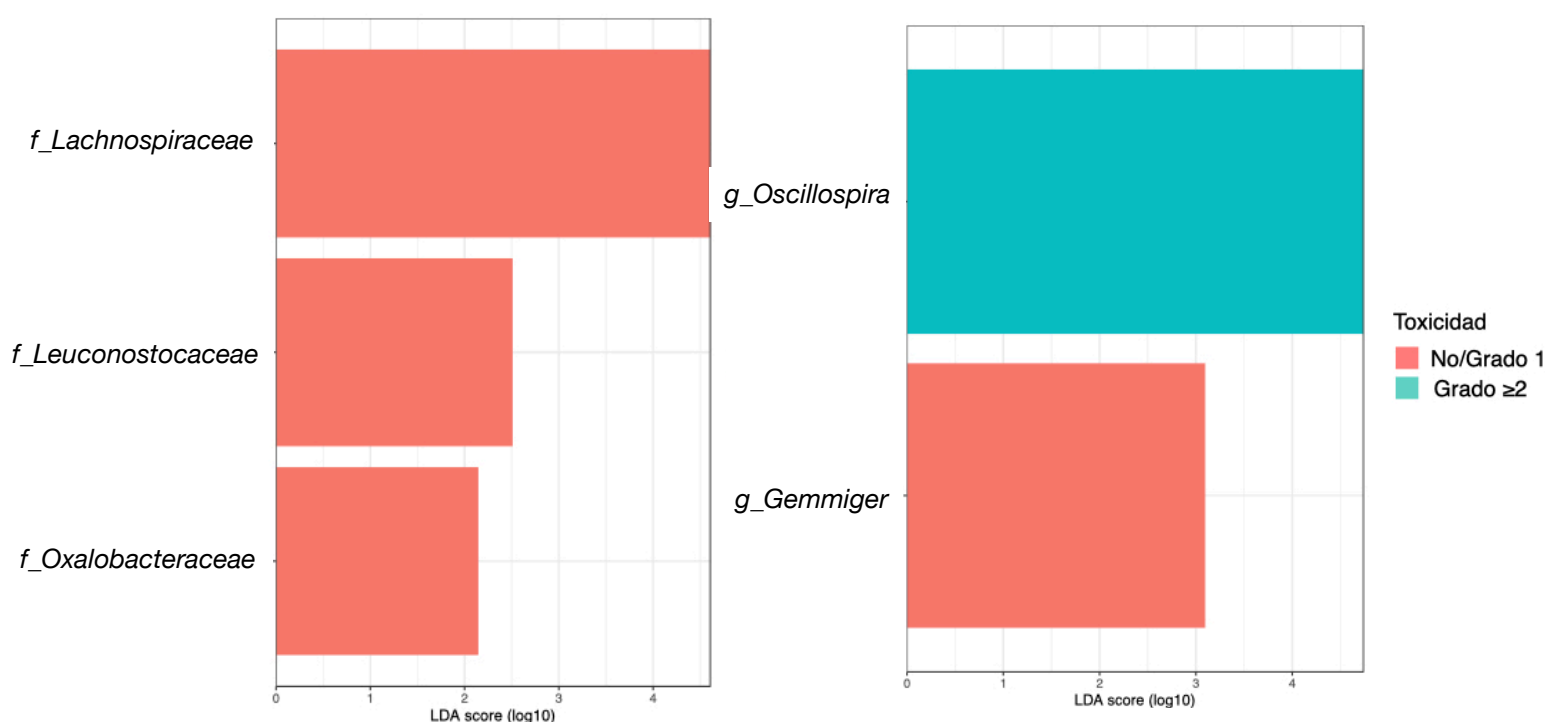
**Figura 26.** Diversidad alfa (izquierda) y beta (derecha) en nivel taxonómico **familia**, en pacientes con toxicidad de al menos grado 2, en comparación con aquellos sin toxicidad o con toxicidad grado 1.



**Figura 27.** Diversidad alfa (izquierda) y beta (derecha) en nivel taxonómico **género**, en pacientes con toxicidad de al menos grado 2, en comparación con aquellos sin toxicidad o con toxicidad grado 1.

#### IV.VI.3.b LEfSe

El análisis LEfSe identificó un enriquecimiento de las familias *Lachnospiraceae* y *Leuconostocaceae* (filo Firmicutes), familia *Oxalobacteraceae* (filo Proteobacteria), y del género *Gemmiger* (filo Firmicutes, familia *Oscillospiraceae*) en los pacientes que no presentaron toxicidad o que tuvieron toxicidad de grado 1. Por el contrario, la cohorte con toxicidad de al menos grado 2 tuvo una mayor abundancia del género *Oscillospira* (filo Firmicutes, familia *Oscillospiraceae*) (Figura 28).



**Figura 28.** Análisis LEfSe en nivel taxonómico **familia** (izquierda) y **género** (derecha), estratificando a la cohorte entre aquellos que no presentaron toxicidad/grado 1 (rojo) versus aquellos que presentaron toxicidad de al menos grado 2 (verde).

Dado que la astenia, como efecto adverso relacionado al tratamiento, se presentó en su mayoría en pacientes R, se realizó una regresión logística para correlacionar la presencia de este evento con los niveles de *Oscillospira*. El objetivo era determinar si la abundancia de este microorganismo tenía algún impacto en la presencia de astenia en pacientes R. Los resultados no fueron significativos (OR 1.00, IC95% 1.00-1.002,  $p=0.12$ ).

#### **IV.VII Correlación de genes de reactivación inmune y microbiota con supervivencia.**

Se realizó un análisis univariante de regresión de Cox en la cohorte de expresión génica (n=24) para determinar si los genes de reactivación inmune identificados como significativos a tiempo basal impactan en supervivencia (*Tabla 5*). Se observó un impacto significativo en la SLP de los genes *SLAMF7* (HR 0.51, IC95% 0.28-0.95), *UBE2L3* (HR 0.34, IC95% 0.12-0.93) e *ITGB2* (HR 0.43, IC95% 0.19-0.96). La sobreexpresión de *SLAMF7* también se asoció a una mayor SG, con un HR de 0.49 (IC95% 0.25-0.98).

En el análisis de expresión génica a tiempo basal, tanto *SLAMF7* como *UBE2L3* estaban regulados a la baja en R, mientras que *ITGB2* se encontró sobreexpresado.

**Tabla 5.** Análisis univariante en los genes identificados como significativos en los análisis de expresión génica en tiempo basal. *SLAMF7*, *UBE2L3* e *ITGB2* se asociaron a una mayor supervivencia libre de progresión, y *SLAMF7* también a mayor supervivencia global.

Análisis Univariante (N=24)	Supervivencia Global			Supervivencia Libre de Progresión		
	GENES	HR	CI 95%	P	HR	CI 95%
<i>RELA</i>	0.68	0.25-1.88	0.46	0.64	0.26-1.57	0.33
<i>MAPKAPK2</i>	1.63	0.69-3.84	0.26	1.33	0.64-2.75	0.44
<i>IL4R</i>	0.75	0.31-1.86	0.54	0.78	0.34-1.75	0.55
<i>CD45RA</i>	0.91	0.49-1.75	0.79	0.93	0.54-1.62	0.81
<i>LITAF</i>	1.05	0.39-2.81	0.92	0.92	0.41-2.05	0.85
<i>NFKB2</i>	0.76	0.38-1.51	0.44	0.92	0.48-1.74	0.80
<i>HLA-A</i>	0.91	0.19-4.19	0.90	0.33	0.09-1.19	0.09
<i>STAT5A</i>	1.18	0.33-4.17	0.79	0.96	0.32-2.86	0.95
<i>BCL3</i>	0.84	0.37-1.89	0.68	0.97	0.49-1.93	0.94
<i>CD24</i>	1.34	0.88-2.05	0.17	1.01	0.66-1.53	0.97
<i>TNFRSF1B</i>	0.59	0.22-1.60	0.30	0.49	0.19-1.23	0.13
<i>CASP8</i>	0.33	0.08-1.36	0.12	0.41	0.12-1.40	0.15
<i>IRF1</i>	0.66	0.27-1.61	0.36	0.71	0.32-1.57	0.39
<i>ITGB2</i>	0.61	0.25-1.49	0.28	<b>0.43</b>	<b>0.19-0.96</b>	<b>0.039</b>
<i>IL1RAP</i>	1.37	0.54-3.46	0.51	0.75	0.33-1.70	0.50
<i>HLA-B</i>	0.95	0.18-5.05	0.95	0.27	0.06-1.23	0.09
<i>TLR2</i>	1.21	0.56-2.58	0.63	0.81	0.42-1.57	0.54
<i>PLAUR</i>	0.90	0.36-2.25	0.83	0.76	0.37-1.56	0.45
<i>IL13RA1</i>	1.21	0.55-2.67	0.63	0.90	0.48-1.67	0.74
<i>CSF3R</i>	0.59	0.28-1.21	0.15	0.57	0.30-1.07	0.08
<i>LAG3</i>	0.41	0.15-1.13	0.08	0.54	0.24-1.18	0.12
<i>ITGA6</i>	0.95	0.44-2.08	0.91	0.88	0.45-1.72	0.71
<i>TP53</i>	1.02	0.39-2.66	0.96	0.67	0.29-1.52	0.34
<i>KLRK1</i>	0.73	0.41-1.28	0.27	0.79	0.49-1.28	0.35
<i>TAL1</i>	2.38	0.63-9.07	0.20	1.13	0.47-2.71	0.77
<i>CD36</i>	2.09	0.83-5.25	0.12	1.35	0.64-2.85	0.42
<i>NFATC2</i>	0.65	0.27-1.53	0.32	0.92	0.47-1.80	0.81
<i>TIGIT</i>	0.64	0.33-1.24	0.18	0.79	0.44-1.43	0.45
<i>LCK</i>	0.79	0.46-1.37	0.42	0.88	0.55-1.39	0.59
<i>SLAMF7</i>	<b>0.49</b>	<b>0.25-0.98</b>	<b>0.044</b>	<b>0.51</b>	<b>0.28-0.95</b>	<b>0.033</b>
<i>PTK2</i>	1.35	0.33	5.58	4.16	0.94-18.48	0.06
<i>NOD1</i>	0.52	0.18-1.53	0.23	0.61	0.25-1.48	0.27
<i>UBE2L3</i>	0.66	0.22-2.06	0.48	<b>0.34</b>	<b>0.12-0.93</b>	<b>0.036</b>

Análisis Univariante (N=24)	Supervivencia Global			Supervivencia Libre de Progresión		
	HR	CI 95%	P	HR	CI 95%	P
<i>TNFSF4</i>	0.95	0.43-2.09	0.90	0.81	0.39-1.65	0.56
<i>IL6ST</i>	0.93	0.23-3.68	0.91	1.10	0.37-3.26	0.86
<i>KLRG1</i>	0.87	0.57-1.31	0.50	0.82	0.58-1.16	0.27
<i>GP1BB</i>	1.68	0.59-4.75	0.33	0.86	0.41-1.78	0.68
<i>CD244</i>	0.97	0.34-2.80	0.96	0.83	0.34-2.01	0.68
<i>CD96</i>	0.54	0.20-1.45	0.22	0.71	0.31-1.66	0.43
<i>CD2</i>	1.03	0.43-2.46	0.95	1.04	0.50-2.18	0.91
<i>SLAMF6</i>	0.97	0.47-1.96	0.93	0.94	0.52-1.71	0.84
<i>CCL5</i>	0.98	0.43-2.25	0.96	0.89	0.45-1.78	0.75
<i>ITGB1</i>	1.05	0.34-3.15	0.94	0.74	0.29-1.85	0.52
<i>SIGIRR</i>	0.42	0.11-1.55	0.19	0.60	0.21-1.71	0.34
<i>CX3CR1</i>	1.45	0.64-3.28	0.36	1.01	0.56-1.82	0.98
<i>APP</i>	1.84	0.42-7.97	0.42	1.05	0.31-3.60	0.94
<i>PPBP</i>	1.27	0.62-2.58	0.51	1.04	0.57-1.88	0.89
<i>SLAMF1</i>	0.54	0.24-1.22	0.14	0.73	0.39-1.38	0.35
<i>ICAM2</i>	1.01	0.25-3.96	0.98	0.76	0.25-2.26	0.62

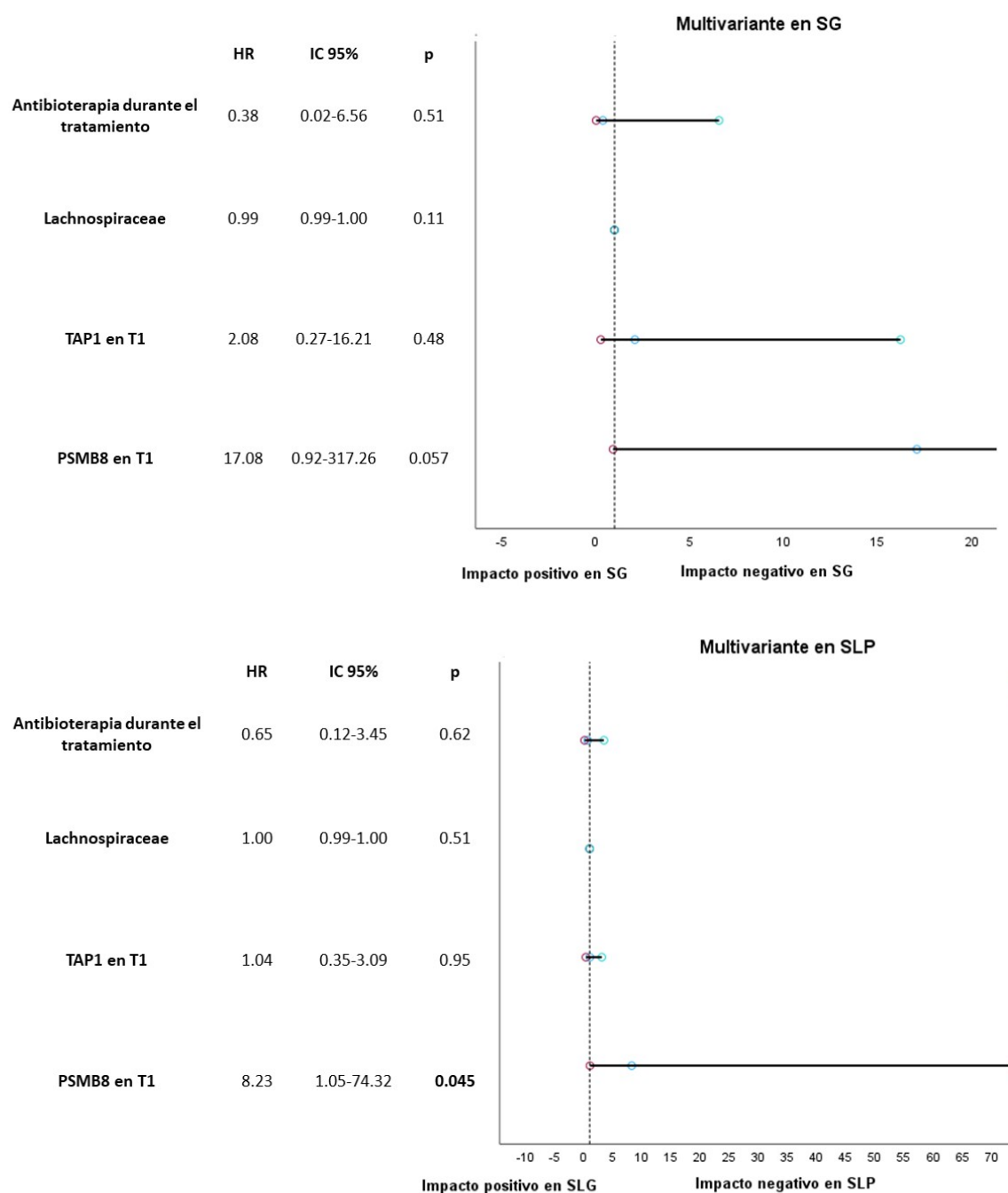
Posteriormente, se replicó el análisis univariante en la cohorte por protocolo de microbiota (n=20), seleccionando a los genes significativos en el análisis previo, e incluyendo a los genes regulados a la baja en R tanto en T0 como en T1 y los que aumentaron en respuesta al tratamiento - *TAP1* y *PSMB8* - en este mismo subgrupo de pacientes (Tabla 6). Además, se incluyeron los microorganismos que fueron significativos tanto en RC como en No-RC.

La sobreexpresión de *UBE2L3* continuó impactando positivamente en SLP en esta cohorte más reducida. El análisis también identificó a los niveles incrementados de *TAP1* y *PSMB8* en T1 como factores que impactaron significativamente en SG, con una HR de 4.09 (IC95% 1.06-15.81,  $p=0.04$ ) y una HR de 11.60 (IC95% 1.40-96.04,  $p=0.02$ ), respectivamente. *PSMB8*, a su vez, se asoció a un detrimento en SLP con una HR de 7.19 (1.17-43.93,  $p=0.03$ ).

**Tabla 6.** Análisis univariante de regresión de Cox que correlaciona genes de reactivación inmune y la microbiota asociada a respuesta completa y no respuesta completa con supervivencia global y supervivencia libre de progresión, en la cohorte de microbiota (n=20).

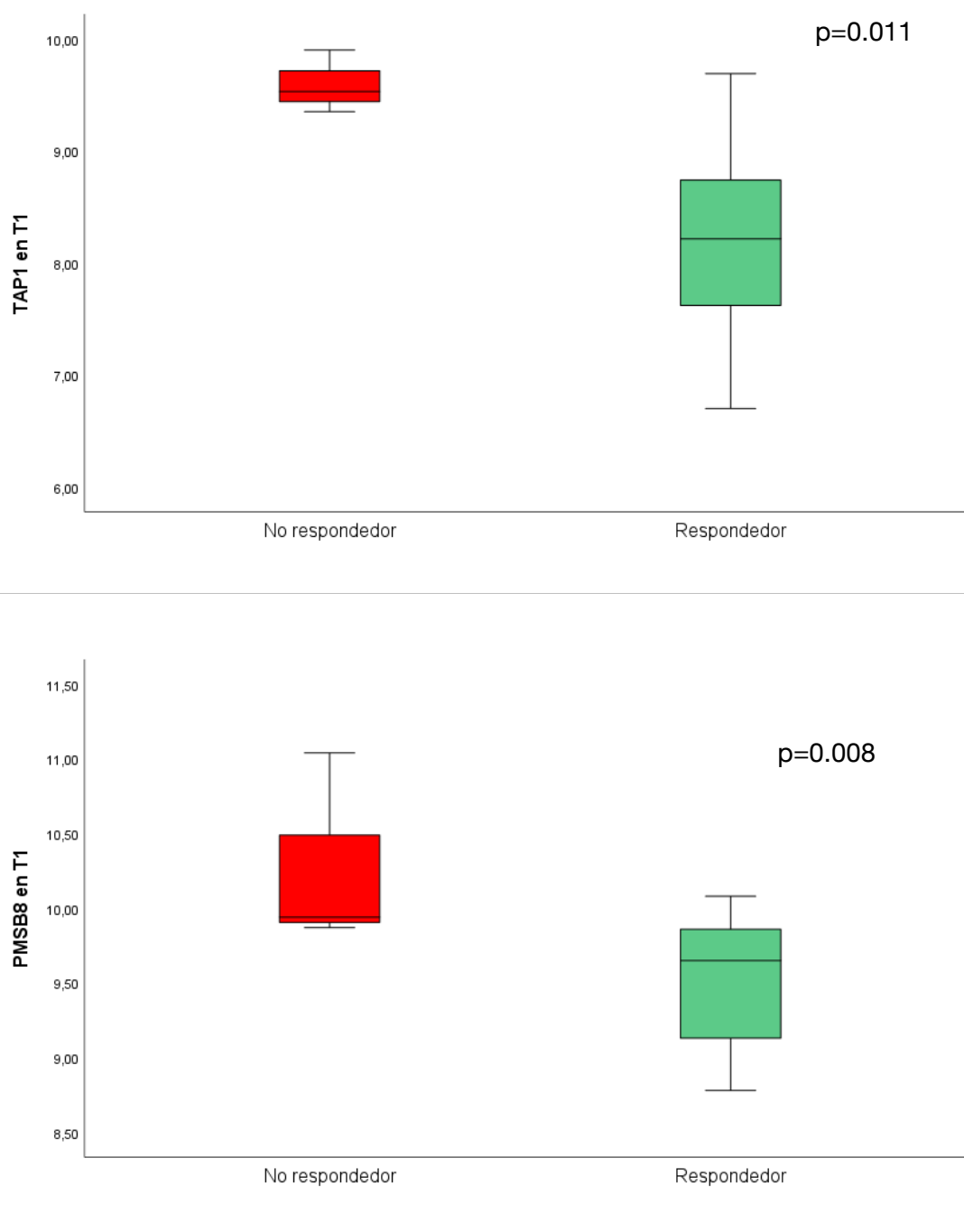
Análisis Univariante (N=20)	Supervivencia Global			Supervivencia Libre de Progresión		
	HR	CI 95%	P	HR	CI 95%	P
<i>Lachnospiraceae</i>	0.99	0.99-1.00	0.08	1.00	0.99-1.00	0.35
<i>Coriobacteriaceae</i>	0.99	0.99-1.00	0.28	1.00	0.99-1.00	0.46
<i>Adlercreutzia</i>	0.99	0.95-1.03	0.66	1.01	0.99-1.02	0.23
<i>Pasteurellaceae</i>	1.00	0.98-1.01	0.81	0.98	0.96-1.00	0.06
<i>Clostridium</i>	1.00	0.99-1.01	0.65	1.00	0.99-1.01	0.97
<b>Expresión génica</b>						
<i>ITGB2</i>	1.11	0.38-3.22	0.85	0.54	0.19-1.49	0.24
<i>UBE2L3</i>	0.67	0.16-2.81	0.58	<b>0.25</b>	<b>0.07-0.82</b>	<b>0.022</b>
<i>LAG3</i>	0.42	0.11-1.58	0.20	0.58	0.23-1.44	0.24
<i>CD36</i>	2.95	0.85-10.31	0.09	1.35	0.56-3.23	0.50
<i>SLAMF6</i>	0.91	0.41-1.99	0.81	0.85	0.45-1.57	0.60
<i>SLAMF7</i>	0.65	0.21-1.99	0.45	1.94	0.69-5.45	0.21
<i>NOD1</i>	0.26	0.06-1.15	0.08	0.47	0.17-1.34	0.16
<i>ICAM2</i>	0.66	0.10-4.41	0.67	0.34	0.07-1.63	0.18
<i>CXCR1</i>	0.25	0.04-1.81	0.17	0.55	0.13-2.25	0.41
<i>TAP en T1</i>	<b>4.09</b>	<b>1.06-15.81</b>	<b>0.04</b>	1.93	0.85-4.42	0.12
<i>PSMB8 en T1</i>	<b>11.60</b>	<b>1.40-96.04</b>	<b>0.02</b>	<b>7.19</b>	<b>1.17-43.93</b>	<b>0.03</b>

Posteriormente se realizó un análisis multivariante en SLP y SG, donde se confirmaron los niveles de *PSMB8* en T1 como factor independiente que impacta la SLP, con un HR de 8.23 (IC95% 1.05-74.32,  $p=0.045$ ) (Figura 29).



**Figura 29.** Forest-plot con análisis multivariante de regresión de Cox correlacionando uso de antibióterrapia durante el tratamiento, microbiota y genes de reactivación inmune con supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP). Los niveles de *PSMB8* en T1 se identificaron como un factor independiente que impacta en SLP.

Dados los hallazgos del análisis univariante y multivariante, se analizaron los niveles de *TAP1* y *PSMB8* en T1, en R y NR. Se realizó un test de Shapiro-Wilk que confirmó la normalidad de ambas variables continuas. A continuación se realizó una prueba T de student, donde se evidenciaron diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de ambos genes en T1 (*Figura 30*). Por lo tanto, si bien durante el análisis de expresión de genes se observó un aumento de estos genes de T0 a T1 en los pacientes R, los niveles continúan siendo significativamente superiores a tiempo T1 en el grupo de NR.



**Figura 30.** Box-plot que evidencian diferencias significativas en las concentraciones de *TAP1* (arriba) y *PSMB8* (abajo) en T1 entre respondedores y no respondedores ( $p < 0.05$ ). El test de Shapiro-Wilk se realizó para confirmar que las variables se ajustan a la normalidad. Posteriormente se realizó el T de student para comparar medias.

# V. DISCUSIÓN

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## V. DISCUSIÓN

La búsqueda de biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta para optimizar los tratamientos oncológicos es un área de investigación en constante evolución. La necesidad de encontrar biomarcadores fiables que mejoren las respuestas clínicas y la calidad de vida, además de disminuir la toxicidad y las secuelas a largo plazo, se manifiesta en un escenario en el que el cáncer ha pasado a ser, en ocasiones, una enfermedad crónica o de largos supervivientes. Esto es aún más relevante en el contexto de pacientes con melanoma que presentan respuesta completa al tratamiento con inhibidores de BRAF/MEK e inmunoterapia, dada la prolongada supervivencia observada en este subgrupo (174, 175, 172, 181, 182).

En los siguientes apartados, se discuten los resultados obtenidos a tenor de los objetivos de la tesis. El propósito de esta discusión es determinar la relevancia y la aplicabilidad de los hallazgos de nuestro estudio, para mejorar la comprensión del MM tratado con terapia dirigida. Además, se buscará establecer un marco que permita valorar la integración de los biomarcadores estudiados en la práctica clínica.

### **V.I Composición de la microbiota previo y durante el tratamiento con inhibidores BRAF/MEK, y correlación con la respuesta**

Los estudios publicados sobre la microbiota y la vía de las MAPK en diversos tumores, como el CCR *BRAF*-mutado o el cáncer de mama con sobreexpresión del Her2 mencionados previamente, presentan resultados discordantes (147, 148, 155, 156). Esto se debe, probablemente, a las diferencias en la fisiopatología, las

mutaciones de cada tumor y los tratamientos administrados. Por lo tanto, en los siguientes análisis nos focalizaremos en la evidencia publicada en melanoma.

Estudios previos acerca de la microbiota en melanoma describen un incremento en la diversidad alfa y un enriquecimiento de ciertas especies de bacterias y metabolitos derivados de la microbiota, que parecen estar relacionados con una mejor respuesta a ICI o incluso con la aparición de efectos adversos inmunomediados (134,135,136,137,138,183,184). Sin embargo, hasta la publicación de esta tesis doctoral no existía evidencia acerca de la composición de la microbiota en el melanoma tratado con iBRAF/MEK, ni su posible impacto en la respuesta al tratamiento. Está descrita la actividad inmunomoduladora de la inhibición BRAF/MEK, la cual estimula a las células T CD4+ y CD8+, modifica el MAT, y regula al alza genes involucrados en la reactivación inmune (59, 60, 185). En consecuencia, considerando esta asociación de la terapia dirigida con el sistema inmune, y dado que los estudios disponibles se focalizan en pacientes tratados con ICI, el análisis de la evidencia publicada podría esclarecer los hallazgos encontrados en nuestro estudio.

Nuestro estudio no observó diferencias significativas en la diversidad alfa ni beta entre las cohortes con respuesta completa y sin respuesta completa, así como tampoco se observaron diferencias significativas tras tres meses de tratamiento dirigido, probablemente dado el pequeño tamaño muestral. Sin embargo, nuestros hallazgos confirman un enriquecimiento de los filos Firmicutes - familia *Lachnospiraceae* - y Actinobacteria - familia *Coriobacteriaceae* y género *Adlercreutzia* - a nivel basal en pacientes que obtuvieron respuesta completa, y una mayor abundancia de Proteobacteria - familia *Pasteurellaceae* - y del género *Clostridium* en aquellos que no exhibieron respuesta completa. En este contexto,

resulta crucial mencionar que el 80% de los pacientes que alcanzaron respuesta completa habían recibido inmunoterapia adyuvante, lo cual podría haber modulado tanto la microbiota como el sistema inmune, favoreciendo una mejor respuesta al tratamiento con iBRAF/MEK.

### **V.I.1 Microbiota basal en pacientes con respuesta completa**

La evidencia en inmunoterapia en melanoma destaca el enriquecimiento de Firmicutes y de Actinobacterias en los pacientes respondedores - ORR (RC y RP) -, resultados similares a los observados en este trabajo, extrapolados a la cohorte de respuesta completa (134, 135, 136, 137, 138, 139). Los metaanálisis que engloban los estudios de microbiota en melanoma confirman, sobre todo, la abundancia de Firmicutes como patrón predominante en los pacientes respondedores (136, 137). El estudio por McCulloch *et al.* en 94 pacientes con melanoma tratados con ICI destacó el aumento del filo Firmicutes y la familia *Lachnospiraceae*, así también como de Actinobacterias, en los pacientes respondedores, y un predominio de los filos Proteobacteria y Bacteroidetes en no respondedores. Además, se observó un enriquecimiento de la familia *Lachnospiraceae* en pacientes que presentaron una mayor incidencia de efectos adversos inmunomediados, lo cual resulta contrario a nuestros hallazgos. Sin embargo, los mecanismos de acción por los cuales los ICI y los iBRAF/MEK desencadenan toxicidad son distintos, y generalmente los pacientes que experimentan efectos adversos inmunomediados suelen tener una mayor respuesta y un mejor pronóstico a los ICI debido a un incremento en la acción del sistema inmune (139, 186, 187).

Resulta interesante remarcar otro estudio en el que se utilizó TMF en 16 pacientes diagnosticados de melanoma durante el tratamiento con ICI. Entre sus

hallazgos, destacó un aumento de *Lachnospiraceae* y otros miembros del filo Firmicutes, así como de Actinobacterias, específicamente *Bifidobacterias* y *Coriobacteriaceae*, en muestras post-TMF de pacientes respondedores. Además, realizaron un análisis de citoquinas y quimoquinas donde observaron que los pacientes respondedores presentaban una regulación a la baja de genes asociados a resistencia a ICI tras el TMF, incluyendo *CXCL8* (IL-8), *IL-10*, y *CCL3*, y un aumento de aquellos asociados a mejores resultados clínicos (188).

En cuanto al género *Adlercreutzia*, la evidencia es escasa y contradictoria. Un estudio en 27 pacientes tratados con ICI demostró un aumento del género *Adlercreutzia*, aunque estos resultados no alcanzaron la significancia estadística (134). Por el contrario, el metaanálisis publicado por Limeta *et al.* describió un aumento significativo de la especie *Adlercreutzia equolifaciens* en pacientes no respondedores a ICI (140). Resulta crucial destacar que, a pesar de que es necesario de más investigaciones para esclarecer el papel del género *Adlercreutzia* en la respuesta al tratamiento, este microorganismo pertenece a la familia *Coriobacteriaceae*, del filo Actinobacteria. Por lo tanto, aunque el género no ha sido específicamente estudiado en las investigaciones de microbiota, hasta que se disponga de mayor evidencia ésta podría ajustarse a niveles taxonómicos superiores, la cual destaca su presencia en pacientes respondedores.

La razón por la cual estos microorganismos están aumentados en los pacientes con respuesta completa parecería estar basado en la modulación del sistema inmune. Se ha descrito que la familia *Lachnospiraceae* se asocia a una estimulación de las células T CD8+ y que, a su vez, secreta metabolitos que parecen contribuir a suprimir la proliferación celular, entre los que se incluyen el ácido butírico (189, 190). En cuanto al filo Actinobacteria, estos microorganismos

parecerían contribuir a la regulación del MAT y a secretar metabolitos que podrían tener actividad antitumoral (191). Específicamente la familia *Coriobacteriaceae* se ha asociado a la presencia de “flare” inmune en ganglios linfáticos en pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico tratados con ICI. Al analizar estos ganglios, se observó un predominio de células inmunes y un aumento de genes relacionados con la respuesta antitumoral, como el de IFN $\gamma$ , sugiriendo que este microorganismo podría tener un papel inmunomodulador (192). Otro estudio en pacientes que recibieron trasplante de sangre de cordón umbilical demostró el papel de *Coriobacteriaceae* en la reconstitución inmune, actuando en la estimulación de células monocíticas (193). Sin embargo, hay evidencia contradictoria en cuanto a *Coriobacteriaceae*. Hay estudios que asocian a este microorganismo con un incremento en la carcinogénesis mediante la estimulación de la vía de las MAPK y la disrupción de la barrera intestinal al actuar sobre las uniones intercelulares en pacientes con CCR (194, 195, 196). Además, también se lo ha vinculado con una dieta rica en grasas y una mayor inflamación intestinal (197). Este papel dual destaca la complejidad del microbioma según el escenario clínico.

Por su parte, *Adlercreutzia*, género que también se encontró incrementado en pacientes con respuesta completa, ha sido asociado a un rol inmunomodulador en estudios preclínicos, coincidiendo con un incremento de células T CD4+ y CD8+ en respuesta a Icarisida, un agente anticanceroso (198, 199). Un estudio reciente también destacó su rol protector en cáncer de próstata, al vincular a esta bacteria a un incremento en la concentración de S-equol, un compuesto que se ha asociado con la disminución del riesgo de cáncer de próstata (200, 201). Además, modelos in vitro de pacientes con enfermedad metabólica hepática demostraron que *Adlercreutzia* posee propiedades antiinflamatorias, mediante la inhibición de la vía

del NF- $\kappa$ B (202). Sin embargo, la evidencia que asocia la especie *Adlercreutzia equolifaciens* a una peor respuesta a inmunoterapia en melanoma genera incertidumbres en el rol dual de este microorganismo (140).

### **V.I.2 Microbiota basal en pacientes sin respuesta completa**

En lo que respecta a la microbiota presente en pacientes que no alcanzan respuesta completa, del filo Proteobacteria - familia *Pasteurellaceae* - y Firmicutes - género *Clostridium* - se observa una tendencia hacia perfiles microbianos distintos a los identificados en los pacientes con respuesta completa. Entre las Proteobacteria se reconocen múltiples patógenos para el ser humano, incluyendo *Haemophilus influenzae*, *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, y especies de los géneros *Actinobacillus* y *Proteus*. Su presencia suele asociarse a enfermedad, disbiosis y a un peor pronóstico en pacientes con cáncer. Es por ello que se les ha caracterizado como una “firma microbiana” de enfermedad, e incluso se han propuesto estrategias terapéuticas para modificar el estado de disbiosis ocasionado por las Proteobacterias (203, 204). Numerosos estudios han destacado el enriquecimiento de este filo en no respondedores, con una mayor abundancia de las especies *Escherichia coli*, *Sutterellaceae* spp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp. y *Citrobacter* sp. (136, 138, 139). Asimismo, *Pasteurella multocida* se ha asociado como promotor tumoral a través de numerosas vías de señalización, entre las que se incluyen PI3K/Akt, y la inhibición de la apoptosis a través de la familia Bcl-2 (205, 206). A pesar de la evidencia disponible, que engloba al filo Proteobacteria y a la especie *Pasteurella multocida*, hasta el momento no se ha investigado específicamente el papel de la familia *Pasteurellaceae* en melanoma tratado con terapia dirigida. Por lo tanto, a pesar de que nuestros resultados concuerdan con los estudios previamente

publicados en cuanto a niveles taxonómicos superiores, se precisa de mayor investigación para poder sacar conclusiones definitivas que permitan confirmar nuestros hallazgos.

En cuanto al género *Clostridium*, enriquecido en pacientes que no alcanzan respuesta completa, se ha asociado previamente a respuesta a ICI (112, 137). A pesar de ello, un estudio reciente observó un enriquecimiento de miembros del género *Clostridium*, entre los que se mencionan *Clostridium spiroforme* y *Hydrogeniiclostridium mannosilyticum*, en pacientes con melanoma tratados con ICI que mostraban un detrimento en la SLP (207). Estos hallazgos sugieren que ciertas especies de *Clostridium* pueden tener un papel contradictorio en la respuesta inmunológica, dependiendo del contexto clínico. Además, está descrito el potencial patogénico de varias de las especies pertenecientes a este género. Ejemplo de esto constituyen *Clostridium difficile* o *Clostridium ramosum*, asociados a infecciones severas en pacientes inmunocomprometidos, ocasionando diarrea, gangrena gaseosa, bacteriemia, abscesos cerebrales y émbolos sépticos (208, 209). Este rol patogénico proinflamatorio podría ser el que ocasione un efecto detrimental de la respuesta a iBRAF/MEK en pacientes con melanoma.

### V.I.3 Análisis longitudinal de la microbiota

Es importante destacar que, si bien se encontraron diferencias en la composición de la microbiota en tiempo basal entre las cohortes con y sin respuesta completa, no se observaron diferencias significativas en el análisis longitudinal diferencial entre tiempo basal y T1. Esto podría sugerir que la microbiota mantiene una composición estable durante el tratamiento con iBRAF/MEK, o podría ser atribuible al limitado tamaño muestral.

En resumen, la escasa evidencia disponible sobre la relación entre el melanoma y la microbiota, así como la presencia de resultados contradictorios, como es el caso del género *Clostridium* o *Adlercreutzia*, refuerzan la necesidad de investigaciones adicionales. Una mejor comprensión del papel de la microbiota en la enfermedad y la respuesta al tratamiento permitirá desarrollar nuevos enfoques terapéuticos para optimizar los resultados clínicos.

## **V.II Valor pronóstico y/o predictivo de duración de respuesta a iBRAF/MEK de la microbiota**

Tras haber analizado la composición de la microbiota tanto en pacientes con respuesta completa como aquellos sin respuesta completa en tiempo basal, emergen implicaciones pronósticas y predictivas de respuesta asociadas a estos hallazgos.

A pesar de que nuestro estudio no pudo confirmar el valor pronóstico de la microbiota, posiblemente debido al tamaño limitado de la muestra, es fundamental destacar el rol de estos microorganismos y su potencial capacidad predictiva de respuesta a tratamiento. La presencia predominante del filo Proteobacteria en pacientes que no alcanzan la mejor respuesta posible a la terapia dirigida, microorganismos previamente asociados a un pronóstico desfavorable y a falta de respuesta al tratamiento con ICI, sugiere un patrón característico de disbiosis (204). Por el contrario, la presencia del filo Actinobacteria, en concreto la familia *Coriobacteriaceae* y el género *Adlercreutzia*, y del filo Firmicutes, específicamente la familia *Lachnospiraceae*, en pacientes con respuesta completa, refuerzan la evidencia existente sobre su contribución en la modulación del sistema inmune a favor de un fenotipo antitumoral (139, 140). Esta acción reguladora de la microbiota

sobre el sistema inmune y el MAT podría estar favoreciendo no sólo la respuesta a los ITK, sino también el pronóstico de los pacientes independientemente del tratamiento administrado, no confirmado en nuestros hallazgos al estar limitados por el tamaño muestral. Se precisan estudios prospectivos con un mayor número de pacientes reclutados para poder comprender mejor esta compleja interacción microbiota-tumor y explorar posibles intervenciones terapéuticas basadas en estos hallazgos.

---

En resumen, si bien nuestros hallazgos no pueden confirmar el rol pronóstico de la microbiota en términos de supervivencia, la concordancia observada con otros estudios de melanoma tratado con ICI refuerza su papel como biomarcador en este contexto. Se necesitan de estudios más amplios para determinar existe también un papel predictivo de respuesta al tratamiento con iBRAF/MEK. De esta manera, nuestro estudio puede servir de punto de partida para generar hipótesis que guíen investigaciones futuras en el manejo de estos pacientes. Además, considerando estos resultados y la evidencia previa en melanoma, que respalda el perfil “beneficioso” de los filos Firmicutes y Actinobacterias, en contraposición con las Proteobacterias, podrían diseñarse estrategias dirigidas al uso de probióticos o terapias de modulación de la microbiota, como el TMF, que involucren a estos microorganismos para mejorar los resultados clínicos.

### **V.III Identificación de genes relacionados con reactivación inmune y su correlación con la respuesta**

En lo que respecta a los genes vinculados con la reactivación de la respuesta inmune, la *Tabla 7* detalla la actividad de los genes que han resultado estadísticamente significativos en tiempo basal al estratificar la cohorte por respuesta - R y NR. Es preciso recordar que el valor de  $p$ -ajustado ( $q$ -value), utilizado para reducir la probabilidad de falsos positivos al realizar múltiples comparaciones, no fue significativo en los análisis de expresión génica. Sin embargo, procederemos a analizar los genes identificados por el valor de  $p$  significativo, como modo de generación de hipótesis para futuras investigaciones.

**Tabla 7.** Genes relacionados con respuesta inmune identificados a nivel basal en respondedores y no respondedores. Los recuadros naranjas resaltan los 7 genes regulados a la baja en respondedores, tanto en T0 como en T1 (210, 211, 212, 213, 214, 215).

Genes significativos en tiempo basal - T0.			
	Respondedores	No respondedores	Mecanismos de acción
CD2	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Antígeno de superficie de células T periféricas.</li> <li>○ Participa en la <b>adhesión celular entre linfocitos T y otras células.</b></li> <li>○ Interacciona con CD58 en células presentadoras de antígeno para <b>facilitar el reconocimiento antigénico.</b></li> <li>○ Estimula la secreción de <b>IL8, TNF e IFN.</b></li> </ul>
SLAMF6	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Receptor de la familia de moléculas de señalización de activación linfocítica.</li> <li>○ Se expresa en células NK, y linfocitos T y B.</li> <li>○ Participa en la <b>activación de las células NK y T.</b></li> <li>○ Promueve <b>diferenciación de células T a un fenotipo Th17</b>, con acción <b>proinflamatoria</b> y fundamentales en la defensa contra bacterias y hongos.</li> </ul>
CCL5	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Citoquina de la superfamilia CC, que atrae monocitos, eosinófilos y células T helper de memoria.</li> <li>○ <b>Regula la activación de células T, eosinófilos y neutrófilos.</b></li> <li>○ Favorece la liberación de histamina de basófilos.</li> </ul>
ITGB1	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Subunidad beta de la familia de las integrinas, que participan en la <b>adhesión celular.</b></li> <li>○ Participa en la reparación de tejidos.</li> <li>○ Se ha descrito su rol como <b>inductor de la diseminación metastásica de tumores.</b></li> <li>○ <b>Estimulación de vía Hedgehog, lo cual conlleva a proliferación celular y aumento de la invasividad.</b></li> </ul>
SIGIRR	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Receptor de la IL1 localizado en la membrana celular.</li> <li>○ <b>Regulador negativo del factor de transcripción de unión al ADN.</b></li> <li>○ <b>Regulador negativo de la producción de citoquinas.</b></li> </ul>
CX3CR1	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Receptor para la citoquina CX3CL1, que participa en funciones inmunes, <b>inflamación y adhesión celular.</b></li> <li>○ Estimula la <b>angiogénesis</b> al actuar sobre la vía VEGF.</li> <li>○ Promueve la <b>proliferación celular.</b></li> <li>○ <b>Reclutamiento de células NK, macrófagos, monocitos y células T a zonas de inflamación.</b></li> </ul>
APP	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Receptor de superficie celular que al fragmentarse en péptidos pueden favorecer la transcripción y participar en la defensa antimicrobiana.</li> <li>○ <b>Inhibe la vía Notch y Wnt de proliferación celular, y regula la apoptosis.</b></li> <li>○ Participa en el desarrollo neuronal y axonal.</li> <li>○ <b>Regula la migración de células T y la producción de citoquinas.</b></li> </ul>
PPBP	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Factor de crecimiento celular derivado de las plaquetas.</li> <li>○ Participa en la <b>activación de los neutrófilos.</b></li> <li>○ Regula la <b>respuesta inflamatoria</b>, estimulando la secreción de prostaglandina E2.</li> <li>○ <b>Estimula la síntesis de ADN</b>, regula la glucólisis y la división celular.</li> </ul>
SLAMF1	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Receptor de la familia de moléculas de señalización de activación linfocítica.</li> <li>○ <b>Estimula la vía de MAPK.</b></li> <li>○ Participa en la respuesta innata y adaptativa, mediante la <b>diferenciación de células NK, la estimulación de la fagocitosis, la proliferación T y la modulación de liberación de citoquinas.</b></li> </ul>
ICAM2	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Proteína de la familia de moléculas de adhesión intercelulares (ICAM).</li> <li>○ Participa en la respuesta inmune al mediar la <b>adhesión entre antígeno y linfocitos.</b></li> <li>○ Estimula la recirculación linfocitaria, con el objetivo de mantener la <b>vigilancia inmunitaria.</b></li> </ul>

## Genes significativos en tiempo basal - T0.

	Respondedores	No respondedores	Mecanismos de acción
NFATC2	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Miembro de la familia de los factores nucleares de las células T activas (NFAT).</li> <li>○ Inducción de IL2, IL3, IL4, TNFalfa.</li> <li>○ Participa en la vía de <b>señalización y la proliferación de células B.</b></li> <li>○ <b>Regula la migración celular</b> a través de la activación de GPC6 y la vía WNT5A.</li> </ul>
TIGIT	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Unión al receptor del poliovirus.</li> <li>○ Aumenta la secreción de IL10 y disminuye la de IL12B, <b>inhibiendo así la activación de células T.</b></li> <li>○ <b>Regula la maduración de células dendríticas.</b></li> </ul>
LCK	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>Protooncogén</b> de la familia de la proteína tirosina-quinasa Src.</li> <li>○ Participa en la <b>maduración, diferenciación y el desarrollo de las células T.</b></li> <li>○ Regula vías de señalización asociadas al TCR (receptor de linfocitos T).</li> <li>○ <b>Activación plaquetaria.</b></li> <li>○ <b>Migración y adhesión leucocitaria.</b></li> </ul>
SLAMF7	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Receptor de la familia de moléculas de señalización de activación linfocítica.</li> <li>○ Regula respuesta inmune innata y adaptativa.</li> <li>○ Estimula la <b>activación y la citotoxicidad de células NK.</b></li> <li>○ <b>Inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias.</b></li> <li>○ Participa en la <b>activación de células T y la adhesión celular.</b></li> </ul>
PTK2	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Proteína tirosina-quinasa citoplasmática.</li> <li>○ Participa en la <b>migración, adhesión y proliferación celular. Inhibe la apoptosis.</b></li> <li>○ <b>Regula la angiogénesis.</b></li> <li>○ Promueve la <b>activación de la vía MAPK.</b></li> <li>○ <b>Regula la actividad de la proteína p53.</b></li> </ul>
NOD1	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Proteína de la familia del receptor de reconocimiento de patrones.</li> <li>○ <b>Detectan señales dañinas</b> como peptidoglicanos bacterianos o virus para <b>iniciar una respuesta inmune.</b></li> <li>○ <b>Activa la vía MAPK y NFkB, iniciando la respuesta inflamatoria, en respuesta a estrés celular.</b></li> </ul>
UBE2L3	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Enzima conjugadora de ubiquitina.</li> <li>○ Degrada proteínas anormales, y se encarga de la <b>ubiquitinización de p53, c-Fos y NFkB.</b></li> <li>○ Participa en la <b>progresión del ciclo celular.</b></li> </ul>
TNFSF4	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Citoquina de la familia TNF.</li> <li>○ Participa en la <b>adhesión de las células T al endotelio.</b></li> <li>○ Estimula la <b>activación de células Th2 y de memoria.</b></li> <li>○ Promueve la <b>inflamación y la secreción de citoquinas proinflamatorias.</b></li> </ul>
IL6ST	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Proteína encargada de la transducción de señales.</li> <li>○ La unión de IL6 con su receptor ocasiona la homodimerización de IL6ST, activando las vías JAK-MAPK y JAK-STAT3.</li> <li>○ <b>Proinflamatoria</b>, estimula la secreción de citoquinas.</li> <li>○ <b>Promueve la proliferación T.</b></li> <li>○ <b>Regula negativamente la apoptosis y estimula la vía Notch, encargada de la proliferación y diferenciación celular.</b></li> </ul>
KLRG1	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Proteína transmembrana de la familia de KLR (receptor de células citotóxicas tipo lectina), expresada en células NK.</li> <li>○ Regulado por MHC I.</li> <li>○ <b>Puede inhibir la función de las células NK y T.</b></li> </ul>
GP1BB	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Proteína transmembrana que forma parte del complejo receptor del factor de Von Willebrand.</li> <li>○ Participa en la <b>activación y adhesión plaquetaria en la coagulación.</b></li> <li>○ Parece tener un <b>papel modulador del desarrollo de megacariocitos.</b></li> </ul>
CD244	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Receptor de células NK que participa en la <b>citotoxicidad mediada por MCH.</b></li> <li>○ <b>Estimula la producción de granzima B</b>, presente en los gránulos de las NK y los linfocitos T citotóxicos, IFN gamma e IL8.</li> </ul>
CD96	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Proteína de membrana de la familia de inmunoglobulinas.</li> <li>○ Función de <b>adhesión de células T y NK durante la respuesta inmune.</b></li> </ul>

## Genes significativos en tiempo basal - T0.

	Respondedores	No respondedores	Mecanismos de acción
<b>LAG3</b>	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Receptor inhibitorio de células T activas.</li> <li>○ Modulación de la respuesta inmune adaptativa.</li> <li>○ <b>Regula células NK y dendríticas.</b></li> <li>○ <b>Promoción de la carcinogénesis y la tolerancia inmune por medio del agotamiento de los linfocitos T CD8+, la inducción de células Treg, y la inhibición de las células dendríticas.</b></li> </ul>
<b>ITGA6</b>	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Miembro de la familia de integrinas alfa, receptor para lamininas en las plaquetas.</li> <li>○ Al unirse con la subunidad beta 4 <b>puede promover la tumorigénesis.</b></li> <li>○ Al unirse con la subunidad beta 1 <b>puede regular negativamente la vía Her2.</b></li> <li>○ Participa en <b>adhesión</b> intercelular y entre célula-matriz.</li> <li>○ Regula la <b>migración celular.</b></li> </ul>
<b>TP53</b>	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>Supresor de tumores.</b></li> <li>○ Inducción de la apoptosis, senescencia, reparación celular o cambios en el metabolismo en <b>respuesta a estrés celular o daños en ADN.</b></li> <li>○ <b>Interviene en proliferación y diferenciación T</b>, desarrollo de médula ósea, transcripción de ARNm, proliferación de fibroblastos.</li> <li>○ Participa en las vías de TGFb, TNF.</li> <li>○ Regula la expresión de múltiples genes.</li> </ul>
<b>KLRK1</b>	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Receptor activador y coestimulador de la respuesta inmune innata y adaptativa.</li> <li>○ <b>Estimula actividad citotóxica de células NK, amplifica la respuesta T CD8+.</b></li> <li>○ Participa en la <b>eliminación de células tumorales</b> al unirse a ligandos expresados en la superficie celular.</li> </ul>
<b>TAL1</b>	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Forma parte de un complejo regulador de la transcripción.</li> <li>○ Participa en la <b>angiogénesis</b> y la hematopoyesis.</li> <li>○ <b>Regula el ciclo celular.</b></li> <li>○ Estimula la diferenciación eritroide y megacariocítica, y la formación de plaquetas. Se ha visto asociado a neoplasias hematológicas.</li> </ul>
<b>CD36</b>	↓	↑	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Glicoproteína de la superficie celular con múltiples ligandos.</li> <li>○ Respuesta a la <b>angiogénesis</b> y la <b>inflamación.</b></li> <li>○ Implicado en la <b>adhesión celular.</b></li> <li>○ Participa en el metabolismo de los ácidos grasos.</li> <li>○ <b>Actúa sobre la vía de las MAPK y ERK1-ERK2.</b></li> <li>○ Regula la transcripción de NFkB.</li> </ul>
<b>ITGB2</b>	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Receptor de integrinas, participa en procesos de <b>adhesión</b> y <b>señalización celular.</b></li> <li>○ Regula procesos de <b>apoptosis.</b></li> <li>○ <b>Induce la quimiotaxis, migración y degranulación de neutrófilos.</b> Contribuye a la <b>citotoxicidad de células NK</b> y a la adhesión leucocitaria.</li> </ul>
<b>IL1RAP</b>	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Componente del receptor de IL1, que permite la activación de vías inducidas por esta interleuquina.</li> <li>○ Induce procesos <b>proinflamatorios</b> y <b>señales mitogénicas.</b> Estimula la producción de <b>interleuquinas</b> y la actividad de NFkB.</li> <li>○ Mediador del sistema inmune innato.</li> </ul>
<b>HLA-B</b>	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pertenece a la familia de MHC I.</li> <li>○ <b>Reconocimiento antigénico</b> de péptidos virales y células tumorales para su <b>reconocimiento por células T CD8+.</b></li> <li>○ Regula la <b>diferenciación de células dendríticas</b>, la producción de <b>interleuquinas</b>, y la anergia de <b>células T.</b></li> </ul>
<b>TLR2</b>	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Miembro de la familia de receptores Toll-like, involucrados en el <b>reconocimiento de patógenos</b> y la <b>estimulación de la inmunidad innata.</b></li> <li>○ Regula la actividad de NFkB y TNF, la producción de citoquinas, y la <b>respuesta inflamatoria.</b></li> <li>○ Actúa en el metabolismo del óxido nítrico, el cual tiene un rol crucial en la eliminación de patógenos pero también podría favorecer la inflamación en el MAT, estimulando el crecimiento celular y la angiogénesis.</li> </ul>
<b>PLAUR</b>	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Receptor del activador del plasminógeno tipo urocinasa.</li> <li>○ Promueve la activación del plasminógeno y la degradación de la matriz extracelular.</li> <li>○ <b>Regula la adhesión celular, la fibrinólisis y la apoptosis.</b></li> <li>○ <b>Regulación positiva de la vía del EGFR</b>, se ha descrito como <b>mecanismo de resistencia</b> al tratamiento con Gefitinib.</li> </ul>
<b>IL13RA1</b>	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Componente del receptor de IL13 e IL4.</li> <li>○ Se une a la tirosín-quinasa TYK2, mediando procesos de activación en las vías JAK1, STAT3 y STAT6 que conllevan a la <b>proliferación y supervivencia celular</b>, y a la <b>angiogénesis.</b></li> </ul>
<b>CSF3R</b>	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos.</li> <li>○ Favorece la <b>proliferación, diferenciación y quimiotaxis de los neutrófilos.</b></li> <li>○ Participa en la <b>adhesión celular.</b></li> </ul>

## Genes significativos en tiempo basal - T0.

	Respondedores	No respondedores	Mecanismos de acción
RELA	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>Protooncogén</b> que se une a NFKB. La combinación de dímeros determina una <b>función transcripcional activadora o represora</b>.</li> <li>○ Regula la transcripción de miRNAs y RNA polimerasa II.</li> <li>○ Modula la <b>inflamación</b> por medio de interleuquinas, TNF, VEGF.</li> <li>○ <b>Regulador negativo de la apoptosis y la angiogénesis</b>.</li> </ul>
MAPKAPK2	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Proteín-quinasa serina/treonina activada por estrés.</li> <li>○ Modula la <b>inflamación</b> mediante TNF, Interleuquinas.</li> <li>○ Regula la <b>proliferación</b> y la <b>migración</b> celular, la <b>reorganización del citoesqueleto</b>, y la remodelación de la cromatina.</li> <li>○ <b>Respuesta al daño en el ADN</b>, regulando ARN mensajeros que contribuyen a estabilizar p53.</li> </ul>
IL4R	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Receptor de la IL4 y la IL13.</li> <li>○ Participa en la <b>diferenciación Th2</b>, la producción de <b>citoquinas</b> y la <b>activación macrófaga</b>.</li> <li>○ Respuesta a inflamación alérgica, regulando la producción de IgE, y la degranulación de los mastocitos.</li> </ul>
CD45RA	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Expresión en timocitos medulares y linfocitos T CD4+ indiferenciados. Poca capacidad de respuesta antigénica.</li> <li>○ Las células <b>se diferencian a CD45RO - células de memoria</b> - tras ser activadas por un antígeno.</li> </ul>
LITAF	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Codifica el TNF-alfa inducido por lipopolisacáridos. Su transcripción está estimulada por p53.</li> <li>○ Respuesta a la <b>inflamación</b>, regulando la <b>producción de citoquinas</b> - TNF, CCL2, CCL5, CXCL1, IL1A e IL10.</li> </ul>
NFKB2	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Factor de transcripción presente en casi todas las células.</li> <li>○ Activa mecanismos de <b>inflamación</b>.</li> <li>○ <b>Modula el sistema inmune</b>.</li> <li>○ Participa en la <b>diferenciación celular, tumorigénesis, crecimiento celular, y la apoptosis</b>.</li> </ul>
HLA-A	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Molécula del MHC I.</li> <li>○ <b>Activación T CD8+, respuesta antibacteriana y antiviral, producción de citoquinas</b>.</li> <li>○ En conjunto con beta2microglobulina expone péptidos derivados de tumor y víricos para su reconocimiento por células T.</li> </ul>
STAT5A	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pertenece a la familia de factores de transcripción STAT, activado por varios ligandos como IL2, IL3, eritropoyetina, y hormonas de crecimiento.</li> <li>○ <b>Traducción de señales y activación de la transcripción</b>, en respuesta a FGFR, ERBB4, entre otros.</li> <li>○ Participa en la diferenciación de eosinófilos.</li> </ul>
BCL3	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>Protooncogén</b> estimulado por NFKB.</li> <li>○ Respuesta al daño en el ADN, mediado por p53.</li> <li>○ <b>Diferenciación Th2 y de células dendríticas, defensa ante bacterias, virus y protozoos</b>.</li> <li>○ Participa en respuesta antimicrobiana humoral.</li> <li>○ <b>Regula la apoptosis</b>.</li> </ul>
CD24	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Sialoglicoproteína expresada en <b>granulocitos maduros y células B</b>, que modula el <b>crecimiento</b> y la <b>diferenciación</b> de estas células.</li> <li>○ <b>Coestimulación células T</b>.</li> <li>○ <b>Activación, adhesión y migración celular</b>.</li> <li>○ Regula la vía <b>MAPK y Wnt</b>.</li> </ul>
TNFRSF1B	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Miembro de la familia de receptores de TNF.</li> <li>○ Unión con el receptor 1 de TNF, que permite el <b>reclutamiento de las proteínas antiapoptóticas c-IAP1 y c-IAP2</b>.</li> <li>○ <b>Regula producción de citoquinas, vías metabólicas del TNF, vías apoptóticas y mecanismos inflamatorios</b>.</li> </ul>
CASP8	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Caspasa encargada de la <b>muerte celular programada</b> inducida por Fas y otros estímulos apoptóticos.</li> <li>○ <b>Regulador negativo de la necroptosis (necrosis regulada)</b>.</li> <li>○ <b>Activación células B, T y NK. Diferenciación macrófaga</b>.</li> <li>○ Modulación de la <b>angiogénesis</b>.</li> </ul>
IRF1	↑	↓	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Regulador de la transcripción y <b>supresor tumoral</b>.</li> <li>○ Activación de genes implicados en respuesta inmune innata y adquirida. Regula la <b>maduración y la actividad de células NK</b>, la producción macrófaga de IL12, el <b>desarrollo de células Th1</b>, y la <b>maduración de células T CD8+</b>.</li> <li>○ <b>Inhibición del crecimiento tumoral</b>, participa en procesos de apoptosis.</li> </ul>

### V.III.1 Firma génica en T0 y T1 en relación a la respuesta

Destacan siete genes que permanecen regulados a la baja en los pacientes respondedores - RC y RP -, y al alza en no respondedores - EE y PE -, tanto en tiempo basal (T0) como en el seguimiento (T1): *LAG3*, *CD36*, *SLAMF7*, *NOD1*, *SLAMF6*, *CX3CR1* e *ICAM2*. Es crucial resaltar la actividad de estos genes para comprender por qué se encuentran disminuidos en los pacientes que responden al tratamiento.

*LAG3* (*CD223*) codifica para una proteína de superficie celular que modula la respuesta inmune, al estar expresada en células T activadas, células NK, linfocitos B, y células plasmocitoides dendríticas. Estudios previos reportan su participación en la promoción de la carcinogénesis y la tolerancia inmune por medio del agotamiento de los linfocitos T CD8+, la inducción de células Treg, y la inhibición de las células dendríticas (216, 217). A día de hoy se ha convertido en una diana terapéutica aprobada por la EMA y pendiente de aprobación por las autoridades sanitarias españolas, tras los resultados del ensayo clínico RELATIVITY-047, donde la inhibición de *LAG3* en combinación con nivolumab demuestra beneficio en primera línea en pacientes con melanoma metastásico (35).

*CD36* codifica para una glicoproteína de membrana presente en varias células y tejidos, incluyendo plaquetas, fagocitos, adipocitos, hepatocitos, miocitos, y el endotelio vascular (218). Actúa como transductor de señales de ciertas vías moleculares como la de las MAPK e interacciona con patrones moleculares asociados a daños (DAMPs), activando así al sistema inmune innato (219). Se ha correlacionado con un peor pronóstico y un detrimento en la supervivencia debido a su rol en la angiogénesis, la apoptosis y la adhesión celular. Además, está asociado a la pluripotencialidad en el MAT, lo que desencadena en iniciación y progresión

tumoral, aumento de la capacidad metastásica, resistencia a terapias y evasión de la respuesta inmune al estimular Treg y macrófagos asociados a tumor M2 (220). En un estudio de melanoma *BRAF*-mutado se observó que la inhibición de la vía MAPK puede estimular la expresión de la proteína *CD36*, como un mecanismo de resistencia al tratamiento (221).

Los genes *SLAMF6* y *SLAMF7* pertenecen a la familia de receptores transmembrana SLAM, localizados en la superficie de las células inmunes (222). Estos genes desempeñan un papel crucial en la adhesión y las interacciones intercelulares, a la vez que regulan la función de los neutrófilos y el desarrollo de células NK. Su sobreexpresión se ha descrito en linfomas B y mieloma múltiple, probablemente debido a su función reguladora del sistema inmune (223, 224). Se lo ha asociado con la inhibición de las células T CD8+, lo que conduce a un agotamiento de la respuesta T y, en consecuencia, a la promoción de la carcinogénesis (225, 226). Además, se ha observado un incremento en la expresión de *SLAMF7* en pacientes con melanoma que no responden a ICI (227).

El gen *NOD1* codifica para un receptor citoplasmático que detecta fragmentos bacterianos y otras señales de daño, con el objetivo de modular respuestas inmunes innatas y adaptativas. Además, participa en el mantenimiento de la homeostasis del retículo endoplásmico, y la modulación del citoesqueleto y varias vías metabólicas. Sin embargo, además de su función reguladora de la homeostasis, se ha descrito que puede favorecer el desarrollo de CCR al promover alteraciones de vías de señalización y estimular la secreción de citoquinas proinflamatorias (228). Por otra parte, se ha descrito su impacto en la composición de la microbiota, al estimular MDSCs que promueven un ambiente inmunosupresor y un estado de disbiosis (229, 230).

*CX3CR1* codifica para un receptor de citoquinas que tiene un papel dual en el cáncer. Por un lado, favorece la respuesta antitumoral al estimular a las células CD8+ Th1 y las NK, mientras que por el otro se ha visto que puede activar mecanismos que se relacionan con la proliferación, la migración, la adhesión y la resistencia a la apoptosis celular, además de favorecer la formación de metástasis (231, 232). En los últimos años se ha propuesto como una diana terapéutica dado que tiene un papel fundamental en ciertas vías de señalización, incluyendo la de las MAPK, PI3K, y JAK-STAT, y en el reclutamiento de macrófagos asociados a tumor (233, 234, 235).

Por último, el gen *ICAM2* codifica para una molécula de adhesión intercelular a la cual también se la ha asociado tanto a una actividad promotora como inhibitoria de la carcinogénesis. Se ha relacionado con un aumento de la formación de metástasis leptomeníngicas en cáncer de mama, disminución de la radiosensibilidad en carcinoma escamoso oral, y a un aumento de adhesión tumoral en el proceso migratorio (236, 237, 238). Por el contrario, también existe evidencia que lo asocia a la disminución del crecimiento tumoral y a estimulación de la respuesta inmune antitumoral (239, 240). En consecuencia, el rol de esta molécula de adhesión en la contribución al cáncer aún no está claramente establecido.

En resumen, los genes mencionados, regulados a la baja durante la inhibición BRAF/MEK en los pacientes respondedores, están asociados en su mayoría a inmunosupresión y a la progresión del cáncer, lo que sugiere que podrían ser considerados como dianas terapéuticas prometedoras.

Resulta de importancia destacar que, de los 20 genes regulados al alza en respondedores en tiempo basal, no se observa ninguno en T1. Este hallazgo sugiere la posibilidad de que la terapia dirigida haya inhibido la expresión de estos

genes como parte de su mecanismo de acción. Por el contrario, se observa el aumento de 4 genes: *ICAM4*, *KIT*, *IL8* y *TRAF4*. *ICAM4* es una proteína de adhesión intercelular que interacciona con células endoteliales, plaquetas, integrinas y macrófagos, y parece mediar el proceso de eritrofagocitosis de glóbulos rojos senescentes (241). Además, tiene un papel inmunoregulador de células linfoides y no linfoides (242). Un estudio describió su papel antitumoral en el hepatocarcinoma, al demostrar que *ICAM4* favorecería la acción citotóxica de las células NK sobre las células tumorales (243). *KIT* es un protooncogén que codifica para una proteína tirosina-quinasa, la cual media funciones de proliferación, crecimiento, supervivencia y adhesión celular, además de participar en el desarrollo de los melanocitos (244). Desempeña también un papel supresor tumoral, ya que se han observado niveles disminuidos en la progresión del melanoma desde estadios iniciales hasta invasivos y metastásicos (245, 246). *IL8*, también conocida como *CXCL8*, es una citoquina que se expresa en numerosas células, incluyendo células endoteliales, epiteliales, keratinocitos, linfocitos T, hepatocitos, neutrófilos, NK, mastocitos, y células tumorales, entre otras. Su función proinflamatoria favorece el crecimiento y la invasividad del melanoma, estimula la angiogénesis y aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos, lo que conlleva a un incremento del potencial metastásico (247). Participa en la activación de numerosas vías moleculares, entre las que se mencionan PI3K, MAPK, Wnt, y VEGF, razón por la cual se ha asociado con el desarrollo y la progresión de múltiples tumores, así como con la resistencia a tratamientos antineoplásicos (248, 249). Por último, *TRAF4* es un miembro de la familia de receptores de TNF que contribuye a procesos de migración, diferenciación y apoptosis celular, y promueve la proliferación celular mediante la activación de la vía EGFR y AKT (250, 251).

En conclusión, al observar la sobreexpresión de estos genes en pacientes respondedores en T1 y analizar sus funciones, es preciso remarcar la dualidad del escenario inmunitario. Por un lado, *KIT* e *ICAM4* se han descrito asociados a un papel antitumoral en melanoma y hepatocarcinoma, respectivamente, mientras que *TRAF4* e *IL8* parecerían promover la activación de la vía de las MAPK. Estos genes podrían estar propiciando el desarrollo de mecanismos de resistencia al tratamiento, favoreciendo la supervivencia celular y la proliferación, y, al mismo tiempo, desempeñar un papel como moduladores del MAT y la respuesta inmunológica. Se precisan investigaciones adicionales para dilucidar su implicación en este contexto de respuesta al tratamiento con iBRAF/MEK.

### **V.III.2 Análisis longitudinal - el rol de *TAP1* y *PSMB8***

En el análisis longitudinal, se identificaron dos genes de T1 regulados al alza en respondedores en la expresión diferencial de T0 a T1: *TAP1* y *PSMB8*. *TAP1* es un transportador ABC que se encarga del procesamiento y transporte de péptidos antigénicos al MHC I, y transmite señales inhibitorias a células NK y T CD8+ para regular su función (210). Su sobreexpresión en ciertos tumores, incluyendo melanoma uveal, cáncer de ovario y cáncer de endometrio, se ha asociado a un peor pronóstico y supervivencia (252). Un estudio reveló que, en tumores con una alta expresión de *TAP1* y peor supervivencia, había un enriquecimiento de vías de señalización inflamatorias, incluyendo IFN- $\gamma$ , NF- $\kappa$ B y JAK/STAT (253). En cáncer de páncreas *KRAS* mutado, el aumento de *TAP1* ocasionaría una mayor resistencia al tratamiento con inhibidores MEK, al estimular el transporte del fármaco fuera de las células y promover un ambiente de “células madre” o “stemness”, asociado a mayor agresividad tumoral (254). Otro estudio asoció a *TAP1* con una resistencia

incrementada al tratamiento con gemcitabina, también en el contexto de cáncer de páncreas (255). Por el contrario, hay evidencia que destaca que pacientes con melanoma tratados con inmunoterapia y que presentan sobreexpresión de *TAP1* responden mejor al tratamiento. Esto parecería atribuirse a una mayor sensibilidad a la inmunoterapia debido a un incremento de células inmunes y a una regulación del MAT, mediado por *TAP1* (253). En ciertos tumores, como el CCR, la disminución de *TAP1* se ha correlacionado con peor pronóstico y supervivencia. Esto resultaría del aumento de Treg intratumorales y neutrófilos, que favorecen los mecanismos de evasión inmune (256, 257, 258). Estos hallazgos discordantes en la literatura según el tipo de tumor y el tratamiento recibido sugiere un papel complejo de *TAP1* en la progresión tumoral y la respuesta al tratamiento, destacando su importancia como biomarcador pronóstico en diferentes contextos tumorales. Sin embargo, se precisa de una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la regulación de *TAP1* para poder considerar su aplicabilidad en el tratamiento del melanoma.

En cuanto al gen *PSMB8*, codifica para una proteína que conforma un complejo catalítico multiquinasa (210). Estudios previos han vinculado su sobreexpresión con una mayor supervivencia en melanoma, al incrementar los niveles de macrófagos M1, células T CD8+ y CD4+, y células NK en el MAT, así como al regular vías inmunes, como la de citotoxicidad celular mediada por células NK, la respuesta mediada por IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , y el procesamiento y reconocimiento antigénico (259, 260). Además, se ha postulado como un biomarcador predictivo de duración de respuesta a la inmunoterapia tras el análisis de 472 muestras de pacientes con melanoma provenientes de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Este estudio demostró que el incremento en la expresión de *PSMB8* y *PSMB9* estaba asociado no sólo a mayor respuesta, sino también a una duración más prolongada

de la respuesta al tratamiento con anti-CTLA4 (261). La evidencia en otros tumores, como el cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de mama triple negativo, también respalda su correlación con un mejor pronóstico (262, 263). Sin embargo, en otros tipos de cáncer, como el cáncer gástrico y el melanoma uveal, se ha descrito un rol protumoral que se asocia a un detrimento en la supervivencia (260, 264).

En conclusión, los genes *TAP1* y *PSMB8* muestran impactos divergentes en la respuesta y la supervivencia según el contexto tumoral, lo cual resalta la complejidad de la interacción entre los genes, el sistema inmune y el MAT. En cuanto al melanoma tratado con inmunoterapia, la evidencia disponible apoya un papel favorable de estos genes, con un incremento de respuesta al tratamiento y mayor supervivencia cuando se encuentran sobreexpresados. No obstante, es notoria la actividad protumoral de *TAP1* en el cáncer de páncreas, que favorece la resistencia al tratamiento con inhibidores de MEK. Esto podría deberse al contexto tumoral específico del cáncer de páncreas, o podría estar vinculado al mecanismo de acción de los ITK, lo que sugiere un papel predictivo de mala respuesta a estos fármacos. En relación a nuestros hallazgos, el incremento de estos genes desde el tiempo basal hasta el T1 en los pacientes respondedores podría estar asociado con una amplificación de la respuesta al tratamiento dirigido en este contexto clínico, o bien constituir un mecanismo de resistencia emergente, lo que explicaría su correlación con un detrimento en la supervivencia. Estudios adicionales en melanoma tratado con iBRAF/MEK podrían ayudar a dilucidar el rol de estos genes.

### **V.III.3 *CCL11* regulado a la baja en respuesta completa**

En cuanto al gen identificado regulado a la baja a nivel basal en pacientes con respuesta completa, *CCL11*, es importante destacar su papel en el cáncer según la

la evidencia disponible. Este gen codifica para una citoquina que se secreta durante la respuesta proinflamatoria Th2, y se encarga del reclutamiento de eosinófilos (265). Un modelo preclínico en fibrosarcoma describió un mayor crecimiento tumoral en ausencia de esta citoquina, remarcando el papel fundamental de los eosinófilos en la supresión tumoral (265). Un estudio en 59 pacientes con melanoma tratados con inmunoterapia informó una disminución de los niveles de *CCL11* en pacientes no respondedores, destacando la importancia del reclutamiento de eosinófilos en los resultados clínicos (266, 267). Esto se encuentra en concordancia con estudios en melanoma y cáncer de mama, entre otros tumores, donde se ha reportado un mejor pronóstico en pacientes con un incremento de eosinófilos en sangre (268, 269, 270).

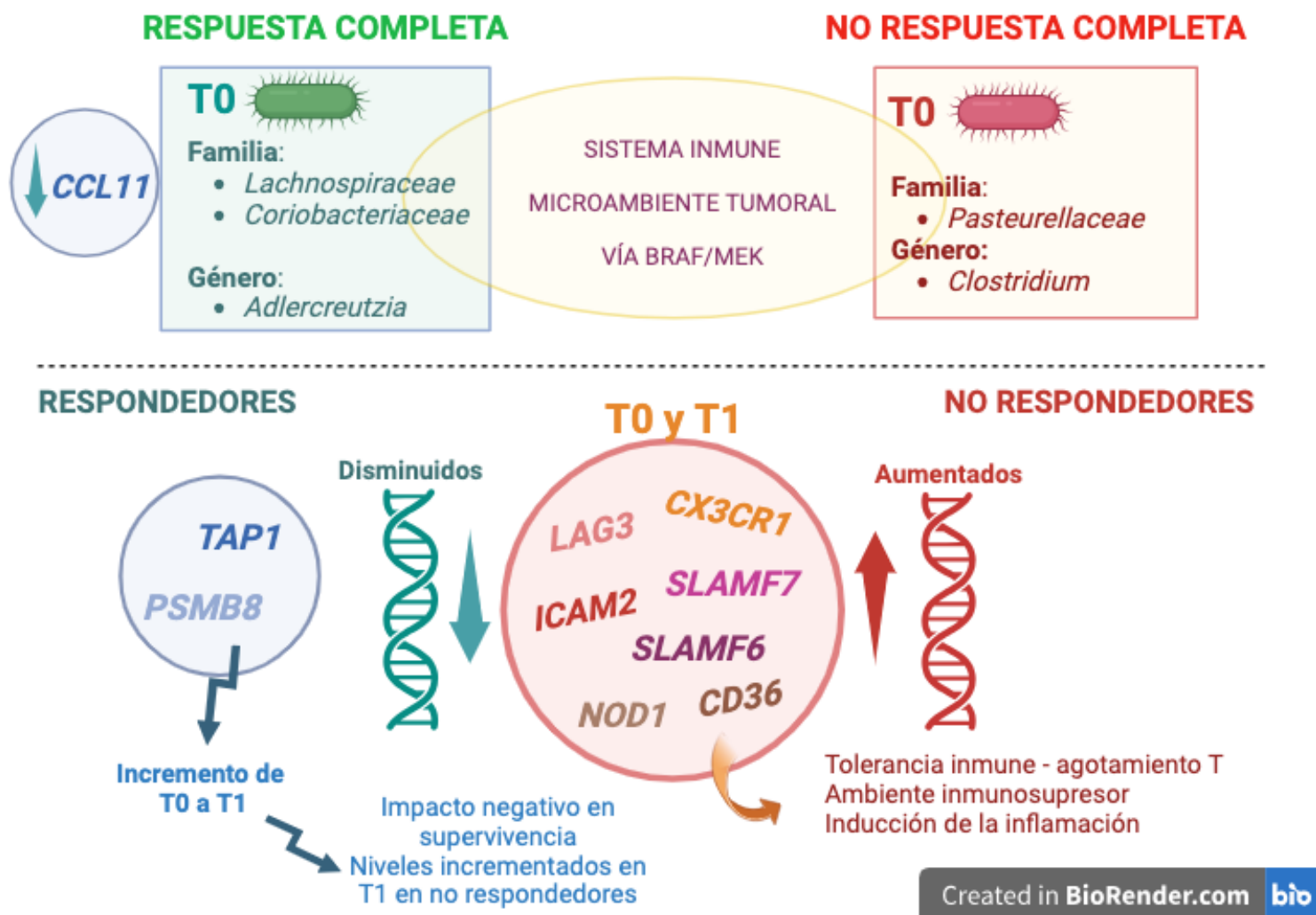
Por el contrario, está descrita la asociación de la sobreexpresión de *CCL11* con una mayor invasividad y capacidad metastásica, mediada por una activación de la vía AKT y ERK y una potenciación de la transición epitelio-mesénquima, lo que conlleva a un peor pronóstico (271, 272). Citoquinas secretadas por los eosinófilos, entre las que se incluyen TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , favorecen la angiogénesis y, en consecuencia, podrían también contribuir al crecimiento tumoral (273). De igual manera, la eosinofilia ha sido asociada a mal pronóstico en múltiples tumores como en Linfoma de Hodgkin y el mesotelioma maligno pleural (274, 275).

En resumen, el papel dual de *CCL11* en cáncer es compleja, y si bien los estudios en melanoma se orientan más por un papel antitumoral de *CCL11*, su participación en la vía ERK podría estar favoreciendo la carcinogénesis del melanoma *BRAF*-mutado, como ocurre en el cáncer de próstata o en el cáncer de pulmón no microcítico (271, 276). En consecuencia, la presencia de niveles más bajos de esta citoquina podrían contribuir a alcanzar respuesta completa en los pacientes con melanoma tratados con iBRAF/MEK, lo cual concuerda con los

hallazgos de nuestro estudio. La *Figura 31* representa un resumen de los hallazgos mencionados en cuanto a microbiota y genes de expresión inmune.

---

Los resultados de nuestro estudio remarcan la compleja interacción entre el sistema inmune, las células tumorales, y ciertas vías moleculares. La regulación a la baja de genes que están en relación con la inmunosupresión y la tolerancia inmune en pacientes respondedores sugiere la posibilidad de actuar sobre estas vías previo al tratamiento dirigido con el objetivo de inhibirlas y potenciar, de esta manera, la respuesta antitumoral. Surgen igualmente incertidumbres con respecto a la función de genes con acción antitumoral regulados al alza en no respondedores, o a la baja en respondedores, en términos de su impacto en el resultado terapéutico. Los genes protumorales presentes en respondedores podrían estar mediando el inicio de una resistencia al tratamiento, o incluso estar ejerciendo acciones que aún se desconocen en el ámbito del melanoma metastásico en tratamiento con iBRAF/MEK. En consecuencia, este complejo escenario demanda futuros análisis para dilucidar la influencia de estos genes y desarrollar estrategias que permitan actuar sobre las vías de señalización que optimicen los resultados clínicos.



**Figura 31.** Resumen de los hallazgos de nuestros análisis, donde se evidencian los microorganismos y el gen *CCL11* identificados en T0 según RC versus No-RC, y algunos de los genes identificados en respondedores (RC y RP) versus no respondedores (EE y PE). En la imagen, de acuerdo a la evidencia revisada, se aprecia la relación de la microbiota con el sistema inmune, el microambiente tumoral y, según nuestro estudio, el posible impacto en la vía BRAF/MEK. Además, en el centro de la imagen se observan los 7 genes que se mantienen persistentemente regulados a la baja en los pacientes respondedores, los cuales están relacionados principalmente con la tolerancia inmune y la promoción de un ambiente inmunosupresor. Cabe destacar también el incremento de *TAP1* y *PSMB8* en la expresión diferencial de T0 a T1 en respuesta a la terapia dirigida, que han demostrado un impacto detrimental en supervivencia.

## V.IV Correlación de la expresión génica y la microbiota con supervivencia

El análisis univariante en la cohorte de expresión génica correlacionó con una mejor SLP a los genes *SLAMF7* (HR 0.51, IC95% 0.28-0.95), *UBE2L3* (HR 0.34, IC95% 0.12-0.93) e *ITGB2* (HR 0.43, IC95% 0.19-0.96). La sobreexpresión de *SLAMF7* también se asoció a una mayor SG, con una HR de 0.49 (IC95% 0.25-0.98). Es importante destacar que tanto *SLAMF7* como *UBE2L3* se encontraban disminuidos en el tiempo basal en los pacientes respondedores y, en el caso de *SLAMF7* también en T1. Por el contrario, los niveles de *ITGB2* estaban incrementados en respondedores en el tiempo basal.

Aunque inicialmente pueda parecer contradictorio que el incremento de los niveles de *SLAMF7* se asocien a una mejor supervivencia dada su sobreexpresión en no respondedores, la evidencia sugiere un papel complejo para este gen en el contexto del cáncer. *SLAMF7* se ha descrito como promotor de la tolerancia inmune, la carcinogénesis y la resistencia a inmunoterapia (224, 225). Sin embargo, un estudio retrospectivo en cáncer de mama reportó un descenso en los niveles de *SLAMF7* en tumores de características más agresivas e invasivas, y confirmó una mejor supervivencia en pacientes que presentaban sobreexpresión de este gen (277). Otro estudio remarcó el rol inmunomodulador de *SLAMF7*, observando un descenso en el crecimiento tumoral de líneas celulares de CCR, así también como un incremento de la respuesta a la inmunoterapia con anti-PD1 en presencia de una sobreexpresión de este gen (278). Por lo tanto, si bien la evidencia enfatiza la acción de *SLAMF7* como inmunosupresor que deriva en el agotamiento de células T, está descrito su papel inmunomodulador y antitumoral, lo que podría estar favoreciendo la supervivencia en el contexto del melanoma con mutación *BRAF*.

Asimismo, el gen *UBE2L3*, que codifica para una enzima conjugadora de ubiquitina y se encarga de la progresión del ciclo celular, también se ha visto asociado a una mayor supervivencia en nuestro estudio a pesar de su sobreexpresión en no respondedores en tiempo basal. Este gen ha sido previamente identificado como marcador de mal pronóstico en varios tipos de tumores, incluyendo cáncer de cabeza y cuello, hepatocarcinoma y cáncer de pulmón (279, 280, 281). En melanoma no hay evidencia disponible que destaque el rol de *UBE2L3*, lo cual resalta la necesidad de más investigaciones en el tema para comprender su función y su implicación en la respuesta y supervivencia en este contexto.

En relación a *ITGB2*, cuyos niveles se encontraron incrementados en los pacientes respondedores, este gen que codifica a una integrina ha sido previamente asociada a un incremento en la supervivencia en melanoma. Esto parecería estar relacionado con un mayor reclutamiento de células T y la restauración de la transición mesénquima-epitelial (282). Un análisis de infiltrados inmunes en 119 muestras de melanoma también sugirió una asociación entre la sobreexpresión de *ITGB2* y el incremento de células inmunes intratumorales, incluyendo células T CD8+ y CD4+, células B CD20+, entre otras (283). Por lo tanto, el incremento de los niveles de este gen en pacientes respondedores, que se correlacionan con una mejor supervivencia, y considerando el papel antitumoral sugerido por la limitada evidencia disponible, *ITGB2* representa un posible biomarcador pronóstico, a considerar como diana terapéutica.

En el análisis univariante de la cohorte por protocolo de microbiota en relación a supervivencia no se observaron resultados significativos de los microorganismos asociados a RC y No-RC. En cuanto a los genes incluidos, se observó un impacto

significativo en detrimento de la SG de los genes *TAP1*, con un HR de 4.09 (IC95%1.06-15.81), y *PSMB8*, con un HR de 11.60 (IC95% 1.40-96.04). Asimismo, *PSMB8* se correlacionó negativamente con la SLP, con un HR de 7.19 (IC95% 1.17-43.93). El análisis multivariante confirmó que la sobreexpresión de *PSMB8* en T1 representa un factor independiente que impacta negativamente la SLP, con un HR de 8.23 (IC95% 1.05-74.32,  $p=0.045$ ). Estos resultados generan incertidumbre en el papel de estos genes en el melanoma tratado con iBRAF/MEK.

El análisis de expresión diferencial entre el tiempo basal y T1, demostró un aumento de los niveles de *TAP1* y *PSMB8* en los pacientes respondedores. Sin embargo, los niveles de ambos genes en T1 eran superiores en los no respondedores, a pesar del incremento observado de T0 a T1 en respondedores. En consecuencia, a pesar de que en melanoma la sobreexpresión de estos genes suele estar asociada a un mejor pronóstico y a una respuesta más eficaz y duradera, en el contexto del tratamiento con iBRAF/MEK podría ser contraria. Es evidente que el aumento de estos genes en respondedores durante el tratamiento nos induzca a considerar que podrían estar potenciando la respuesta al tratamiento, o actuando como biomarcadores de beneficio clínico. Sin embargo, los niveles comparativamente incrementados en T1 en los no respondedores respecto a los respondedores, junto con el impacto negativo en supervivencia estadísticamente significativo, plantean interrogantes sobre el papel que podrían tener en la resistencia al tratamiento con iBRAF/MEK. Resulta crucial remarcar que, como ya se ha mencionado previamente, *TAP1* se ha asociado a resistencia a inhibidores de MEK en cáncer de páncreas, lo cual orienta a una posible interpretación de resultados en melanoma, reforzando su papel predictivo en la terapia con iBRAF/MEK. Nuestros hallazgos permiten, en estas circunstancias, generar hipótesis que

orienten investigaciones futuras para determinar la actividad de estos genes en pacientes tratados con ITK.

## **V.V Correlación de variables clínicas con supervivencia**

El análisis de supervivencia con Log-rank confirmó una peor SLP y SG en pacientes con progresión extrapulmonar y en SNC. Este hallazgo se encuentra en línea con la evidencia previa, que destaca una menor supervivencia en estos casos. La presencia de metástasis en el SNC constituye una de las principales causas de muerte en melanoma, y a pesar de que la inmunoterapia ha mejorado el pronóstico, éste sigue siendo sombrío (284, 285). En cuanto a la progresión extrapulmonar, particularmente la presencia de metástasis hepáticas, se ha asociado a una disminución en la supervivencia en comparación con las metástasis ganglionares o pulmonares (286). Un estudio con 1924 pacientes con melanoma reveló que aquellos con metástasis en hueso, hígado y SNC tenían una menor supervivencia en comparación con aquellos que tenían metástasis subcutáneas, ganglionares, pulmonares o en tejidos blandos. Además, al analizar las muestras de tejido, se observó una menor infiltración de células T y una menor expresión de PD-L1 intratumoral, lo que conduce a una resistencia a la inmunoterapia y a peores resultados clínicos (287, 288).

En el análisis univariante de variables clínicas no se observó ninguna otra variable que impactara significativamente en la supervivencia. Para el análisis multivariante combinado con variables clínicas, microbiota y genes, se seleccionaron los microorganismos asociados a respuesta completa a los iBRAF/MEK, el uso de antibioterapia durante la terapia dirigida y los dos genes que han

aumentado en respondedores durante el tratamiento: *PSMB8* y *TAP1*, por su impacto en SG en el análisis univariante. Dada la limitada muestra de nuestro estudio, nos vimos restringidos en la cantidad de variables a considerar simultáneamente en el modelo estadístico. Agregar demasiadas variables en muestras pequeñas puede resultar en una estimación inestable de los parámetros y comprometer la validez de los resultados.

El objetivo del análisis multivariante era identificar variables independientes que impactaran supervivencia, pero sólo los valores de *PSMB8* alcanzaron la significancia estadística en el análisis de SLP. Al seleccionar las variables se incluyó el uso de antibióticos, tras revisar la evidencia que lo asocia a un impacto negativo en la homeostasis microbiana. Estos fármacos parecerían modificar hasta el 30% de las especies de la microbiota intestinal, lo que puede afectar no sólo la eficacia de los tratamientos oncológicos, sino también la incidencia de efectos adversos y la supervivencia (132, 289). Un ejemplo de esto es la reducción de la eficacia del tratamiento con Cisplatino y Ciclofosfamida, o el detrimento en la supervivencia en pacientes con melanoma y cáncer de pulmón tratados con inhibidores de EGFR, tras el uso de antibioterapia (97, 157). La literatura también resalta el impacto negativo de la antibioterapia en SG y SLP en pacientes con varios tipos de tumores tratados con ICI (290, 291). Sin embargo, es importante considerar varios factores. Los antibióticos, además de su asociación con la presencia de disbiosis, pueden interaccionar con los ITKs u otros fármacos, al metabolizarse por los citocromos. Además, la necesidad de antibioterapia debido a una infección puede resultar en un detrimento en la supervivencia, no sólo por la disbiosis causante, sino también debido a la infección concomitante en el contexto inflamatorio y de inmunosupresión del cáncer. Por lo tanto, el análisis de la evidencia publicada debe hacerse con

cautela, y no atribuir la disminución de la supervivencia a la disbiosis ocasionada por el uso de antibióticos sin considerar el resto de factores.

En cuanto a las otras variables incluidas en el modelo multivariante, se ha seleccionado a *Lachnospiraceae* dada la evidencia que respalda a esta familia en particular, y al filo Firmicutes, en relación a respuesta al tratamiento. El rol de *TAP1* y *PSMB8* ya se ha mencionado en el apartado previo. La presencia de *PSMB8* como único factor independiente que impacta SLP puede estar asociado al limitado tamaño muestral, que dificulta el poder estadístico.

En resumen, la evidencia disponible remarca la importancia de seguir explorando estos aspectos en estudios futuros para conocer el impacto de la microbiota, la antibioterapia y los genes de expresión inmune en la supervivencia de pacientes con melanoma tratados con terapia dirigida.

## **V.VI Correlación de la composición de la microbiota y variables clínicas en relación a la aparición de toxicidad a terapia dirigida**

Los resultados obtenidos en cuanto a la composición de la microbiota en pacientes con una toxicidad moderada-severa, es decir mayor o igual a un grado 2, son difíciles de correlacionar con la evidencia disponible. Los estudios se focalizan en los efectos adversos inmunomediados secundarios a ICI y, considerando que el mecanismo de acción por el cual se desencadenan estas toxicidades es distinto al de iBRAF/MEK, el análisis debe realizarse con precaución.

El género *Oscillospira*, enriquecido en pacientes con toxicidad moderada-severa, se ha descrito disminuido en pacientes con obesidad, enfermedad

inflamatoria intestinal, y cáncer de pulmón. En consecuencia, se ha propuesto como un potencial probiótico debido a su asociación a un estado antiinflamatorio (292). Esto se atribuye fundamentalmente a su capacidad para secretar ácidos grasos de cadena corta y butirato. Se ha observado que el butirato estimula a las células Treg y suprime la secreción de citoquinas proinflamatorias, lo que promueve la proliferación, diferenciación y apoptosis celular normal (293). Además, este microorganismo puede alterarse en respuesta a fármacos, como la hidroxicloroquina, así como a cambios en la dieta y el ejercicio (294). Considerando niveles taxonómicos superiores de *Oscillospira*, que pertenece al filo Firmicutes, estudios previos asocian la presencia de estos microorganismos a una mayor incidencia de efectos adversos inmunomediados (139, 295).

Esta aparente contradicción plantea interrogantes, ya que Firmicutes se ha relacionado con una mayor incidencia de efectos adversos y *Oscillospira* con propiedades antiinflamatorias. Por lo tanto, podría ser que la presencia de *Oscillospira* sea el resultado de la activación del sistema inmunológico por la administración de iBRAF/MEK, un factor contribuyente a la aparición de efectos adversos, o incluso un atenuante del efecto adverso desencadenado. Se requiere de investigación adicional para esclarecer la compleja interacción entre este microorganismo, los iBRAF/MEK y la ocurrencia de efectos adversos.

En cuanto a los microorganismos identificados en los pacientes sin toxicidad/toxicidad grado 1 relacionada al tratamiento, se han identificado las familias *Lachnospiraceae*, *Leuconostocaceae* y *Oxalobacteraceae*, y el género *Gemmiger*. El género *Gemmiger* y la familia *Lachnospiraceae*, asociados en estudios previos a una mayor toxicidad por inmunoterapia, en nuestro estudio se han visto enriquecidos en los pacientes sin toxicidad o de grado 1 (139, 295, 296). Ambos

microorganismos pertenecen al filo Firmicutes, lo cual se asocia a una mejor respuesta a inmunoterapia, y está en concordancia con lo expuesto previamente de que a, mayor toxicidad inmunorrelacionada, mayor respuesta al tratamiento. En cambio, la presencia de estas bacterias en el contexto del melanoma tratado con inhibidores BRAF/MEK se desconoce. En cuanto a la familia *Leuconostocaceae*, ésta pertenece al orden Lactobacillales y se encuentra en productos lácteos y otros alimentos, donde han demostrado tener una función reconocida como probióticos y moduladores del sistema inmune (297, 298, 299). La evidencia destaca principalmente la función antiinflamatoria de las especies pertenecientes a la familia *Leuconostocaceae*, ya que inhiben la vía NF-KB y regulan la vía de las MAPK, lo que a su vez facilita la apoptosis de las células de CCR (300, 301). Por último, la familia *Oxalobacteraceae*, también enriquecida en nuestro estudio en los pacientes que no presentaron toxicidad, se ha relacionado previamente con un mayor riesgo de cáncer de esófago y se vio enriquecida en estadios II y III de CCR (302, 303). Además, un estudio en colangiocarcinoma observó una abundancia de *Oxalobacteraceae* en el tejido tumoral, lo que sugiere un posible papel carcinogénico de esta familia bacteriana (304). A día de hoy no existe evidencia acerca de sus propiedades antiinflamatorias, por lo tanto su papel específico en la modulación del sistema inmune y su impacto en los pacientes que no presentan toxicidad aún no están claros.

Resulta crucial destacar la acción antiinflamatoria conocida del ácido butírico, secretado por las familias *Lachnospiraceae* y *Leuconostocaceae*, y por el género *Gemmiger*, que podría estar contribuyendo a la disminución de los efectos adversos en este subgrupo de pacientes (305, 306, 307). Los ácidos grasos de cadena corta, incluido el butirato, pueden inhibir la secreción de citoquinas proinflamatorias, como

el TNF $\alpha$  y la IL-6, y la vía NF $\kappa$ B, razón por la cual se han propuesto como estrategia terapéutica para reducir la inflamación inducida por radioterapia o por la enfermedad de Crohn (308, 309). Por lo tanto, estos microorganismos productores de butirato y otros metabolitos podrían estar actuando como moduladores del sistema inmune, ocasionando una disminución de la inflamación sistémica y, en consecuencia, menor incidencia y repercusión de efectos adversos relacionados con el tratamiento.

En cuanto al análisis de las variables clínicas, donde se correlacionaron los efectos adversos con la respuesta mediante un *likelihood ratio test*, destaca un aumento de astenia en el subgrupo de respondedores (RC y RP). Al correlacionar la astenia con los niveles de *Oscillospira* para determinar si estaban incrementados en pacientes con astenia y por lo tanto, indirectamente, en los pacientes respondedores, no se encontró una asociación significativa. La asociación entre este efecto adverso, la microbiota intestinal, y la activación del sistema inmune no se conoce con certeza, sobre todo dado que la astenia constituye un síntoma subjetivo que puede estar relacionado no sólo con el tratamiento, sino con la enfermedad subyacente u otros procesos intercurrentes (310). Si bien la evidencia que relaciona la astenia con la presencia de diversos microorganismos es escasa, ésta respalda principalmente su asociación con una mayor inflamación y un peor pronóstico, a diferencia de los resultados de nuestro estudio, donde los pacientes respondedores eran los que presentaban este síntoma (311). Resulta crucial destacar que el género *Oscillospira* se encontró enriquecida en pacientes con efectos adversos relacionados con el tratamiento de al menos grado 2, y 77.8% (n=7) de los pacientes que presentaron astenia, que a su vez eran respondedores, tenían un grado 1 según CTCAE v5.0. En consecuencia, la ausencia de correlación entre la microbiota identificada y la astenia puede deberse a las diferencias en el

grado de toxicidad experimentada por estos pacientes, o incluso a factores más complejos en la interacción microbiota - sistema inmune - huésped.

Un estudio sugirió una posible correlación entre la composición de la microbiota y la aparición de astenia en pacientes con cáncer, atribuyendo este fenómeno a una mayor prevalencia de la Proteobacteria *Cosenzaea myxofaciens*, la cual podría promover un ambiente proinflamatorio, respaldando la evidencia previa que la vincula con predisposición a infecciones (312). En pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón metastásico sometidos a tratamiento en primera línea, se observó también un enriquecimiento de bacterias del filo Proteobacteria, específicamente de la familia *Enterobacteriaceae* y el género *Escherichia-Shigella*, en aquellos con astenia severa (313). Además, en pacientes con cáncer rectal tratados con quimiorradioterapia se evidenció un incremento de *Streptococcus*, del filo Firmicutes, y *Actinomyces*, del filo Actinobacteria, microorganismos previamente vinculados a enfermedades inflamatorias como la colitis ulcerosa (314). Por otro lado, pacientes diagnosticados de carcinoma escamoso de cabeza y cuello con astenia severa mostraron un aumento de bacterias del orden Clostridiales relacionadas con la inflamación, incluyendo el género *Family XIII AD3011*, *Clostridium ramosum* y *Eubacterium fissicatena* (315). Estos hallazgos sugieren que la presencia de determinados microorganismos, como las Proteobacterias o los Clostridiales, podrían potenciar el entorno inflamatorio desencadenando una mayor astenia. Nuestro estudio no ha encontrado asociación entre la presencia de astenia y *Oscillospira*, pero sí se observó una correlación entre este efecto adverso y la respuesta. Se requiere una mayor investigación en el tema para esclarecer las posibles conexiones.

## V.VII Hipótesis de selección de mejores candidatos a terapia dirigida

El uso de la terapia dirigida en primera línea metastásica se utiliza, a día de hoy, en una minoría de pacientes, dada la eficacia de la inmunoterapia en primera línea, además de los resultados de los ensayos clínicos DREAMseq y SECOMBIT (37, 38). Los resultados publicados recientemente demostraron que la inmunoterapia con nivolumab e ipilimumab, seguido de terapia dirigida con iBRAF/MEK a la progresión, representa la mejor secuencia de tratamiento para la gran mayoría de los pacientes. Nuestro estudio se inició previo a conocer estos resultados, razón por la cual todos los pacientes iniciaron iBRAF/MEK en primera línea y no se han incluido pacientes en segunda línea o subsiguiente. Sin embargo, a día de hoy, la terapia dirigida continúa siendo de elección en aquellos pacientes *BRAF*-mutado con enfermedad rápidamente progresiva o con riesgo para la vida, dada su rapidez de respuesta, o en pacientes con contraindicación a la inmunoterapia. Asimismo, resulta de importancia destacar que el 80% de los pacientes con RC habían recibido previamente inmunoterapia como tratamiento adyuvante, generando la incertidumbre de si este tratamiento previo pudo haber impactado en la presencia de la microbiota de estos pacientes y, en consecuencia, en la respuesta observada con la terapia dirigida.

Los resultados de este estudio no sólo permiten seleccionar a los mejores candidatos a terapia dirigida, sino que también orientan a desarrollar estrategias que pueden optimizar los resultados. Por ejemplo, la intervención de la microbiota intestinal mediante probióticos o el TMF con *Lachnospiraceae* o Actinobacterias, microorganismos que se encontraron aumentados en pacientes con respuesta completa, son estrategias prometedoras que podrían favorecer la respuesta al

tratamiento. Otra opción a considerar sería la medición de ciertos genes de respuesta inmune previo al tratamiento para poder identificar a los que podrían beneficiarse de los iBRAF/MEK, o en caso contrario, planificar un abordaje más agresivo o plantear otra estrategia terapéutica. La evidencia científica destaca, a su vez, el papel pronóstico de los parámetros analíticos como el NLR o el dNLR, además de la LDH, si bien no han aportado datos significativos en nuestro estudio. Dada la facilidad para su obtención mediante el análisis de sangre de rutina, serían un complemento valioso en la evaluación pretratamiento. Estos biomarcadores aportan información clave sobre la actividad del sistema inmunitario y el estado inflamatorio del paciente.

Además, resulta de importancia destacar que la estratificación de nuestro estudio, basada en la presencia o no de respuesta completa, representa una estrategia de crucial interés en pacientes tratados con inhibidores de BRAF/MEK. Estudios previos han destacado el aumento de supervivencia de los pacientes con melanoma que alcanzan respuesta completa con la terapia dirigida, con un 49% de los pacientes sin progresión a 5 años en comparación con 16% y 1% en pacientes con respuesta parcial y enfermedad estable, respectivamente (316). Por lo tanto, la identificación de microorganismos y genes que optimicen esta respuesta, buscando alcanzar la máxima respuesta posible, constituye una estrategia que podría impactar en la supervivencia de estos pacientes. Sin embargo, es esencial resaltar que el uso de la terapia dirigida en segunda línea o subsiguientes, tras la inmunoterapia, probablemente modificaría la microbiota y los genes de expresión inmune identificados en nuestro estudio, dificultando la aplicabilidad de nuestros hallazgos.

Otro punto a considerar es que la microbiota asociada a RC en nuestro estudio coincide con la observada en pacientes con MM en respuesta a inmunoterapia.

Asimismo, los genes de respuesta inmune identificados también se han asociado a supervivencia en múltiples escenarios. Estos resultados sugieren un papel pronóstico más que predictivo de las firmas microbiana y génica identificadas. Sin embargo, estudios adicionales podrían esclarecer si estos microorganismos y genes pueden actuar como biomarcadores predictivos de la respuesta a la terapia dirigida con iBRAF/MEK. Esto resultaría de especial relevancia en escenarios de:

- Resistencia primaria: Identificar aquellos pacientes con una microbiota o un perfil de genes basal desfavorable para la respuesta a iBRAF/MEK podría evitar la exposición innecesaria a estos fármacos. No obstante, la modulación de la microbiota con técnicas como el TMF o la ingesta de probióticos podría ayudar a revertir esta resistencia.
- Resistencia secundaria: La monitorización de la microbiota y los genes de expresión inmune durante el tratamiento con terapia dirigida podría identificar cambios asociados a la adquisición de resistencia a los iBRAF/MEK, permitiendo un cambio de estrategia hacia el uso de inmunoterapia o la modulación de la microbiota para mantener el control de la enfermedad.
- Sensibilidad aumentada: Un perfil microbiano o génico que prediga una sensibilidad incrementada a la terapia dirigida podría ser de utilidad en algunos pacientes.

En resumen, tanto la modulación de la microbiota como la evaluación de genes relacionados con la inmunidad emergen como herramientas clave en el desarrollo de la medicina de precisión. En este contexto, la personalización de las estrategias terapéuticas permite mejorar los resultados e incluso la calidad de vida de los pacientes, con estrategias adaptadas y centradas en el individuo.



# VI. CONCLUSIONES

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## VI. CONCLUSIONES

1. La microbiota intestinal previo al inicio del tratamiento en primera línea con inhibidores de BRAF/MEK en pacientes con melanoma irresecable/metastásico *BRAF* V600 mutado tiene potencial valor pronóstico, dado que coincide con los resultados observados en pacientes con melanoma tratados con inmunoterapia. La “firma microbiana” asociada a respuesta completa y con un potencial impacto en supervivencia estaría basada en los filos Firmicutes - familia *Lachnospiraceae* - y Actinobacteria - familia *Coriobacteriaceae* y género *Adlercreutzia* -.

2. La sobreexpresión de genes asociados a inmunosupresión y tolerancia inmune antes y durante el tratamiento con inhibidores de BRAF/MEK, incluidos *LAG3*, *CD36*, *NOD1*, *SLAMF6*, *CX3CR1* e *ICAM2*, podrían ser predictivos de una peor respuesta y progresión de la enfermedad.

3. Los genes *TAP1* y *PSMB8* se asocian a un peor pronóstico con un detrimento de la supervivencia, destacando *PSMB8* como variable independiente que impacta en supervivencia libre de progresión en el análisis multivariante. Los niveles de estos genes son superiores en no respondedores durante la terapia dirigida, pero se ve un incremento progresivo en los pacientes respondedores. Esto podría indicar un potencial mecanismo de resistencia a los inhibidores BRAF/MEK.

4. Si bien los genes *SLAMF7* y *UBE2L3*, regulados al alza en no respondedores, y con un aparente papel de tolerancia inmune, fueron asociados a una mayor supervivencia en el análisis univariante, se precisan de estudios más amplios para comprender su función en el melanoma irresecable/metastásico.

5. La sobreexpresión del gen *ITGB2*, incrementado en respondedores y asociado al reclutamiento de células T y a la restauración de la transición mesénquima-epitelial, podría ser un biomarcador pronóstico prometedor en melanoma irreseccable o metastásico.

6. El gen *CCL11*, disminuido en pacientes que alcanzan respuesta completa, parece tener un rol en la activación de la vía de las MAPK, como se ha descrito en cáncer de pulmón y de próstata. Si se confirmaran estos hallazgos, sería una diana terapéutica interesante en pacientes con melanoma *BRAF* mutado.

7. La microbiota intestinal parecería correlacionarse con la presencia de toxicidad moderada-severa a la terapia dirigida. La presencia de microorganismos secretores de butirato y asociados a propiedades antiinflamatorias, como *Lachnospiraceae*, *Leuconostocaceae* y *Gemmiger*, podrían contribuir a una menor incidencia de efectos adversos relacionados con el tratamiento con inhibidores BRAF/MEK.

8. Hasta la publicación de esta tesis doctoral, no existía evidencia publicada acerca del impacto de la composición de la microbiota intestinal y la expresión de genes inmunes en pacientes con melanoma irreseccable o metastásico tratados con inhibidores de BRAF/MEK en primera línea. Los hallazgos de este estudio son generadores de hipótesis. La posible aplicabilidad clínica precisa de investigaciones futuras con un mayor número de pacientes, que permita corroborar nuestros resultados.

## VI. CONCLUSIONS

1. Gut microbiota composition before first-line treatment with BRAF/MEK inhibitors in patients with *BRAF* V600-mutated unresectable or metastatic melanoma has a potential prognostic role, due to its concordance with previous evidence in melanoma treated with immunotherapy. The “microbial signature” associated with complete response and potentially impacting survival is characterized by the presence of Firmicutes phylum, particularly family *Lachnospiraceae*, as well as Actinobacteria phylum, including family *Coriobacteriaceae* and genus *Adlercreutzia*.

2. The overexpression of genes previously associated with immunosuppression and immune tolerance, both prior and during treatment with BRAF/MEK inhibitors, including *LAG3*, *CD36*, *NOD1*, *SLAMF6*, *CX3CR1* and *ICAM2*, could predict an unfavourable response and disease progression.

3. Genes *TAP1* y *PSMB8* are associated with worse prognosis and survival, with *PSMB8* as an independent variable that impacts progression-free survival in the multivariate analysis. Levels of these genes are higher in non-responders during targeted therapy. However, increasing levels are observed in responders, suggesting the development of resistance mechanisms to BRAF/MEK inhibitors.

4. Genes *SLAMF7* y *UBE2L3*, overexpressed in non-responders and previously linked to immune tolerance, were associated with increased survival in univariate analysis. Further research in larger cohorts is needed in order to understand their role in unresectable or metastatic melanoma.

5. The overexpression of gene *ITGB2* in responders, associated with T-cell recruitment and restoration of mesenchymal-epithelial transition, could represent a promising prognostic biomarker in unresectable or metastatic melanoma.

6. In our study, complete responders exhibited a downregulation of gene *CCL11*, previously correlated to MAPK pathway activation in lung and prostate cancer. If our findings are confirmed in future studies, it would represent an interesting target in *BRAF*-mutated melanoma patients.

7. Gut microbiota may correlate with the presence of moderate-to-severe treatment related adverse events in patients treated with BRAF/MEK inhibitors. Microorganisms that secrete butyric acid and that are associated with antiinflammatory properties, such as *Lachnospiraceae*, *Leuconostocaceae* and *Gemmiger*, could contribute to a lower incidence of treatment-related adverse events.

8. Until the publication of this doctoral thesis, there was no published evidence regarding the impact of gut microbiota composition and immune-related gene expression in patients with unresectable or metastatic melanoma treated with BRAF/MEK inhibitors in first-line. The findings of our study generate hypotheses. The potential applicability of these results requires further research with a larger number of patients.

# ANEXO I

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## CONSENTIMIENTO INFORMADO – INFORMACIÓN AL PACIENTE

### Título del proyecto:

Estudio de marcadores predictivos y pronósticos del microbioma en pacientes con melanoma irreseccable o metastásico con mutación BRAF V600, tratados con terapia dirigida.

### Investigador principal:

Miguel A. Berciano Guerrero

### Centro responsable:

- Instituto de investigación biomédica de Málaga (IBIMA)  
- Unidad de Gestión Clínica Intercentros de Oncología Médica (Hospitales Universitarios Regional y Virgen de la Victoria de Málaga)

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

### Naturaleza:

Quisiéramos solicitar su colaboración para participar en un proyecto de investigación cuyo objetivo son identificar cambios en marcadores inmunológicos tras la administración de terapia dirigida (inhibidores de BRAF en pacientes con mutación de BRAF) que son capaces de reinducir un buen estado inmunológico, así como identificar marcadores precoces de predicción respuesta para identificar largos supervivientes tras tratamiento con terapia dirigida, e identificar marcadores inmunológicos pronósticos de melanoma metastásico. Para ello, vamos a pedir la participación de pacientes a las que se les ha diagnosticado melanoma metastásico de estas características y en las que se realice algún tipo de actividad asistencial en relación con su tumor en alguno de los centros participantes.

Antes de nada, definir el concepto de microbiota: conjunto de microorganismos que habitan de forma habitual en cualquier parte de nuestro cuerpo. En concreto, nos centraremos en microbiota intestinal (la más importante y estudiada), microbiota cutánea y microbiota tumoral.

Para la realización de este proyecto, se utilizará una muestra sanguínea, un frotis cutáneo, una muestra de sus heces y parte de la muestra resultante de la biopsia o cirugía que se ha realizado previamente para el diagnóstico, tras la aceptación y firma del consentimiento informado. En ningún momento la obtención de muestras interferirá con el proceso diagnóstico de la enfermedad. En un pequeño porcentaje de pacientes la muestra sanguínea, la cutánea y la de heces se repetirá, a fin de conocer la evolución de la microbiota y sus alteraciones sanguíneas concurrentes.

Los datos de la historia clínica que se recogerán serán datos sociodemográficos básicos, como la edad y sexo, así como del estadio de la enfermedad tumoral y otras importantes características de su enfermedad. El equipo investigador garantiza que en todo momento se aplicaran las leyes y normativas referentes a los aspectos éticos y de protección de datos de carácter personal.

El paciente podrá solicitar la retirada y destrucción de sus muestras así como la revocación del consentimiento mediante solicitud al médico investigador clínico que le está tratando, en cuyo caso, el equipo investigador se compromete a la destrucción de las mismas.

Todos los datos (personales, clínicos, económicos y datos que procedan de la muestra de sangre o diferente microbiota) serán tratados de acuerdo con la "directiva de la protección de los sujetos con respecto al procesamiento de los datos personales" y la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de "protección de datos de carácter personal". Para ello, todos los datos que puedan identificar al participante se mantendrán separados del resto de la información recogida en los diferentes cuestionarios del estudio y cada caso figurará en las bases de datos con un nº de identificación (código) que se le asignará en riguroso orden de inclusión en el estudio. Los datos personales se desvincularán de los datos clínicos y moleculares durante el estudio (Ley 41/2002 de 14 de noviembre; Ley 15/1999 de 15 de diciembre), no teniendo acceso ningún miembro del laboratorio a la identificación de la persona física de la que procede la muestra.

Los potenciales resultados de esta investigación no tendrán efecto directo sobre el tratamiento o seguimiento del paciente, y los resultados de los análisis realizados no determinarán su terapia.

Este proyecto de investigación no tiene ánimo de lucro y ningún participante será recompensado económicamente por su inclusión en el mismo.

**Importancia:**

Hay tratamientos que sólo se pueden aplicar en función del perfil mutacional del tumor. Sin embargo, este perfil puede ir cambiando a lo largo de la evolución del tumor y también entre las diferentes metástasis, lo que puede llevar a que la aplicación de estos fármacos no sea efectiva. El conocimiento de estas modificaciones en el perfil mutacional y por lo tanto de nuevos mecanismos de resistencia, puede generar hipótesis para mejorar la eficacia de estos tratamientos biológicos y, por tanto, plenamente aplicable a la práctica asistencial del tratamiento sistémico del melanoma metastásico. La identificación de pacientes que grandes respondedores y de aquellos que no respondan, con respecto a los cambios de expresión génica y su microbiota, puede ser muy importante para el futuro de la oncología.

**Implicaciones para el donante/paciente:**

- La donación/participación es totalmente voluntaria.
- El donante/paciente puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La donación/información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.

**Riesgos de la investigación para el donante/paciente:**

No existe ningún riesgo para el paciente asociado al uso de estas muestras.  
Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal (el investigador principal Dr. Berciano) en el teléfono: 951291523 o 951291425.

**CONSENTIMIENTO INFORMADO – CONSENTIMIENTO POR ESCRITO DEL PACIENTE**

**Estudio de marcadores predictivos y pronósticos del microbioma en pacientes con melanoma irreseccable o metastásico con mutación BRAF V600, tratados con terapia dirigida.**

Yo (Nombre y Apellidos): .....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento (Información al Paciente)
- He podido hacer preguntas sobre el estudio en cuestión.
- He hablado con el profesional sanitario informador:.....
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la donación/información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- Deseo ser informado/a de mis datos genéticos y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si                      No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto titulado “Estudio de marcadores predictivos y pronósticos del microbioma en pacientes con melanoma irreseccable o metastásico con mutación BRAF V600, tratados con terapia dirigida”.

Firma del paciente  
(o representante legal en su caso)  
Nombre y apellidos:.....  
Fecha: .....

Firma del profesional  
sanitario informador  
Nombre y apellidos: .....  
Fecha: .....

**Figura S1.** Modelo de consentimiento informado escrito utilizado para este proyecto.



**Tabla S1.** Likelihood ratio test (LRT) en variables clínicas, analíticas y toxicidad al tratamiento para evaluar diferencias entre cohorte respondedora y no respondedora. Se evidencian diferencias significativas en la presencia de ASTENIA como toxicidad al tratamiento entre ambos subgrupos. Pct NA: porcentaje datos faltantes.

Variables clínicas	Grupos	N=26	Porcentaje NA	No respondedor (N=6)	Respondedor (N=20)	LRT-Respuesta		
<b>Sexo</b>	Femenino	13 (50 %)	0 (0 %)	3 (50 %)	10 (50 %)	1		
	Masculino	13 (50 %)		3 (50 %)	10 (50 %)			
<b>Edad</b>		54.5 (23-80)	0 (0 %)	55.5 (38-76)	54 (23-80)	0.9090		
	ECOG	1 (0-2)	0 (0 %)	0 (0-2)	1 (0-2)			
<b>Localización primario</b>	Cráneo	1 (3.85 %)	0 (0 %)	1 (16.67 %)	0 (0 %)	0.4774		
	Desconocido	3 (11.54 %)		0 (0 %)	3 (15 %)			
	Dorsal	11 (42.31 %)		3 (50 %)	8 (40 %)			
	Lumbar	1 (3.85 %)		0 (0 %)	1 (5 %)			
	MID	2 (7.69 %)		0 (0 %)	2 (10 %)			
	MII	3 (11.54 %)		1 (16.67 %)	2 (10 %)			
	Preauricular	1 (3.85 %)		0 (0 %)	1 (5 %)			
	Tórax	1 (3.85 %)		0 (0 %)	1 (5 %)			
	Tórax	3 (11.54 %)	0 (0 %)	1 (16.67 %)	2 (10 %)		0.1938	
	<b>Resección primario</b>	No	3 (11.54 %)		0 (0 %)		3 (15 %)	0.8773
		Si	23 (88.46 %)		6 (100 %)		17 (85 %)	
	<b>Adyuvancia</b>	No	18 (69.23 %)		4 (66.67 %)		14 (70 %)	0.6112
Si		8 (30.77 %)		2 (33.33 %)	6 (30 %)			
<b>Meses adyuvancia</b>		0 (0-12)	0 (0 %)	0 (0-5)	0 (0-12)	0.7294		
	Irresecable	0 (0 %)	0 (0 %)					
<b>Lugar metástasis</b>	M1a	6 (23.08 %)		2 (33.33 %)	4 (20 %)	0.6112		
	M1b	4 (15.38 %)		1 (16.67 %)	3 (15 %)			
	M1c	7 (26.92 %)		2 (33.33 %)	5 (25 %)			
	M1d	9 (34.62 %)		1 (16.67 %)	8 (40 %)			

Variables clínicas

	Grupos	N=26	Pct NA	No respondedor (N=6)	Respondedor (N=20)	LRT-Respuesta
<b>Tratamiento</b>	Dabra-Trame	21 (80.77 %)	0 (0 %)	6 (100 %)	15 (75 %)	0.0852
	Encora-Bini	5 (19.23 %)		0 (0 %)	5 (25 %)	
<b>Antibióticos 30 días previo tratamiento</b>	no	23 (88.46 %)	0 (0 %)	6 (100 %)	17 (85 %)	0.1938
	si	3 (11.54 %)		0 (0 %)	3 (15 %)	
<b>Antibióticos durante tratamiento</b>	no	11 (42.31 %)	0 (0 %)	3 (50 %)	8 (40 %)	0.6649
	si	15 (57.69 %)		3 (50 %)	12 (60 %)	
<b>Corticoides 30 días antes tratamiento</b>	no	17 (65.38 %)	0 (0 %)	5 (83.33 %)	12 (60 %)	0.2704
	si	9 (34.62 %)		1 (16.67 %)	8 (40 %)	
<b>Corticoides durante tratamiento</b>	no	8 (30.77 %)	0 (0 %)	2 (33.33 %)	6 (30 %)	0.8773
	si	18 (69.23 %)		4 (66.67 %)	14 (70 %)	
<b>ReduccionDosis</b>	No	16 (61.54 %)	0 (0 %)	2 (33.33 %)	14 (70 %)	0.1087
	Si	10 (38.46 %)		4 (66.67 %)	6 (30 %)	
<b>SuspensionTto</b>	No	12 (46.15 %)	0 (0 %)	2 (33.33 %)	10 (50 %)	0.4685
	Si	14 (53.85 %)		4 (66.67 %)	10 (50 %)	
<b>Exitus</b>	No	17 (65.38 %)	0 (0 %)	3 (50 %)	14 (70 %)	0.3743
	Si	9 (34.62 %)		3 (50 %)	6 (30 %)	

VARIABLES ANALÍTICAS	GRUPOS	N=26	PCT NA	NO RESPONDEDOR (N=6)	RESPONDEDOR (N=20)	LRT-RESPUESTA
Albumina		3.84 (2.8-4.7)	0 (0 %)	3.66 (2.93-4.3)	3.88 (2.8-4.7)	0.4868
	Hb	14.1 (10.1-18.1)	0 (0 %)	13.1 (11.6-17)	14.5 (10.1-18.1)	0.4839
Anemia	no	24 (92.31 %)	0 (0 %)	5 (83.33 %)	19 (95 %)	0.3851
	si	2 (7.69 %)	0 (0 %)	1 (16.67 %)	1 (5 %)	
Leucocitos		7485 (3450-19300)	0 (0 %)	7130 (6550-10350)	7605 (3450-19300)	0.7059
Neutrofilos		4825 (1810-16620)	0 (0 %)	4320 (3000-9160)	5360 (1810-16620)	0.5423
Recuento de Linfocitos		1790 (280-4140)	0 (0 %)	2330 (920-3120)	1770 (280-4140)	0.2627
Plaquetas		293500 (138000-521000)	0 (0 %)	388500 (249000-521000)	286500 (138000-494000)	0.0261
Bilirrubina		0.5 (0.2-1.91)	0 (0 %)	0.4 (0.2-0.6)	0.5 (0.24-1.91)	0.0890
Ferritina		91.8 (9.7-783.6)	3 (11.54 %)	215.95 (9.7-783.6)	89.8 (17-720)	0.1493
Glucosa		100 (62-173)	0 (0 %)	103 (89-173)	99.5 (62-124)	0.1136
Hb glicosilada		6.3 (5.2-6.8)	19 (73.08 %)	5.65 (5.2-6.6)	6.3 (6.3-6.8)	0.0665
Hierro		69 (18-153)	3 (11.54 %)	62.5 (18-86)	91 (23-153)	0.0604
Insulina		14.4 (3.8-47.5)	15 (57.69 %)	11.95 (6.7-17.2)	14.4 (3.8-47.5)	0.7039
LDH	Elevado	10 (38.46 %)	0 (0 %)	2 (33.33 %)	8 (40 %)	0.7669
	Normal	16 (61.54 %)	0 (0 %)	4 (66.67 %)	12 (60 %)	
Colesterol	elevado	9 (34.62 %)	0 (0 %)	2 (33.33 %)	7 (35 %)	0.8755
	normal	16 (61.54 %)	0 (0 %)	4 (66.67 %)	12 (60 %)	
LDL		103.5 (40-184)	2 (7.69 %)	116 (40-184)	103.5 (75-164)	0.9590
HDL		48 (25-105)	2 (7.69 %)	39 (25-89)	52 (31-105)	0.6528
Triglicéridos		137 (73-258)	1 (3.85 %)	156.5 (97-258)	137 (73-254)	0.1755
CK		71.5 (15-268)	8 (30.77 %)	169 (70-268)	71.5 (15-223)	0.1554
PCR		6 (2.9-48.7)	3 (11.54 %)	13.6 (4-30)	5.9 (2.9-48.7)	0.6258
ALT		26 (12-149)	0 (0 %)	25 (15-40)	26.5 (12-149)	0.2318
FAL		77 (45-168)	1 (3.85 %)	87 (45-168)	73 (48-148)	0.2387

Variables analíticas	Grupos	N=26	Pct NA	No respondedor (N=6)	Respondedor (N=20)	LRT-Respuesta
<b>Mg</b>		2.1 (1.9-2.6)	7 (26.92 %)	2.15 (1.9-2.2)	2.1 (1.9-2.6)	0.5336
<b>Na</b>		139.5 (132-144)	0 (0 %)	140 (137-143)	139 (132-144)	0.6009
<b>Ca</b>		9.55 (8.8-10.7)	0 (0 %)	9.75 (8.9-10.7)	9.55 (8.8-10.5)	0.3704
<b>Cl</b>		104 (97-111)	0 (0 %)	105 (97-111)	104 (98-108)	0.5196
<b>K</b>		4.26 (3.4-5.3)	0 (0 %)	4.08 (3.4-4.96)	4.26 (3.4-5.3)	0.2390
<b>T3</b>		5.11 (3.2-6.7)	3 (11.54 %)	4.91 (3.65-5.6)	5.11 (3.2-6.7)	0.1560
<b>T4</b>		15.22 (11.9-19.7)	2 (7.69 %)	13.8 (11.9-17.56)	15.25 (12.6-19.7)	0.1439
<b>TSH</b>		1.4 (0.3-3.52)	0 (0 %)	2.11 (0.3-3.1)	1.1 (0.5-3.52)	0.2038
<b>VitaminaD</b>		25.7 (10-61.5)	14 (53.85 %)	44.25 (27-61.5)	21.75 (10-43.5)	0.0951
<b>Proteínas totales</b>		7.2 (6-8.5)	0 (0 %)	7.5 (6.58-8.3)	7.2 (6-8.5)	0.4512
<b>NLR</b>		2.66 (0.79-13.62)	0 (0 %)	2.4 (0.96-5.95)	2.73 (0.79-13.62)	0.2456
<b>dNLR</b>		1.98 (0.53-17.3)	0 (0 %)	1.95 (0.53-7.7)	1.98 (0.58-17.3)	0.7811

Toxicidad al tratamiento	Grupos	N=26	Pct NA	No respondedor (N=6)	Respondedor (N=20)	LRT-Respuesta
<b>ToxicidadTto_ARTRALGIAS</b>	No	25 (96.15 %)	0 (0 %)	5 (83.33 %)	20 (100 %)	0.0797
	Si	1 (3.85 %)		1 (16.67 %)	0 (0 %)	
<b>ToxicidadTto_ASTENIA</b>	No	17 (65.38 %)	0 (0 %)	6 (100 %)	11 (55 %)	0.0142
	Si	9 (34.62 %)		0 (0 %)	9 (45 %)	
<b>ToxicidadTto_CEFALEA</b>	No	25 (96.15 %)	0 (0 %)	6 (100 %)	19 (95 %)	0.4638
	Si	1 (3.85 %)		0 (0 %)	1 (5 %)	
<b>ToxicidadTto_DIARREA</b>	No	18 (69.23 %)	0 (0 %)	5 (83.33 %)	13 (65 %)	0.3735
	Si	8 (30.77 %)		1 (16.67 %)	7 (35 %)	
<b>ToxicidadTto_EMESIS</b>	No	24 (92.31 %)	0 (0 %)	5 (83.33 %)	19 (95 %)	0.3851
	Si	2 (7.69 %)		1 (16.67 %)	1 (5 %)	
<b>ToxicidadTto_FIEBRE</b>	No	25 (96.15 %)	0 (0 %)	6 (100 %)	19 (95 %)	0.4638
	Si	1 (3.85 %)		0 (0 %)	1 (5 %)	
<b>ToxicidadTto_HIPERTRANSAMINASEMIA</b>	No	25 (96.15 %)	0 (0 %)	6 (100 %)	19 (95 %)	0.4638
	Si	1 (3.85 %)		0 (0 %)	1 (5 %)	
<b>ToxicidadTto_HIPONATREMIA</b>	No	25 (96.15 %)	0 (0 %)	6 (100 %)	19 (95 %)	0.4638
	Si	1 (3.85 %)		0 (0 %)	1 (5 %)	
<b>ToxicidadTto_HIPOREXIA</b>	No	23 (88.46 %)	0 (0 %)	5 (83.33 %)	18 (90 %)	0.6658
	Si	3 (11.54 %)		1 (16.67 %)	2 (10 %)	

Toxicidad al tratamiento	Grupos	N=26	Pct NA	No respondedor (N=6)	Respondedor (N=20)	LRT-Respuesta
<b>ToxicidadTto_HTA</b>	No	25 (96.15 %)	0 (0 %)	6 (100 %)	19 (95 %)	0.4638
	Si	1 (3.85 %)		0 (0 %)	1 (5 %)	
<b>ToxicidadTto_IRA</b>	No	25 (96.15 %)	0 (0 %)	5 (83.33 %)	20 (100 %)	0.0797
	Si	1 (3.85 %)		1 (16.67 %)	0 (0 %)	
<b>ToxicidadTto_MIALGIAS</b>	No	24 (92.31 %)	0 (0 %)	5 (83.33 %)	19 (95 %)	0.3851
	Si	2 (7.69 %)		1 (16.67 %)	1 (5 %)	
<b>ToxicidadTto_NAUSEAS</b>	No	25 (96.15 %)	0 (0 %)	6 (100 %)	16 (80 %)	0.1286
	Si	3 (11.54 %)		0 (0 %)	4 (20 %)	
<b>ToxicidadTto_NEUTROPENIA</b>	No	25 (96.15 %)	0 (0 %)	6 (100 %)	19 (95 %)	0.4638
	Si	1 (3.85 %)		0 (0 %)	1 (5 %)	
<b>ToxicidadTto_NO</b>	No	24 (92.31 %)	0 (0 %)	6 (100 %)	18 (90 %)	0.2946
	Si	2 (7.69 %)		0 (0 %)	2 (10 %)	
<b>ToxicidadTto_PANUVEITIS</b>	No	25 (96.15 %)	0 (0 %)	5 (83.33 %)	20 (100 %)	0.0797
	Si	1 (3.85 %)		1 (16.67 %)	0 (0 %)	
<b>ToxicidadTto_PIREXIA</b>	No	18 (69.23 %)	0 (0 %)	3 (50 %)	15 (75 %)	0.2569
	Si	8 (30.77 %)		3 (50 %)	5 (25 %)	
<b>ToxicidadTto_RASH</b>	No	24 (92.31 %)	0 (0 %)	6 (100 %)	18 (90 %)	0.2946
	Si	2 (7.69 %)		0 (0 %)	2 (10 %)	
<b>ToxicidadTto_SINCOPE</b>	No	25 (96.15 %)	0 (0 %)	6 (100 %)	19 (95 %)	0.4638
	Si	1 (3.85 %)		0 (0 %)	1 (5 %)	
<b>ToxicidadTto_VÓMITOS</b>	No	25 (96.15 %)	0 (0 %)	6 (100 %)	19 (95 %)	0.4638
	Si	1 (3.85 %)		0 (0 %)	1 (5 %)	

**Tabla S2.** Tabla de características generales, analíticas y de tratamiento de la cohorte por protocolo de genes de expresión inmune, estratificada en R (Respondedores) y NR (No Respondedores). LSN: Límite superior de la normalidad, NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos, dNLR: Derivada del NLR [Neutrófilos/(Leucocitos-Neutrófilos)], PCR: Proteína C Reactiva, RC: Respuesta completa, RP: Respuesta parcial, EE: Enfermedad estable, PE: Progresión de la enfermedad, ORR: Tasa de respuesta objetiva, SLP: Supervivencia libre de progresión, SG: Supervivencia global.

Características generales (n=24)		
Variables clínicas n(%)	R n=18	NR n=6
Edad, mediana (rango)	54 (23-80)	55 (38-76)
Sexo		
Masculino	9 (50)	3 (50)
Femenino	9 (50)	3 (50)
ECOG		
0-1	16 (88.9)	5 (83.3)
2	2 (11.1)	1 (16.7)
Antibióticos		
30 days previos al tratamiento	3 (16.7)	0 (0)
Durante el tratamiento	11 (61.1)	3 (50)
Corticoides		
30 días previos al tratamiento	6 (33.3)	1 (16.7)
Durante el tratamiento	12 (66.7)	4 (66.7)
Melanoma primario reseado	16 (88.9)	6 (100)
Tratamiento adyuvante		
Inmunoterapia	7 (38.9)	2 (33.3)
Interferon	6 (85.7)	2 (100)
Interferon	1 (14.3)	0 (0)
Estadio TNM (AJCC 8th ed)		
III	0 (0)	0 (0)
M1a	4 (22.2)	2 (33.3)
M1b	2 (11.1)	1 (16.7)
M1c	5 (27.8)	2 (33.3)
M1d	7 (38.9)	1 (16.7)
<b>Variables analíticas</b>		
Recuento absoluto neutrófilos $\geq 7500/\text{mL}$	4 (22.2)	1 (16.7)
LDH $\geq \text{LSN}$	7 (38.9)	2 (33.3)
NLR Severo $\geq 5$	6 (33.3)	1 (16.7)
dNLR severo ( $\geq 3$ )	6 (33.3)	2 (33.3)
PCR $\geq \text{LSN}$	10 (55.6)	4 (66.7)

Características generales (n=24)		
Tratamiento y toxicidad, n (%)	R n=18	NR n=6
Inhibidor BRAF/MEK administrado		
Dabrafenib-Trametinib	13 (72.2)	6 (100)
Encorafenib/Binimetinib	5 (27.8)	0 (0)
Toxicidad al tratamiento, cualquier grado	17 (94.4)	6 (100)
Pirexia	5 (29.4)	2 (33.3)
Astenia	8 (47)	0 (0)
Diarrea	7 (41.2)	1 (16.7)
Nausea/Vómitos	6 (35.3)	1 (16.7)
Hiporexia	2 (11.7)	1 (16.7)
Rash	2 (11.7)	0 (0)
Mialgias	1 (5.9)	1 (16.7)
Hiponatremia	1 (5.9)	0 (0)
Hipertransaminasemia	1 (5.9)	0 (0)
Uveítis	0 (0)	1 (16.7)
Neutropenia	1 (5.9)	0 (0)
Toxicidad mayor o igual a grado 2	8 (44.4)	3 (50)
Toxicidad grado 3-4	4 (22.2)	5 (33.3)
Pirexia	1 (25)	2 (40)
Astenia	1 (25)	1 (20)
Hepatitis	1 (25)	1 (20)
Neutropenia	0 (0)	0 (0)
Hiponatremia	1 (25)	1 (20)
Reducción de dosis	5 (44.4)	4 (66.7)
Interrupción del tratamiento por toxicidad	4 (22.2)	0 (0)
<b>Respuesta al tratamiento</b>		
Respuesta RECIST v1.1		
RC	5 (27.8)	0 (0)
RP	13 (72.2)	0 (0)
EE	0 (0)	6 (66.7)
PE	0 (0)	2 (33.3)
Eventos		
Progresión	10 (55.6)	4 (66.7)
Exitus	7 (38.9)	3 (50)
<b>Supervivencia</b>		
SLP, mediana (IC95%)	23.0 (10.9-35.2)	10.2 (1.6-18.7)

**Tabla S3.** Genes en tiempo basal T0 with con el correspondiente log-fold change, *p*-valor y *p*-valor ajustado (*qvalue*).

Genes a tiempo basal	logFC	p-valor	qvalue
<i>LAG3</i>	-0,78	0,041	0,42
<i>ITGA6</i>	-0,93	0,011	0,37
<i>TP53</i>	-0,75	0,017	0,38
<i>KLRK1</i>	-0,77	0,049	0,42
<i>RELA</i>	0,77	0,011	0,37
<i>MAPKAPK2</i>	0,89	0,0062	0,37
<i>IL4R</i>	0,63	0,035	0,42
<i>TAL1</i>	-1,1	0,0091	0,37
<i>CD36</i>	-1,2	0,017	0,38
<i>CD45RA</i>	0,69	0,044	0,42
<i>LITAF</i>	0,81	0,048	0,42
<i>NFATC2</i>	-0,6	0,044	0,42
<i>TIGIT</i>	-0,87	0,023	0,42
<i>NFKB2</i>	1,1	0,0097	0,37
<i>HLA-A</i>	0,77	0,0078	0,37
<i>STAT5A</i>	0,56	0,018	0,38
<i>LCK</i>	-0,74	0,049	0,42
<i>BCL3</i>	1,2	0,0022	0,34
<i>SLAMF7</i>	-0,94	0,025	0,42
<i>PTK2</i>	-0,77	0,0069	0,37
<i>NOD1</i>	-0,64	0,026	0,42
<i>UBE2L3</i>	-0,65	0,035	0,42
<i>CD24</i>	1	0,024	0,42
<i>TNFRSF1B</i>	0,88	0,013	0,38
<i>CASP8</i>	0,68	0,021	0,41
<i>TNFSF4</i>	-0,81	0,036	0,42
<i>IL6ST</i>	-0,55	0,039	0,42
<i>IRF1</i>	0,72	0,036	0,42
<i>KLRG1</i>	-1,1	0,039	0,42
<i>ITGB2</i>	0,73	0,049	0,42
<i>GP1BB</i>	-1,1	0,018	0,38

Genes a tiempo basal	logFC	p-valor	qvalue
<i>IL1RAP</i>	0,63	0,042	0,42
<i>HLA-B</i>	0,7	0,01	0,37
<i>CD244</i>	-0,57	0,045	0,42
<i>CD96</i>	-0,61	0,039	0,42
<i>TLR2</i>	0,66	0,049	0,42
<i>CD2</i>	-0,84	0,009	0,37
<i>SLAMF6</i>	-1	0,0043	0,37
<i>CCL5</i>	-1,3	0,00092	0,34
<i>ITGB1</i>	-0,7	0,014	0,38
<i>SIGIRR</i>	-0,57	0,042	0,42
<i>CX3CR1</i>	-1,5	0,0022	0,34
<i>APP</i>	-0,6	0,048	0,42
<i>PPBP</i>	-1,5	0,0088	0,37
<i>PLAUR</i>	0,87	0,015	0,38
<i>IL13RA1</i>	0,77	0,044	0,42
<i>CSF3R</i>	1,2	0,018	0,38
<i>SLAMF1</i>	-0,81	0,031	0,42
<i>ICAM2</i>	-0,66	0,022	0,41

**Tabla S4.** Genes en T1 con el correspondiente log-fold change, *p*-valor y *p*-valor ajustado (*qvalue*).

Genes en T1	logFC	P-valor	qvalue	DE-T1
<i>KIT</i>	0,85	0,041	0,52	No
<i>LAG3</i>	-1,5	0,0038	0,28	Downregulated
<i>CD36</i>	-0,93	0,039	0,52	Downregulated
<i>CCR5</i>	-1,5	0,0015	0,28	No
<i>CISH</i>	-1	0,041	0,52	No
<i>PSMB8</i>	-0,69	0,047	0,52	No
<i>IRF7</i>	-1,4	0,011	0,4	No
<i>GBP5</i>	-1,7	0,02	0,45	No
<i>SLAMF7</i>	-0,95	0,038	0,52	Downregulated
<i>ITGA4</i>	-0,64	0,049	0,52	No
<i>IFI16</i>	-1,3	0,0034	0,28	No
<i>NOD1</i>	-0,8	0,016	0,45	Downregulated
<i>GBP1</i>	-2,3	0,0036	0,28	No
<i>MSR1</i>	-1,5	0,0089	0,35	No
<i>JAK2</i>	-1,1	0,018	0,45	No
<i>IFI35</i>	-1,7	0,0072	0,34	No
<i>FCGR1A/B</i>	-1,6	0,015	0,45	No
<i>CD274</i>	-1,7	0,045	0,52	No
<i>SOCS1</i>	-1	0,047	0,52	No
<i>SLAMF6</i>	-0,88	0,021	0,45	Downregulated
<i>STAT1</i>	-1,2	0,022	0,45	No
<i>STAT2</i>	-1,4	0,0026	0,28	No
<i>CX3CR1</i>	-1,9	0,036	0,52	Downregulated
<i>TRAF4</i>	1,2	0,017	0,45	No
<i>ICAM4</i>	0,81	0,038	0,52	No
<i>TAP1</i>	-1,1	0,009	0,35	No
<i>TNFSF10</i>	-2,1	0,0022	0,28	No
<i>LILRA3</i>	-1,6	0,035	0,52	No
<i>PRF1</i>	-1	0,038	0,52	No
<i>CYBB</i>	-0,93	0,047	0,52	No
<i>FCGR2B</i>	-1,5	0,047	0,52	No

Genes en T1	logFC	P-valor	qvalue	DE-T1
<i>TLR7</i>	-1,4	0,0046	0,28	No
<i>RARRES3</i>	-0,95	0,013	0,43	No
<i>CCR2</i>	-1,5	0,045	0,52	No
<i>IFIH1</i>	-1,1	0,038	0,52	No
<i>LILRB1</i>	-1,1	0,038	0,52	No
<i>IL8</i>	2,8	0,0065	0,34	No
<i>BST2</i>	-1,4	0,0047	0,28	No
<i>CASP1</i>	-1,4	0,02	0,45	No
<i>ICAM2</i>	-0,77	0,041	0,52	Downregulated
<i>LILRB4</i>	-1,2	0,021	0,45	No

**Tabla S5.** Expresión diferencial en longitudinalidad de genes de reinducción inmune, de T0 a T1.

Expresión diferencial T0 a T1	P-valor Respondedores	P-valor No-Respondedores
<i>ITGA6</i>	0,129737854003906	1
<i>TP53</i>	0,83172607421875	0,5
<i>KLRK1</i>	0,181465148925781	0,5
<i>RELA</i>	0,865043640136719	0,75
<i>MAPKAPK2</i>	0,346549987792969	0,25
<i>TAL1</i>	1	0,5
<i>CD36</i>	0,733726501464844	1
<i>CD45RA</i>	0,0897674560546875	0,75
<i>NFATC2</i>	0,4171142578125	0,75
<i>TIGIT</i>	0,266712256717957	0,25
<i>NFKB2</i>	0,442298889160156	0,75
<i>STAT5A</i>	0,442298889160156	0,5
<i>LCK</i>	0,246208190917969	0,5
<i>BCL3</i>	0,898574829101563	0,75
<i>SLAMF7</i>	0,2645263671875	0,25
<i>PTK2</i>	0,609458923339844	0,75
<i>NOD1</i>	0,2645263671875	0,5
<i>UBE2L3</i>	0,369216918945313	1
<i>TNFRSF1B</i>	0,167350769042969	0,75
<i>CASP8</i>	0,303794860839844	0,75
<i>IL6ST</i>	0,550872802734375	0,75
<i>IRF1</i>	0,246208190917969	0,25
<i>KLRG1</i>	0,7987060546875	0,25
<i>ITGB2</i>	0,550872802734375	0,75
<i>GP1BB</i>	0,966117858886719	0,25
<i>HLA-B</i>	0,83172607421875	0,75
<i>CD244</i>	0,966117858886719	0,75
<i>CD96</i>	0,766029357910156	1
<i>CD2</i>	0,966117858886719	0,25

Expresión diferencial T0 a T1	P-valor Respondedores	P-valor No-Respondedores
<i>SLAMF6</i>	0,7987060546875	0,25
<i>CCL5</i>	0,154045104980469	1
<i>ITGB1</i>	0,212142944335938	0,75
<i>SIGIRR</i>	0,176945075573857	0,75
<i>CX3CR1</i>	0,639694213867188	0,25
<i>APP</i>	0,154045104980469	0,25
<i>PPBP</i>	0,701881408691406	0,5
<i>CSF3R</i>	0,0814285278320313	1
<i>SLAMF1</i>	0,163385074154965	0,5
<i>ICAM2</i>	0,538293635901243	0,25

**Tabla S6.** Expresión diferencial en longitudinalidad de genes de reinducción inmune, de T1 a T0.

Expresión diferencial de T1 a T0	P-valor Respondedores	P-valor No-Respondedores
<i>CD36</i>	0,733726501464844	1
<i>CCR5</i>	0,442298889160156	0,25
<i>CISH</i>	0,246208190917969	0,25
<i>PSMB8</i>	0,0384902954101563	0,5
<i>SLAMF7</i>	0,2645263671875	0,25
<i>ITGA4</i>	0,932281494140625	0,25
<i>NOD1</i>	0,2645263671875	0,5
<i>JAK2</i>	0,966117858886719	0,25
<i>SLAMF6</i>	0,7987060546875	0,25
<i>STAT1</i>	0,303794860839844	0,25
<i>CX3CR1</i>	0,639694213867188	0,25
<i>TRAF4</i>	0,102399198063522	0,5
<i>ICAM4</i>	0,346549987792969	1
<i>TAP1</i>	0,0121459523645502	0,25
<i>PRF1</i>	0,141517639160156	0,25
<i>CYBB</i>	0,639694213867188	0,25
<i>RARRES3</i>	0,212142944335938	0,25
<i>CCR2</i>	0,442298889160156	0,25
<i>LILRB1</i>	0,924572011837841	0,5
<i>ICAM2</i>	0,538293635901243	0,25

**Tabla S7.** Tabla de características generales, analíticas y de tratamiento de la cohorte por protocolo de microbiota, estratificada en respuesta completa (RC) y No-RC. LSN: Límite superior de la normalidad, NLR: Ratio Neutrófilos/Linfocitos, dNLR: Derivada del NLR [Neutrófilos/(Leucocitos-Neutrófilos)], PCR: Proteína C Reactiva, RC: Respuesta completa, RP: Respuesta parcial, EE: Enfermedad estable, PE: Progresión de la enfermedad, ORR: Tasa de respuesta objetiva, SLP: Supervivencia libre de progresión, SG: Supervivencia global, NR=No alcanzada

Características generales (n=20)		
Variables clínicas n(%)	RC n=5	No-RC n=15
Edad, mediana (rango)	55 (49-65)	56 (36-80)
Sexo		
Masculino	3 (40)	6 (40)
Femenino	5 (60)	9 (60)
ECOG		
0-1	5 (100)	13 (86.7)
2	0 (0)	2 (13.3)
Antibióticos		
30 days previos al tratamiento	2 (40)	1 (6.7)
Durante el tratamiento	3 (60)	10 (66.7)
Corticoides		
30 días previos al tratamiento	1 (20)	4 (26.7)
Durante el tratamiento	3 (60)	10 (66.7)
Inhibidores de la bomba de protones	1 (20)	9 (60)
Polifarmacia (≥ 5 fármacos)	0 (0)	6 (40)
Melanoma primario resecao	5 (100)	13 (86.7)
Tratamiento adyuvante		
Inmunoterapia	4 (80)	4 (26.7)
Interferon	4 (100)	3 (75)
Interferon	0 (0)	1 (25)
Estadio TNM (AJCC 8th ed)		
III	0 (0)	0 (0)
M1a	3 (60)	2 (13.3)
M1b	0 (0)	2 (13.3)
M1c	1 (20)	5 (33.3)
M1d	1 (20)	6 (40)
<b>Variables analíticas</b>		
Recuento absoluto neutrófilos ≥7500/mL	1 (20)	3 (20)
LDH ≥LSN	2 (40)	5 (33.3)
NLR Severo >=5	1 (20)	4 (26.7)
dNLR severo (≥3)	1 (20)	5 (33.3)
PCR ≥LSN	2 (40)	10 (66.7)

Características generales (n=20)		
Tratamiento y toxicidad, n (%)	RC n=5	No-RC n=15
Inhibidor BRAF/MEK administrado		
Dabrafenib-Trametinib	4 (80)	12 (80)
Encorafenib/Binimetinib	1 (20)	3 (20)
Toxicidad al tratamiento, cualquier grado	4 (80)	15 (100)
Pirexia	2 (40)	6 (40)
Astenia	2 (40)	6 (40)
Diarrea	4 (80)	6 (40)
Nausea/Vómitos	0 (0)	3 (20)
Hiporexia	0 (0)	2 (13.3)
Rash	2 (40)	0 (0)
Mialgias	0 (0)	1 (6.7)
Hiponatremia	0 (0)	1 (6.7)
Hipertransaminasemia	0 (0)	1 (6.7)
Uveítis	0 (0)	0 (0)
Neutropenia	1 (20)	0 (0)
Toxicidad mayor o igual a grado 2	2 (40)	8 (53.3)
Toxicidad grado 3-4	1 (20)	5 (33.3)
Pirexia	0 (0)	2 (40)
Astenia	0 (0)	1 (20)
Hepatitis	0 (0)	1 (20)
Neutropenia	1 (100)	0 (0)
Hiponatremia	0 (0)	1 (20)
Reducción de dosis	2 (40)	6 (40)
Interrupción del tratamiento por toxicidad	1 (20)	3 (20)
<b>Respuesta al tratamiento</b>		
Respuesta RECIST v1.1		
RC	5 (100)	0 (0)
RP	0 (0)	6 (40)
EE	0 (0)	9 (60)
PE	0 (0)	0 (0)
Eventos		
Progresión	2 (40)	9 (60)
Exitus	2 (40)	5 (33.3)
<b>Supervivencia</b>		
SLP, mediana (IC95%)	NR	15.7 (4.3-27.1)
SG, mediana (IC95%)	NR	28.9 (14.0-43.7)

# ANEXO II

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA



Review

# Gut Microbiota and Therapy in Metastatic Melanoma: Focus on MAPK Pathway Inhibition

Mora Guardamagna <sup>1,2</sup>, Miguel-Angel Berciano-Guerrero <sup>2,3,\*</sup>, Beatriz Villaescusa-González <sup>1</sup>,  
Elisabeth Perez-Ruiz <sup>1,3</sup>, Javier Oliver <sup>3</sup>, Rocío Lavado-Valenzuela <sup>1</sup>, Antonio Rueda-Dominguez <sup>2,3,†</sup>,  
Isabel Barragán <sup>3,4,†</sup> and María Isabel Queipo-Ortuño <sup>1,5,†</sup>

- <sup>1</sup> Medical Oncology Intercenter Unit, Regional and Virgen de la Victoria University Hospitals, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina-IBIMA Plataforma BIONAND, 29010 Málaga, Spain
  - <sup>2</sup> Department of Medicine and Dermatology, Medical School University of Málaga, Campus Teatinos, Blvr. Louis Pasteur, 32, 29010 Málaga, Spain
  - <sup>3</sup> Medical Oncology Intercenter Unit, Group of Translational Research in Cancer Immunotherapy, Regional and Virgen de la Victoria University Hospitals, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina-IBIMA Plataforma BIONAND, 29010 Málaga, Spain
  - <sup>4</sup> Group of Pharmacoeogenetics, Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institute, Tomtebodavägen 16, 171 65 Solna, Sweden
  - <sup>5</sup> Department of Surgical Specialties, Biochemical and Immunology, Faculty of Medicine, University of Málaga, 29071 Málaga, Spain
- \* Correspondence: mangel.berciano.sspa@juntadeandalucia.es  
† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Guardamagna, M.; Berciano-Guerrero, M.-A.; Villaescusa-González, B.; Perez-Ruiz, E.; Oliver, J.; Lavado-Valenzuela, R.; Rueda-Dominguez, A.; Barragán, I.; Queipo-Ortuño, M.I. Gut Microbiota and Therapy in Metastatic Melanoma: Focus on MAPK Pathway Inhibition. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 11990. <https://doi.org/10.3390/ijms231911990>

Academic Editor: Rüdiger Greinert

Received: 13 September 2022

Accepted: 5 October 2022

Published: 9 October 2022

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



**Copyright:** © 2022 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/>).

**Abstract:** Gut microbiome (GM) and its either pro-tumorigenic or anti-tumorigenic role is intriguing and constitutes an evolving landscape in translational oncology. It has been suggested that these microorganisms may be involved in carcinogenesis, cancer treatment response and resistance, as well as predisposition to adverse effects. In melanoma patients, one of the most immunogenic cancers, immune checkpoint inhibitors (ICI) and MAPK-targeted therapy—BRAF/MEK inhibitors—have revolutionized prognosis, and the study of the microbiome as a modulating factor is thus appealing. Although BRAF/MEK inhibitors constitute one of the main backbones of treatment in melanoma, little is known about their impact on GM and how this might correlate with immune re-induction. On the contrary, ICI and their relationship to GM has become an interesting field of research due to the already-known impact of immunotherapy in modulating the immune system. Immune reprogramming in the tumor microenvironment has been established as one of the main targets of microbiome, since it can induce immunosuppressive phenotypes, promote inflammatory responses or conduct anti-tumor responses. As a result, ongoing clinical trials are evaluating the role of fecal microbiota transplant (FMT), as well as the impact of using dietary supplements, antibiotics and probiotics in the prediction of response to therapy. In this review, we provide an overview of GM's link to cancer, its relationship with the immune system and how this may impact response to treatments in melanoma patients. We also discuss insights about novel therapeutic approaches including FMT, changes in diet and use of probiotics, prebiotics and symbiotics. Finally, we hypothesize on the possible pathways through which GM may impact anti-tumor efficacy in melanoma patients treated with targeted therapy, an appealing subject of which little is known.

**Keywords:** metastatic melanoma; gut microbiome; immune system

## 1. Introduction

### 1.1. Epidemiology and Risk Factors of Cutaneous Melanoma

Cutaneous melanoma is a malignant proliferation of melanocytes with an increasing incidence over the last few years, probably because of higher sun exposure, longer survival in elderly patients and changes in lifestyle [1]. Before the era of immunotherapy and



Review

# Treatment of Metastatic Melanoma at First Diagnosis: Review of the Literature

Miguel-Angel Berciano-Guerrero <sup>1,2,3,\*</sup> , Mora Guardamagna <sup>2,3</sup>, Elisabeth Perez-Ruiz <sup>1,2</sup> , Jose-Miguel Jurado <sup>1,2</sup>, Isabel Barragán <sup>1,4,†</sup>  and Antonio Rueda-Dominguez <sup>1,2,3,†</sup>

<sup>1</sup> Medical Oncology Intercenter Unit (Group of Translational Research in Cancer Immunotherapy), Regional and Virgen de la Victoria University Hospitals, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina-IBIMA Plataforma BIONAND, 29010 Málaga, Spain

<sup>2</sup> Medical Oncology Intercenter Unit, Regional and Virgen de la Victoria University Hospitals, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina-IBIMA Plataforma BIONAND, 29010 Málaga, Spain

<sup>3</sup> Department of Medicine and Dermatology, Medical School University of Málaga, Campus Teatinos, Blvr. Louis Pasteur, 32, 29010 Málaga, Spain

<sup>4</sup> Group of Pharmacoeogenetics, Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, 171 77 Stockholm, Sweden

\* Correspondence: mangel.berciano.sspa@juntadeandalucia.es

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Metastatic melanoma (MM) is a pathological entity with a very poor prognosis that, until a few decades ago, had a low response rate to systemic treatments. Fortunately, in the last few years, new therapies for metastatic melanoma have emerged. Currently, targeted therapy and immunotherapy are the mainstays of the therapeutic arsenal available for patients with unresectable or metastatic melanoma. However, both clinical evolution and drug efficacy in melanoma patients are very different depending on the stage at which it is diagnosed. In fact, the aggressiveness of melanoma is different depending on whether it debuts directly as metastatic disease or if what occurs is a relapse after a first diagnosis at an early stage, although the biological determinants are largely unknown. Another key aspect in the clinical management of metastatic melanoma at first diagnosis strives in the different prognosis of melanoma of unknown primary (MUP) compared to melanoma of known primary (MPK). Understanding the mechanisms behind this, and the repercussion of implementing targeted and immune therapies in this specific form is crucial for designing diagnosis and treatment decision algorithms that optimize the current strategies. In this review article, we recapitulate the information available thus far regarding the epidemiology and response to immunotherapy treatments or targeted therapy in patients diagnosed with metastatic melanoma as a first diagnosis, with especial emphasis on the emerging specific information of the subpopulation formed by MUP patients.

**Keywords:** metastatic melanoma; first diagnosis; MUP



**Citation:** Berciano-Guerrero, M.-A.; Guardamagna, M.; Perez-Ruiz, E.; Jurado, J.-M.; Barragán, I.; Rueda-Dominguez, A. Treatment of Metastatic Melanoma at First Diagnosis: Review of the Literature. *Life* **2022**, *12*, 1302. <https://doi.org/10.3390/life12091302>

Academic Editor: Paola Nieri

Received: 24 June 2022

Accepted: 18 August 2022

Published: 24 August 2022

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



**Copyright:** © 2022 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/>).

## 1. Introduction

Despite representing 1% of skin tumors, melanoma represents 80% of skin cancer deaths [1]. Nevertheless, 90% of melanoma patients are initially diagnosed as stages I and II [2], with diagnosis of more advanced stages at a far lower incidence. Campaigns for primary and secondary prevention of melanoma have progressively decreased the incidence of thin melanoma [3].

Previously, many efforts have been made to understand patterns of disease progression, providing information on risks that have helped improve monitoring and the efficacy of new adjuvant treatments [4–8]. More recently, additional studies are aiming to improve not only survival in the initial stages, with better diagnosis and adjuvant therapies that are more effective, but also the treatment of unresectable or metastatic disease, regardless of the initial stage at diagnosis. The arrival of immune checkpoint inhibitors (ICI) and

# BIBLIOGRAFÍA

---



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> Grupo Español de Melanoma. Qué es el melanoma. [Acceso el 01 de Enero 2022] Disponible en: <https://www.groupgem.es/que-es-el-melanoma/>
- <sup>2</sup> Sanmartín Jimenez O. El incremento en la incidencia del melanoma y en cáncer cutáneo no melanoma nos obliga a insistir en las campañas de prevención primarias y secundarias. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2017;108(4):324.
- <sup>3</sup> SEOM, REDECAN. Nota de prensa: REDECAN y SEOM elaboran una infografía sobre melanoma cutáneo en España para concienciar a la población sobre la importancia de la prevención. España, Julio de 2022. Disponible en: [https://seom.org/images/14\\_07\\_2022\\_NP\\_Melanoma\\_cutaneo\\_infografia.pdf](https://seom.org/images/14_07_2022_NP_Melanoma_cutaneo_infografia.pdf)
- <sup>4</sup> American Cancer Society. Estadísticas importantes sobre el cáncer de piel tipo melanoma. [Acceso el 01 de Enero 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-piel-tipo-melanoma/acerca/estadisticas-clave.html>
- <sup>5</sup> Jin SG, Padron F, Pfeifer GP. UVA Radiation, DNA Damage, and Melanoma. *ACS Omega*. 8 de septiembre de 2022;7(37):32936-48. doi: 10.1021/acsomega.2c04424
- <sup>6</sup> Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, *et al*. Epidemiology of Melanoma. *Med Sci (Basel)*. 20 de octubre de 2021;9(4):63. doi: 10.3390/medsci9040063.
- <sup>7</sup> Ferlay J, Ervik M, Lam F, *et al* (2024). Global Cancer Observatory: Cancer Today (version 1.1). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponible en: <https://gco.iarc.who.int/today>
- <sup>8</sup> Ward WH, Lambreton F, Goel N, *et al*. Clinical Presentation and Staging of Melanoma. En: Ward WH, Farma JM, editores. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. Brisbane (AU): *Codon Publications*; 2017. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK481857/>
- <sup>9</sup> American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2023*. Atlanta, [Acceso el 01 de Enero 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/2023-cancer-facts-figures.html>
- <sup>10</sup> National Cancer Institute. SEER\*Explorer: An interactive website for SEER cancer statistics. Surveillance Research Program. [Acceso el 23 de Febrero 2023]. Disponible en: <https://seer.cancer.gov/>

- 11 Wells, G. Melanoma - Trastornos dermatológicos. Manual MSD versión para profesionales. [Acceso el 2 de Enero 2023]. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es-es/professional/trastornos-dermatol%C3%B3gicos/c%C3%A1nceres-cut%C3%A1neos/melanoma>
- 12 Cancer Genome Atlas Network. Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA, Albert M, Ally A, Amin SB, et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. Junio de 2015;161(7):1681-96. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.044.
- 13 Fernández González O, Abreu Perdomo FA, Hernández Perugorría A, et al. Caracterización clinicopatológica del melanoma uveal. *Revista Cubana de Oftalmología*. Diciembre de 2018;31(4):17–24. ISSN: 1561-3070
- 14 Elder DE, Bastian BC, Cree IA, et al. The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma: Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 14 de febrero de 2020;144(4):500–22. doi: 10.5858/arpa.2019-0561-RA.
- 15 American Academy of Dermatology Association. Qué buscar: ABCDE de melanoma. [Acceso el 3 de Enero 2023]. Disponible en: <https://www.aad.org/public/diseases/skin-cancer/el-abcde-del-melanoma>
- 16 Gaudy-Marqueste C, Wazaefi Y, Bruneu Y, et al. Ugly Duckling Sign as a Major Factor of Efficiency in Melanoma Detection. *JAMA Dermatology*. 01 de abril de 2017;153(4):279–84. doi: 10.1001/jamadermatol.2016.5500.
- 17 Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, et al. Melanoma of the Skin. In: Amin AB, Edge SB, Greene, FL, et al. (Eds). *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th Ed. New York: Springer; 2017:563–585.
- 18 National Cancer Institute. Melanoma of the Skin - Cancer Stat Facts. SEER. [Acceso el 01 de Enero 2022]. Disponible en: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>.
- 19 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(1):5–29. doi: 10.3322/caac.21254.
- 20 National Cancer Institute. Tratamiento del melanoma (PDQ®)–Versión para profesionales de salud. 2022 [Acceso el 01 de Enero 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/piel/pro/tratamiento-melanoma-pdq>

- 21 Conforti C, Zalaudek I. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma: A Review. *Dermatol Pract Concept*. 01 de julio de 2021;11(Suppl 1):e2021161S. doi: 10.5826/dpc.11S1a161S.
- 22 Fadadu RP, Wei ML. Ultraviolet A radiation exposure and melanoma: a review. *Melanoma Research*. Diciembre 2022;32(6):405. doi: 10.1097/CMR.0000000000000857.
- 23 Espinoza SAM, Muñoz MLZ. Melanoma: más allá de la historia. *Medicina*. 20 de abril de 2021;43(1):152–9. doi.org/10.56050/01205498.1591
- 24 Guo YJ, Pan WW, Liu SB, *et al*. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. 01 de marzo de 2020;19(3):1997–2007. doi: 10.3892/etm.2020.8454
- 25 Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob JJ, *et al*. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of Translational Medicine*. 3 de mayo de 2012;10(1):85. doi: 10.1186/1479-5876-10-85.
- 26 Van der Kooij MK, Wetzels MJAL, Aarts MJB, *et al*. Age Does Matter in Adolescents and Young Adults versus Older Adults with Advanced Melanoma; A National Cohort Study Comparing Tumor Characteristics, Treatment Pattern, Toxicity and Response. *Cancers*. Agosto 2020;12(8):2072. doi: 10.3390/cancers12082072
- 27 Bollag G, Tsai J, Zhang J, *et al*. Vemurafenib: The first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nature reviews Drug discovery*. 12 de octubre de 2012;11. doi: 10.1038/nrd3847.
- 28 Flaherty KT, Robert C, Hersey P, *et al*; METRIC Study Group. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*. 12 de julio de 2012;367(2):107-14. doi: 10.1056/NEJMoa1203421.
- 29 Flaherty K, Daud A, Weber JS, *et al*. Updated overall survival (OS) for BRF113220, a phase 1-2 study of dabrafenib (D) alone versus combined dabrafenib and trametinib (D+T) in pts with BRAF V600 mutation-positive (+) metastatic melanoma. *JCO*. 20 de mayo de 2014;32(15\_suppl):9010–9010. doi: 10.1200/jco.2015.33.15\_suppl.9036
- 30 Wolchok JD, Hodi FS, Weber JS, *et al*. Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Ann N Y Acad Sci*. Julio 2013;1291(1):1–13. doi: 10.1111/nyas.12180.

- <sup>31</sup> Zengarini C, Mussi M, Veronesi G, *et al.* BRAF V600K vs. BRAF V600E: a comparison of clinical and dermoscopic characteristics and response to immunotherapies and targeted therapies. *Clin Exp Dermatol.* 2022 Junio;47(6):1131-1136. doi: 10.1111/ced.15113.
- <sup>32</sup> Robert C, Schachter J, Long GV, *et al.* Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine.* 25 de junio de 2015;372(26):2521–32. doi: 10.1056/NEJMoa1503093.
- <sup>33</sup> Robert C, Long GV, Brady B, *et al.* Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 22 de enero de 2015;372(4):320-30. doi: 10.1056/NEJMoa1412082.
- <sup>34</sup> Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, *et al.* Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2 de julio de 2015;373(1):23-34. doi: 10.1056/NEJMoa1504030.
- <sup>35</sup> Food and Drug Administration. FDA approves Opdualag for unresectable or metastatic melanoma. 21 de marzo de 2022. [Acceso el 04 de Enero 2023]; Disponible en: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-opdualag-unresectable-or-metastatic-melanoma>
- <sup>36</sup> Tawbi HA, Schadendorf D, Lipson EJ, *et al.* Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine.* 6 de enero de 2022;386(1):24–34. doi: 10.1056/NEJMoa2109970.
- <sup>37</sup> Ascierto PA, Casula M, Bulgarelli J, *et al.* Sequential immunotherapy and targeted therapy for metastatic BRAF V600 mutated melanoma: 4-year survival and biomarkers evaluation from the phase II SECOMBIT trial. *Nat Commun.* 2 de enero de 2024;15(1):146. doi: 10.1038/s41467-023-44475-6.
- <sup>38</sup> Atkins MB, Lee SJ, Chmielowski B, *et al.* Combination Dabrafenib and Trametinib Versus Combination Nivolumab and Ipilimumab for Patients With Advanced BRAF-Mutant Melanoma: The DREAMseq Trial-ECOG-ACRIN EA6134. *J Clin Oncol.* 10 de enero de 2023;41(2):186-197. doi: 10.1200/JCO.22.01763.
- <sup>39</sup> National Comprehensive Cancer Network. NCCN Cutaneous Melanoma Guidelines. Version 2.2022. [Acceso el 02 de Enero 2023] Disponible en: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/cutaneous\\_melanoma.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cutaneous_melanoma.pdf)

- 40 Wu R, Forget MA, Chacon J, *et al.* Adoptive T-cell therapy using autologous tumor-infiltrating lymphocytes for metastatic melanoma: current status and future outlook. *Cancer J.* 2012;18(2):160–75. doi: 10.1097/PPO.0b013e31824d4465.
- 41 Rohaan MW, Borch TH, van den Berg JH, *et al.* Tumor-Infiltrating Lymphocyte Therapy or Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 8 de diciembre de 2022;387(23):2113-2125. doi: 10.1056/NEJMoa2210233.
- 42 Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol.* Diciembre de 2016;17(12):e542–51. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30406-5.
- 43 Frederick DT, Piris A, Cogdill AP, *et al.* BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 1 de marzo de 2013;19(5):1225–31. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1630.
- 44 Wilmott JS, Long GV, Howle JR, *et al.* Selective BRAF Inhibitors Induce Marked T-cell Infiltration into Human Metastatic Melanoma. *Clinical Cancer Research.* 1 de marzo de 2012;18(5):1386–94. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2479
- 45 Welsh SJ, Rizos H, Scolyer RA, Long GV. Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: Where to next? *Eur J Cancer.* Julio de 2016;62:76–85. doi: 10.1016/j.ejca.2016.04.005.
- 46 Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* (2011) 331:1565–70. Doi: 10.1126/science.1203486
- 47 Tucci M, Passarelli A, Mannavola F, *et al.* Immune System Evasion as Hallmark of Melanoma Progression: The Role of Dendritic Cells. *Front Oncol.* 5 de noviembre de 2019;9:1148. doi: 10.3389/fonc.2019.01148.
- 48 Eddy K, Chen S. Overcoming Immune Evasion in Melanoma. *Int J Mol Sci.* 26 de noviembre de 2020;21(23):8984. doi: 10.3390/ijms21238984.
- 49 Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, *et al.* New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* Abril de 2014;27:16-25. doi: 10.1016/j.coi.2014.01.004.
- 50 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 4 de marzo de 2011;144(5):646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

- <sup>51</sup> Berciano-Guerrero MA, Lavado-Valenzuela R, Moya A, *et al.* Genes Involved in Immune Reinduction May Constitute Biomarkers of Response for Metastatic Melanoma Patients Treated with Targeted Therapy. *Biomedicines*. 10 de febrero de 2022;10(2):284. doi: 10.3390/biomedicines10020284.
- <sup>52</sup> Sade-Feldman M, Yizhak K, Bjorgaard SL, *et al.* Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell*. 01 de noviembre de 2018;175(4):998-1013.e20. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.038.
- <sup>53</sup> Lipson EJ, Sharfman WH, Drake CG, *et al.* Durable Cancer Regression Off-Treatment and Effective Reinduction Therapy with an Anti-PD-1 Antibody. *Clinical Cancer Research*. 16 de enero de 2013;19(2):462–8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2625
- <sup>54</sup> Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, *et al.* Long-Term Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone Versus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol*. 10 de enero de 2022;40(2):127-137. doi: 10.1200/JCO.21.02229.
- <sup>55</sup> Huang AC, Zappasodi R. A decade of checkpoint blockade immunotherapy in melanoma: understanding the molecular basis for immune sensitivity and resistance. *Nat Immunol*. Mayo de 2022;23(5):660-670. doi: 10.1038/s41590-022-01141-1.
- <sup>56</sup> Kamphorst AO, Wieland A, Nasti T, *et al.* Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science*. 31 de marzo de 2017;355(6332):1423-1427. doi: 10.1126/science.aaf0683.
- <sup>57</sup> Sharma N, Vacher J, Allison JP. TLR1/2 ligand enhances antitumor efficacy of CTLA-4 blockade by increasing intratumoral Treg depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 21 de mayo de 2019;116(21):10453-10462. doi: 10.1073/pnas.1819004116.
- <sup>58</sup> Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, *et al.* Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med*. 3 de agosto de 2009;206(8):1717-25. doi: 10.1084/jem.20082492.
- <sup>59</sup> Proietti I, Skroza N, Michelini S, *et al.* BRAF Inhibitors: Molecular Targeting and Immunomodulatory Actions. *Cancers*. Julio de 2020;12(7):1823. doi: 10.3390/cancers12071823

- <sup>60</sup> Kelley, M.C. Immune Responses to BRAF-Targeted Therapy in Melanoma: Is Targeted Therapy Immunotherapy? *Crit. Rev. Oncog.* 2016, 21, 83–91. doi: 10.1615/CritRevOncog.2016017150.
- <sup>61</sup> Liu, L.; Mayes, P.A.; Eastman, S.; *et al.* The BRAF and MEK inhibitors dabrafenib and trametinib: Effects on immune function and in combination with immunomodulatory antibodies targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4. *Clin. Cancer Res.* 01 de abril de 2015, 21, 1639–1651. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2339.
- <sup>62</sup> Hornsteiner F, Vierthaler J, Strandt H, *et al.*. Tumor-targeted therapy with BRAF-inhibitor recruits activated dendritic cells to promote tumor immunity in melanoma. *J Immunother Cancer.* 17 de abril de 2024;12(4):e008606. doi: 10.1136/jitc-2023-008606.
- <sup>63</sup> Kuske M, Westphal D, Wehner R, *et al.* Immunomodulatory effects of BRAF and MEK inhibitors: Implications for Melanoma therapy. *Pharmacol Res.* Octubre de 2018;136:151–9. doi: 10.1016/j.phrs.2018.08.019.
- <sup>64</sup> Karla V. Ballman Biomarker: Predictive or Prognostic?. *JCO* 33, 3968-3971(2015). doi:10.1200/JCO.2015.63.3651
- <sup>65</sup> Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, *et al.*; for members of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Expert Panel and the International Melanoma Database and Discovery Platform. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* Noviembre de 2017;67(6):472-492. doi: 10.3322/caac.21409.
- <sup>66</sup> Loo K, Smithy JW, Postow MA, *et al.*. Factors Determining Long-Term Antitumor Responses to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Melanoma. *Front Immunol.* 11 de enero de 2022;12:810388. doi: 10.3389/fimmu.2021.810388.
- <sup>67</sup> Bartlett EK, Flynn JR, Panageas KS, *et al.* High Neutrophil to Lymphocyte Ratio (NLR) is Associated with Treatment Failure and Death in Melanoma Patients Treated with PD-1 Inhibitor Monotherapy. *Cancer.* 01 de enero de 2020;126(1):76–85. doi: 10.1002/cncr.32506.
- <sup>68</sup> Zhang Y, Liu B, Kotenko S, Li W. Prognostic value of neutrophil-lymphocyte ratio and lactate dehydrogenase in melanoma patients treated with immune checkpoint inhibitors: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 12 de agosto de 2022;101(32):e29536. doi: 10.1097/MD.0000000000029536

- <sup>69</sup> Eroglu Z, Krinshpun S, Kalashnikova E, *et al.* Circulating tumor DNA-based molecular residual disease detection for treatment monitoring in advanced melanoma patients. *Cancer*. 01 de junio de 2023;129(11):1723-1734. doi: 10.1002/cncr.34716.
- <sup>70</sup> Seremet T, Jansen Y, Planken S, *et al.* Undetectable circulating tumor DNA (ctDNA) levels correlate with favorable outcome in metastatic melanoma patients treated with anti-PD1 therapy. *J Transl Med*. 5 de septiembre de 2019;17(1):303. doi: 10.1186/s12967-019-2051-8.
- <sup>71</sup> Garutti M, Bonin S, Buriolla S, *et al.* Find the Flame: Predictive Biomarkers for Immunotherapy in Melanoma. *Cancers (Basel)*. 10 de abril de 2021;13(8):1819. doi: 10.3390/cancers13081819.
- <sup>72</sup> Oey O, Liu YY, Sunjaya AF, *et al.* Gut microbiota diversity and composition in predicting immunotherapy response and immunotherapy-related colitis in melanoma patients: A systematic review. *World J Clin Oncol*. 24 de noviembre de 2022;13(11):929-942. doi: 10.5306/wjco.v13.i11.929.
- <sup>73</sup> Alarcón Cavero T, D'Auria G, Delgado Palacio S, *et al.* Microbiota. 59. Del Campo Moreno R (coordinadora). *Procedimientos en Microbiología Clínica*. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2016. ISBN: 978-84-617-7001-4
- <sup>74</sup> Walters KE, Martiny JBH. Alpha-, beta-, and gamma-diversity of bacteria varies across habitats. *PLoS One*. 23 de septiembre de 2020;15(9):e0233872. doi: 10.1371/journal.pone.0233872.
- <sup>75</sup> Naik S, Bouladoux N, Wilhelm C, *et al.* Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science*. 31 de agosto de 2012;337(6098):1115-9. doi: 10.1126/science.1225152.
- <sup>76</sup> Nakatsuji T, Chen TH, Butcher AM, *et al.* A commensal strain of *Staphylococcus epidermidis* protects against skin neoplasia. *Sci Adv*. 28 de febrero de 2018;4(2):eaao4502. doi: 10.1126/sciadv.aao4502.
- <sup>77</sup> Zhou Y, Chen T. Human microbiota: A crucial gatekeeper in lung cancer initiation, progression, and treatment. *Medicine in Microecology*. 2022;13:100055. doi.org/10.1016/j.medmic.2022.100055

- <sup>78</sup> Huang Y.J., Nariya S., Harris J.M., *et al.* The airway microbiome in patients with severe asthma: Associations with disease features and severity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015;136:874–884. doi: 10.1016/j.jaci.2015.05.044.
- <sup>79</sup> Marri P.R., Stern D.A., Wright A.L., *et al.* Asthma-associated differences in microbial composition of induced sputum. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013;131:346–352. doi: 10.1016/j.jaci.2012.11.013.
- <sup>80</sup> Zhang Q., Cox M., Liang Z., *et al.* Airway Microbiota in Severe Asthma and Relationship to Asthma Severity and Phenotypes. *PLoS ONE.* 2016;11:e0152724. doi: 10.1371/journal.pone.0152724.
- <sup>81</sup> Takahashi-Kanemitsu A, Knight CT, Hatakeyama M. Molecular anatomy and pathogenic actions of Helicobacter pylori CagA that underpin gastric carcinogenesis. *Cell Mol Immunol.* Enero de 2020;17(1):50-63. doi: 10.1038/s41423-019-0339-5.
- <sup>82</sup> Liao JB. Viruses and Human Cancer. *Yale J Biol Med.* Diciembre de 2006;79(3-4):115-22.
- <sup>83</sup> Knippel RJ, Drews J, Sears CL. The cancer microbiome: recent highlights and knowledge gaps. *Can Discovery.* Octubre 21; 2378-2395. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-0324
- <sup>84</sup> Sánchez-Alcoholado L, Ramos-Molina B, Otero A, *et al.* The Role of the Gut Microbiome in Colorectal Cancer Development and Therapy Response. *Cancers (Basel).* 29 de mayo de 2020;12(6):1406. doi: 10.3390/cancers12061406.
- <sup>85</sup> Elagan SK, Almalki SJ, Alharthi MR, *et al.* Role of Bacteria in the Incidence of Common GIT Cancers: The Dialectical Role of Integrated Bacterial DNA in Human Carcinogenesis. *Infect Drug Resist.* 01 de junio de 2021;14:2003-2014. doi: 10.2147/IDR.S309051.
- <sup>86</sup> Abdulmir AS, Hafidh RR, Bakar FA. The association of Streptococcus bovis/gallolyticus with colorectal tumors: The nature and the underlying mechanisms of its etiological role. *J Exp Clin Cancer Res.* 20 de enero de 2011;30(1):11. doi: 10.1186/1756-9966-30-11.
- <sup>87</sup> Fulbright LA, Ellermann M, Arthur JC, *et al.* The microbiome and the hallmarks of cancer *Review PLoS Pathog.* 21 de septiembre de 2017;13(9):e1006480. doi: 10.1371/journal.ppat.1006480.

- <sup>88</sup> Rhee KJ, Wu S, Wu X, *et al.* Induction of Persistent Colitis by a Human Commensal, Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*, in Wild-Type C57BL/6 Mice. *Infect Immun.* 2009;77: 1708–1718. doi: 10.1128/IAI.00814-08.
- <sup>89</sup> Rubinstein MR, Wang X, Liu W, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ $\beta$ -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe.* 2013;14: 195–206. doi: 10.1016/j.chom.2013.07.012.
- <sup>90</sup> Pushalkar, S.; Hundeyin, M.; Daley, *et al.* The Pancreatic Cancer Microbiome Promotes Oncogenesis by Induction of Innate and Adaptive Immune Suppression. *Cancer Discov.* 2018, 8, 403–416. doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-1134
- <sup>91</sup> Laborda-Illanes A, Sanchez-Alcoholado L, Dominguez-Recio ME, *et al.* Breast and Gut Microbiota Action Mechanisms in Breast Cancer Pathogenesis and Treatment. *Cancers.* Septiembre de 2020;12(9):2465. doi: 10.3390/cancers12092465.
- <sup>92</sup> Zhou P, Hu Y, Wang X, *et al.* Microbiome in cancer: An exploration of carcinogenesis, immune responses and immunotherapy. *Front Immunol.* 8 de agosto de 2022 Aug 8;13:877939. doi: 10.3389/fimmu.2022.877939.
- <sup>93</sup> Vitali F, Colucci R, Di Paola M, *et al.* Early melanoma invasivity correlates with gut fungal and bacterial profiles. *Br J Dermatol.* Enero de 2022;186(1):106-16. doi: 10.1111/bjd.20626.
- <sup>94</sup> Mekadim C, Skalnikova HK, Cizkova J, *et al.* Dysbiosis of skin microbiome and gut microbiome in melanoma progression. *BMC Microbiol.* Diciembre de 2022;22(1):63. doi: 10.1186/s12866-022-02458-5.
- <sup>95</sup> Makaranka S, Scutt F, Frixou M, *et al.* The gut microbiome and melanoma: A review. *Exp Dermatol.* Septiembre de 2022;31(9):1292-1301. doi: 10.1111/exd.14639.
- <sup>96</sup> Tonneau M, Elkrief A, Pasquier D, *et al.* The role of the gut microbiome on radiation therapy efficacy and gastrointestinal complications: A systematic review. *Radiotherapy and Oncology.* 01 de marzo de 2021;156:1-9. doi: 10.1016/j.radonc.2020.10.033.
- <sup>97</sup> Viaud S, Saccheri F, Mignot G, *et al.* The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science.* 22 de noviembre de 2013;342(6161):971-6. doi: 10.1126/science.1240537

- <sup>98</sup> Pflug N, Kluth S, Vehreschild JJ, *et al.* Efficacy of antineoplastic treatment is associated with the use of antibiotics that modulate intestinal microbiota. *Oncoimmunology*. 22 de abril de 2016;5(6):e1150399. doi: 10.1080/2162402X.2016.1150399.
- <sup>99</sup> Schawabe RF, Jobin C. The microbiome and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13 (11):800-812. doi: 10.1038/nrc3610.
- <sup>100</sup> Jain T, Sharma P, Are AC, *et al.* New Insights Into the Cancer–Microbiome–Immune Axis: Decrypting a Decade of Discoveries. *Front Immunol*. 23 de febrero de 2021;12:622064. doi: 10.3389/fimmu.2021.622064
- <sup>101</sup> Yang Z, Liu X, Wu Y, *et al.* Effect of the Microbiome on Intestinal Innate Immune Development in Early Life and the Potential Strategy of Early Intervention. *Front Immunol*. 19 de julio de 2022;13:936300. doi: 10.3389/fimmu.2022.936300.
- <sup>102</sup> Atarashi K, Nishimura J, Shima T, *et al.* ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation. *Nature*. 09 de octubre de 2008;455(7214):808-12. doi: 10.1038/nature07240.
- <sup>103</sup> Wu HJ, Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*. 01 de enero de 2012;3(1):4–14. doi: 10.4161/gmic.19320.
- <sup>104</sup> Josefsdottir KS, Baldrige MT, Kadmon CS, *et al.* Antibiotics impair murine hematopoiesis by depleting the intestinal microbiota. *Blood*. 09 de febrero de 2017;129(6):729-739. doi: 10.1182/blood-2016-03-708594
- <sup>105</sup> Clarke TB, Davis KM, Lysenko ES, *et al.* Recognition of Peptidoglycan from the Microbiota by Nod1 Enhances Systemic Innate Immunity. *Nat Med*. Febrero de 2010;16(2):228–31. doi: 10.1038/nm.2087
- <sup>106</sup> Zhang D, Frenette PS. Cross talk between neutrophils and the microbiota. *Blood*. 16 de mayo de 2019;133(20):2168-2177. doi: 10.1182/blood-2018-11-844555
- <sup>107</sup> Aarts CEM, Hiemstra IH, Béguin EP, *et al.* Activated neutrophils exert myeloid-derived suppressor cell activity damaging T cells beyond repair. *Blood Adv*. 26 de noviembre de 2019;3(22):3562-3574. doi:10.1182/bloodadvances.2019031609.
- <sup>108</sup> Furumaya C, Martinez-Sanz P, Bouti P, *et al.* Plasticity in Pro- and Anti-tumor Activity of Neutrophils: Shifting the Balance. *Frontiers in Immunology*. 2020;11. doi: 10.3389/fimmu.2020.02100.

- 109 Wu L, Saxena S, Singh RK. Neutrophils in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1224:1-20. doi: 10.1007/978-3-030-35723-8\_1.
- 110 Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol*. Febrero de 2010;125(2 Suppl 2):S33-40. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.017.
- 111 Sivan A, Corrales L, Hubert N, *et al*. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*. 27 de noviembre de 2015;350(6264), 1084–1089. doi: 10.1126/science.aac4255.
- 112 Lu Y, Yuan X, Wang M, *et al*. Gut microbiota influence immunotherapy responses: mechanisms and therapeutic strategies. *J Hematol Oncol*. 29 abril de 2022;15(1):47. doi: 10.1186/s13045-022-01273-9.
- 113 Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature*. 7 de julio de 2016;535(7610):75-84. doi: 10.1038/nature18848
- 114 Zhao Q, Elson CO. Adaptive immune education by gut microbiota antigens. *Immunology*. Mayo de 2018;154(1):28-37. doi: 10.1111/imm.12896.
- 115 Geva-Zatorsky N, Sefik E, Kua L, *et al*. Mining the Human Gut Microbiota for Immunomodulatory Organisms. *Cell*. 23 de febrero de 2017;168(5):928-943.e11. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.022.
- 116 Kostic AD, Chun E, Robertson L, *et al*. Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe*. 14 de agosto de 2013;14(2):207–15. doi: 10.1016/j.chom.2013.07.007.
- 117 Yu B, Wang L, Chu Y. Gut microbiota shape B cell in health and disease settings. *J Leukoc Biol*. Agosto de 2021 Aug;110(2):271-281. doi: 10.1002/JLB.1MR0321-660R.
- 118 Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, *et al*. Regulation of Humoral and Cellular Gut Immunity by Lamina Propria Dendritic Cells Expressing Toll-Like Receptor 5. *Nat Immunol* (2008) 9:769–76. doi: 10.1038/ni.1622
- 119 Li Y, Ye Z, Zhu J, *et al*. Effects of Gut Microbiota on Host Adaptive Immunity Under Immune Homeostasis and Tumor Pathology State. *Frontiers in Immunology*. 2022;13:844335. doi: 10.3389/fimmu.2022.844335.

- <sup>120</sup> Daillere R, Vetizou M, Waldschmitt N, *et al.* Enterococcus Hirae and Barnesiella Intestinihominis Facilitate Cyclophosphamide-Induced Therapeutic Immunomodulatory Effects. *Immunity* (2016) 45:931–43. doi: 10.1016/j.immuni.2016.09.009
- <sup>121</sup> Lee SH, Cho SY, Yoon Y, *et al.* Bifidobacterium bifidum strains synergize with immune checkpoint inhibitors to reduce tumour burden in mice. *Nat Microbiol.* Marzo de 2021;6(3):277–88. doi: 10.1038/s41564-020-00831-6.
- <sup>122</sup> Shiao SL, Kershaw KM, Limon JJ, *et al.* Commensal Bacteria and Fungi Differentially Regulate Tumor Responses to Radiation Therapy. *Cancer Cell* (2021) 39:1202–13.e1206. doi: 10.1016/j.ccell.2021.07.002
- <sup>123</sup> Anderson NM, Simon MC. Tumor Microenvironment. *Curr Biol.* 17 de agosto de 2020;30(16):R921–5. doi: 10.1016/j.cub.2020.06.081.
- <sup>124</sup> Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cell Microbiol.* Julio de 2014;16(7):1024–33. doi: 10.1111/cmi.12308.
- <sup>125</sup> Murphy JF. The human microbiome and the tumor microenvironment. *Explor Immunol.* 29 de agosto de 2022;2(4):581–8. doi: 10.37349/ei.2022.00069
- <sup>126</sup> He, Y.; Huang, J.; Li, Q.; *et al.* Gut Microbiota and Tumor Immune Escape: A New Perspective for Improving Tumor Immunotherapy. *Cancers.* 2022; 14,5317. doi: 10.3390/cancers14215317
- <sup>127</sup> Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development. *Front Immunol.* 12 de enero de 2012;2:98. doi: 10.3389/fimmu.2011.00098.
- <sup>128</sup> Shacter E, Weitzman SA. Chronic inflammation and cancer. *Oncology* (Williston Park). 01 de febrero de 2002;16(2):217–26, 229; discussion 230–2.
- <sup>129</sup> Park HE, Kim JH, Cho NY, *et al.* Intratumoral Fusobacterium nucleatum abundance correlates with macrophage infiltration and CDKN2A methylation in microsatellite-unstable colorectal carcinoma. *Virchows Arch.* Septiembre de 2017;471(3):329–336. doi: 10.1007/s00428-017-2171-6.
- <sup>130</sup> Zhu, G., Su, H., Johnson, C.H. *et al.* Intratumour microbiome associated with the infiltration of cytotoxic CD8+ T cells and patient survival in cutaneous melanoma. *European Journal of Cancer.* Julio de 2021;151:25–34. doi:10.1016/j.ejca.2021.03.053

- <sup>131</sup> Shi Y, Zheng W, Yang K, *et al.* Intratumoral accumulation of gut microbiota facilitates CD47-based immunotherapy via STING signaling. *Journal of Experimental Medicine*. 6 de marzo de 2020;217(5):e20192282. doi: 10.1084/jem.20192282.
- <sup>132</sup> Pérez-Ruiz E, Jiménez-Castro J, Berciano-Guerrero MA, *et al.* Impact of intestinal dysbiosis-related drugs on the efficacy of immune checkpoint inhibitors in clinical practice. *Clin Transl Oncol*. Octubre de 2020;22(10):1778-85. doi: 10.1007/s12094-020-02315-9.
- <sup>133</sup> Derosa L, Routy B, Desilets A, *et al.* Microbiota-Centered Interventions: The Next Breakthrough in Immuno-Oncology? *Cancer Discov*. Octubre de 2021;11(10):2396-412. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-0236.
- <sup>134</sup> Frankel AE, Coughlin LA, Kim J, *et al.* Metagenomic Shotgun Sequencing and Unbiased Metabolomic Profiling Identify Specific Human Gut Microbiota and Metabolites Associated with Immune Checkpoint Therapy Efficacy in Melanoma Patients. *Neoplasia*. Octubre de 2017;19(10):848-855. doi: 10.1016/j.neo.2017.08.004.
- <sup>135</sup> Matson V, Fessler J, Bao R, *et al.* The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science*. 5 de enero de 2018;359(6371):104-108. doi: 10.1126/science.aao3290.
- <sup>136</sup> Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, *et al.* Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2018;359:97–103. doi: 10.1126/science.aan4236.
- <sup>137</sup> Peters BA, Wilson M, Moran U, *et al.* Relating the gut metagenome and metatranscriptome to immunotherapy responses in melanoma patients. *Genome Med*. 2019;11:61. doi: 10.1186/s13073-019-0672-4.
- <sup>138</sup> Andrews MC, Duong CPM, Gopalakrishnan V, *et al.* Gut microbiota signatures are associated with toxicity to combined CTLA-4 and PD-1 blockade. *Nat Med*. Agosto de 2021;27(8):1432-1441. doi: 10.1038/s41591-021-01406-6.
- <sup>139</sup> McCulloch JA, Davar D, Rodrigues RR, *et al.* Intestinal microbiota signatures of clinical response and immune-related adverse events in melanoma patients treated with anti-PD-1. *Nat Med*. 28 de marzo de 2022;28(3):545-556. doi: 10.1038/s41591-022-01698-2.

- <sup>140</sup> Limeta A, Ji B, Levin M, *et al.* Meta-analysis of the gut microbiota in predicting response to cancer immunotherapy in metastatic melanoma. *JCI Insight*. 03 de diciembre de 2020;5(23):e140940. doi: 10.1172/jci.insight.
- <sup>141</sup> Liang H, Jo JH, Zhang Z, *et al.* Predicting cancer immunotherapy response from gut microbiomes using machine learning models. *Oncotarget*. 19 de julio de 2022;13:876-889. doi: 10.18632/oncotarget.28252.
- <sup>142</sup> Bessell CA, Isser A, Havel JJ, *et al.* Commensal bacteria stimulate antitumor responses via T cell cross-reactivity. *JCI Insight*. 23 de abril de 2020;5(8):e135597. doi: 10.1172/jci.insight.135597.
- <sup>143</sup> Mager LF, Burkhard R, Pett N, *et al.* Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy. *Science*. 18 de septiembre de 2020;369(6510):1481-1489. doi: 10.1126/science.abc3421.
- <sup>144</sup> Huang EY, Inoue T, Leone VA, *et al.* Using corticosteroids to reshape the gut microbiome: implications for inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. Mayo de 2015 May;21(5):963-72. doi: 10.1097/MIB.0000000000000332.
- <sup>145</sup> Xu X, Ying J. Gut Microbiota and Immunotherapy. *Front Microbiol*. 01 de julio de 2022;13:945887. doi: 10.3389/fmicb.2022.945887.
- <sup>146</sup> Kostrzewska M, Świdnicka-Siergiejko A, Olszańska D, *et al.* The effect of omeprazole treatment on the gut microflora and neutrophil function. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. Octubre de 2017;41(5):575-584. doi: 10.1016/j.clinre.2017.01.004.
- <sup>147</sup> Wei Z, Cao S, Liu S, *et al.* Could gut microbiota serve as prognostic biomarker associated with colorectal cancer patients' survival? A pilot study on relevant mechanism. *Oncotarget*. 19 de julio de 2016;7(29):46158-46172. doi: 10.18632/oncotarget.10064.
- <sup>148</sup> Trivieri N, Pracella R, Cariglia MG, *et al.* BRAFV600E mutation impinges on gut microbial markers defining novel biomarkers for serrated colorectal cancer effective therapies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 14 de diciembre de 2020;39(1):285. doi: 10.1186/s13046-020-01801-w.
- <sup>149</sup> Sui X, Chen Y, Liu B, *et al.* The relationship between *KRAS* gene mutation and intestinal flora in tumor tissues of colorectal cancer patients. *Ann Transl Med*. Septiembre de 2020;8(17):1085. doi: 10.21037/atm-20-5622.

- 150 Shariati A, Razavi S, Ghaznavi-Rad E, *et al.* Association between colorectal cancer and *Fusobacterium nucleatum* and *Bacteroides fragilis* bacteria in Iranian patients: a preliminary study. *Infect Agent Cancer*. 9 de junio de 2021;16(1):41. doi: 10.1186/s13027-021-00381-4.
- 151 Rye MS, Garrett KL, Holt RA, *et al.* *Fusobacterium nucleatum* and *Bacteroides fragilis* detection in colorectal tumours: Optimal target site and correlation with total bacterial load. *PLoS One*. 7 de enero de 2022;17(1):e0262416. doi: 10.1371/journal.pone.0262416.
- 152 Kim J, Lee HK. Potential Role of the Gut Microbiome In Colorectal Cancer Progression. *Front Immunol*. 7 de enero de 2022;12:807648. doi: 10.3389/fimmu.2021.807648.
- 153 Saifon W, Sensorn I, Trachu N, *et al.* Gastrointestinal microbiota profile and clinical correlations in advanced EGFR-WT and EGFR-mutant non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2022;22(1):963. doi: 10.1186/s12885-022-10050-3.
- 154 Heshiki Y, Vazquez-Urbe R, Li J, *et al.* Predictable modulation of cancer treatment outcomes by the gut microbiota. *Microbiome*. 5 de marzo de 2020;8(1):28. doi: 10.1186/s40168-020-00811-2.
- 155 Wu AH, Tseng C, Vigen C, *et al.* Gut microbiome associations with breast cancer risk factors and tumor characteristics: a pilot study. *Breast Cancer Res Treat*. Julio de 2020;182(2):451-463. doi: 10.1007/s10549-020-05702-6.
- 156 Di Modica M, Gargari G, Regondi V, *et al.* Gut Microbiota Condition the Therapeutic Efficacy of Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *Cancer Res*. 15 de abril de 2021;81(8):2195-2206. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-20-1659.
- 157 Tinsley N, Zhou C, Nahm S, *et al.* Antibiotic use reduces efficacy of tyrosine kinase inhibitors in patients with advanced melanoma and non-small-cell lung cancer. *ESMO Open*. Junio de 2022;7(3):100430. doi: 10.1016/j.esmoop.2022.100430.
- 158 Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, *et al.* New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *European Journal of Cancer*. Enero de 2009;45(2):228–47. doi: 10.1016/j.ejca.2008.10.026.

- <sup>159</sup> Ministerio de la presidencia, justicia, y relaciones con las cortes. BOE-A-2002-22188 Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. Noviembre de 2002. [Acceso el 26 de Marzo 2023]. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2002-22188>
- <sup>160</sup> Controltecnica Instrumentación Científica. División BIO. Nanodrop [Acceso el 12 de Marzo 2023]. Disponible en: <https://www.controltecnica.com/bio/producto/nanodrop-one/>
- <sup>161</sup> NanoString. nCounter® Analysis Systems for Biomarker Validation and Biomarker Development. [Acceso el 3 de Mayo 2024]. Disponible en <https://nanosttring.com/products/ncounter-analysis-system/ncounter-systems-overview/>
- <sup>162</sup> Ferrucci PF, Ascierto PA, Pigozzo J, *et al.* Baseline neutrophils and derived neutrophil-to-lymphocyte ratio: prognostic relevance in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab. *Ann Oncol.* Abril de 2016;27(4):732-8. doi: 10.1093/annonc/mdw016.
- <sup>163</sup> Schmidt H, Suciú S, Punt CJ, *et al.*; American Joint Committee on Cancer Stage IV Melanoma; EORTC 18951. Pretreatment levels of peripheral neutrophils and leukocytes as independent predictors of overall survival in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV Melanoma: results of the EORTC 18951 Biochemotherapy Trial. *J Clin Oncol.* Abril de 2007;25(12):1562-9. doi: 10.1200/JCO.2006.09.0274.
- <sup>164</sup> Proctor MJ, McMillan DC, Morrison DS, *et al.* A derived neutrophil to lymphocyte ratio predicts survival in patients with cancer. *Br J Cancer.* 7 de agosto de 2012;107(4):695-9. doi: 10.1038/bjc.2012.292.
- <sup>165</sup> Capone M, Giannarelli D, Mallardo D, *et al.* Baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and derived NLR could predict overall survival in patients with advanced melanoma treated with nivolumab. *J Immunother Cancer.* 16 de julio de 2018;6(1):74. doi: 10.1186/s40425-018-0383-1
- <sup>166</sup> Cohen JT, Miner TJ, Vezeridis MP. Is the neutrophil-to-lymphocyte ratio a useful prognostic indicator in melanoma patients? *Melanoma Manag.* Agosto de 2020. 7(3):MMT47. doi: 10.2217/mmt-2020-0006.

- 167 US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 5. 27 de noviembre de 2017. Disponible en: [https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic\\_applications/docs/ctcae\\_v5\\_quick\\_reference\\_5x7.pdf](https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_5x7.pdf)
- 168 Class CA, Lukan CJ, Bristow CA, *et al.* “Easy NanoString nCounter data analysis with the NanoTube.” *Bioinformatics*. 2023. 39(1). doi:10.1093/bioinformatics/btac762
- 169 D. Risso, J. Ngai, T. P. Speed, *et al.* Normalization of RNA-seq data using factor analysis of control genes or samples. *Nature Biotechnology*. Septiembre de 2014;32(9):896-902. doi: 10.1038/nbt.2931.
- 170 NanoString Technologies, Inc. nSolver 4.0 Analysis Software User Manual. [Acceso el 10 de Mayo 2023]. Disponible en: [https://nanosttring.com/wp-content/uploads/MAN-C0019-08\\_nSolver\\_4.0\\_Analysis\\_Software\\_User\\_Manual.pdf](https://nanosttring.com/wp-content/uploads/MAN-C0019-08_nSolver_4.0_Analysis_Software_User_Manual.pdf)
- 171 Ritchie ME, Phipson B, Wu D, *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 20 de abril de 2015;43(7):e47. doi: 10.1093/nar/gkv007.
- 172 Amat, R. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. Enero de 2016. [Acceso el 13 de enero de 2024] Disponible en: [https://www.cienciadedatos.net/documentos/18\\_prueba\\_de\\_los\\_rangos\\_con\\_signo\\_de\\_wilcoxon](https://www.cienciadedatos.net/documentos/18_prueba_de_los_rangos_con_signo_de_wilcoxon)
- 173 Caporaso, J., Kuczynski, J., Stombaugh, J. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010;7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- 174 Long GV, Grob JJ, Nathan P, *et al.* Factors predictive of response, disease progression, and overall survival after dabrafenib and trametinib combination treatment: a pooled analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet Oncol*. Diciembre de 2016;17(12):1743-1754. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30578-2.
- 175 Ismail RK, Suijkerbuijk KPM, de Boer A, *et al.* Long-term survival of patients with advanced melanoma treated with BRAF-MEK inhibitors. *Melanoma Res*. 01 de diciembre de 2022;32(6):460-468. doi: 10.1097/CMR.0000000000000832.

- 176 Long GV, Weber JS, Infante JR, *et al.* Overall Survival and Durable Responses in Patients With BRAF V600–Mutant Metastatic Melanoma Receiving Dabrafenib Combined With Trametinib. *JCO*. 10 de marzo de 2016;34(8):871–8. doi: 10.1200/JCO.2015.62.9345.
- 177 Jackson MA, Goodrich JK, Maxan ME, *et al.* Proton pump inhibitors alter the composition of the gut microbiota. *Gut*. 2016 May;65(5):749–56. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310861.
- 178 Ticinesi A, Milani C, Lauretani F, *et al.* Gut microbiota composition is associated with polypharmacy in elderly hospitalized patients. *Sci Rep*. 2017 Sep 11;7(1):11102. doi: 10.1038/s41598-017-10734-y.
- 179 Masnoon N, Shakib S, Kalisch-Ellett L, *et al.* What is polypharmacy? A systematic review of definitions. *BMC Geriatr*. 2017 Oct 10;17(1):230.
- 180 Varghese D, Ishida C, Patel P, *et al.* Polypharmacy. [Actualizado en Febrero de 2024]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532953/>
- 181 Chatziioannou E, Leiter U, Thomas I, *et al.* Features and Long-Term Outcomes of Stage IV Melanoma Patients Achieving Complete Response Under Anti-PD-1-Based Immunotherapy. *Am J Clin Dermatol*. 01 de mayo de 2023;24(3):453–67. doi: 10.1007/s40257-023-00775-7.
- 182 Robert C, Ribas A, Hamid O, *et al.* Durable Complete Response After Discontinuation of Pembrolizumab in Patients With Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol*. 10 de junio de 2018;36(17):1668–74. doi: 10.1200/JCO.2017.75.6270.
- 183 Wind TT, Gacesa R, Vich Vila A, *et al.* Gut microbial species and metabolic pathways associated with response to treatment with immune checkpoint inhibitors in metastatic melanoma. *Melanoma Res*. Junio de 2020;30(3):235–246. doi: 10.1097/CMR.0000000000000656.
- 184 Hu M, Lin X, Sun T, *et al.* Gut microbiome for predicting immune checkpoint blockade-associated adverse events. *Genome Med*. 10 de enero de 2024;16(1):16. doi: 10.1186/s13073-024-01285-9.
- 185 Erkes D.A., Cai W., Sanchez I.M., *et al.* Mutant BRAF and MEK Inhibitors Regulate the Tumor Immune Microenvironment via Pyroptosis. *Cancer Discov*. 2020;10:254–269. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0672.

- 186 Watson A, Goutam S, Stukalin I, *et al.* The prognostic impact of immune-related adverse events in real-world patients with metastatic melanoma treated with single-agent and combination immune checkpoint blockade. *JCO*. Junio de 2022;40(16\_suppl):9542–9542. doi: 10.1200/JCO.2022.40.16\_suppl.9542
- 187 Indini A, Di Guardo L, Cimminiello C, *et al.* Immune-related adverse events correlate with improved survival in patients undergoing anti-PD1 immunotherapy for metastatic melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 01 de febrero de 2019;145(2):511–21. doi: 10.1007/s00432-018-2819-x.
- 188 Davar D, Dzutsev AK, McCulloch JA, *et al.* Fecal microbiota transplant overcomes resistance to anti-PD-1 therapy in melanoma patients. *Science*. 5 de febrero de 2021;371(6529):595–602. doi: 10.1126/science.abf3363.
- 189 Hexun Z, Miyake T, Maekawa T, *et al.* High abundance of Lachnospiraceae in the human gut microbiome is related to high immunoscores in advanced colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 01 de febrero de 2023;72(2):315–26. doi: 10.1007/s00262-022-03256-8.
- 190 Zhang X, Yu D, Wu D, *et al.* Tissue-resident Lachnospiraceae family bacteria protect against colorectal carcinogenesis by promoting tumor immune surveillance. *Cell Host & Microbe*. 8 de marzo de 2023 ;31(3):418-432.e8. doi: 10.1016/j.chom.2023.01.013.
- 191 Pongen YL, Thirumurugan D, Ramasubburayan R, *et al.* Harnessing actinobacteria potential for cancer prevention and treatment. *Microbial Pathogenesis*. 01 de octubre de 2023;183:106324. doi: 10.1016/j.micpath.2023.106324.
- 192 Cascone T, Weissferdt A, Godoy MCB, *et al.* Nodal immune flare mimics nodal disease progression following neoadjuvant immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer. *Nat Commun*. 19 de agosto de 2021;12:5045. doi: 10.1038/s41467-021-25188-0.
- 193 Konuma T, Kohara C, Watanabe E, *et al.* Impact of Intestinal Microbiota on Reconstitution of Circulating Monocyte, Dendritic Cell, and Natural Killer Cell Subsets in Adults Undergoing Single-Unit Cord Blood Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. Noviembre de 2020;26(11):e292–7. doi: 10.1016/j.bbmt.2020.08.009.

- <sup>194</sup> Tang Q, Huang H, Xu H, *et al.* Endogenous Coriobacteriaceae enriched by a high-fat diet promotes colorectal tumorigenesis through the CPT1A-ERK axis. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2024 Enero 20;10(1):5. doi: 10.1038/s41522-023-00472-7.
- <sup>195</sup> Chang H, Mishra R, Cen C, *et al.* Metagenomic Analyses Expand Bacterial and Functional Profiling Biomarkers for Colorectal Cancer in a Hainan Cohort, China. *Curr Microbiol*. 2021 Feb;78(2):705-712. doi: 10.1007/s00284-020-02299-3.
- <sup>196</sup> Wang T, Cai G, Qiu Y, *et al.* Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J*. 2012 Feb;6(2):320-9. doi: 10.1038/ismej.2011.109.
- <sup>197</sup> Campbell CL, Yu R, Li F, *et al.* Modulation of fat metabolism and gut microbiota by resveratrol on high-fat diet-induced obese mice. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2019 Jan 4;12:97-107. doi: 10.2147/DMSO.S192228.
- <sup>198</sup> Rosell-Mases E, Santiago A, Corral-Pujol M, *et al.* Mutual modulation of gut microbiota and the immune system in type 1 diabetes models. *Nat Commun*. 27 de noviembre de 2023;14(1):7770. doi: 10.1038/s41467-023-43652-x.
- <sup>199</sup> Chen G, Cao Z, Shi Z, *et al.* Microbiome analysis combined with targeted metabolomics reveal immunological anti-tumor activity of icaricide I in a melanoma mouse model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 01 de agosto de 2021;140:111542. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111542.
- <sup>200</sup> Wang L, Zheng Y bo, Yin S, *et al.* Causal relationship between gut microbiota and prostate cancer contributes to the gut-prostate axis: insights from a Mendelian randomization study. *Discov Onc*. 2024 Mar 3;15(1):58. doi: 10.1007/s12672-024-00925-1.
- <sup>201</sup> Liu Y, Wu X, Jiang H. High dietary fat intake lowers serum equol concentration and promotes prostate carcinogenesis in a transgenic mouse prostate model. *Nutr Metab*. 2019;16:24. doi: 10.1186/s12986-019-0351-x.
- <sup>202</sup> Oñate FP, Chamignon C, Burz SD, *et al.* *Adlercreutzia equolifaciens* Is an Anti-Inflammatory Commensal Bacterium with Decreased Abundance in Gut Microbiota of Patients with Metabolic Liver Disease. *Int J Mol Sci*. 31 de julio de 2023;24(15):12232. doi: 10.3390/ijms241512232.
- <sup>203</sup> Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, *et al.* Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9351507. doi: 10.1155/2017/9351507.

- 204 Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends Biotechnol.* Septiembre de 2015 Sep;33(9):496–503. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.06.011.
- 205 Preuss I, Hildebrand D, Orth JHC, *et al.* Pasteurella multocida toxin is a potent activator of anti-apoptotic signalling pathways. *Cellular Microbiology.* 2010;12(8):1174–85. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01462.x.
- 206 Lax A. The Pasteurella multocida toxin: a new paradigm for the link between bacterial infection and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2012;361:131-44. doi: 10.1007/82\_2012\_236.
- 207 Björk JR, Bolte LA, Maltez Thomas A, *et al.* Longitudinal gut microbiome changes in immune checkpoint blockade-treated advanced melanoma. *Nat Med.* 2024 Mar;30(3):785–96. doi: 10.1038/s41591-024-02803-3.
- 208 Shinzato T, Yonaha T, Oshiro Y, *et al.* Clostridium ramosum bacteremia: A case series at a general acute care hospital. *J Infect Chemother.* Enero de 2023;29(1):78-81. doi: 10.1016/j.jiac.2022.09.009.
- 209 Lavigne JP, Bouziges N, Sotto A, *et al.* Spondylodiscitis due to Clostridium ramosum infection in an immunocompetent elderly patient. *J Clin Microbiol.* Mayo de 2003;41(5):2223-6. doi: 10.1128/JCM.41.5.2223-2226.2003.
- 210 National Institutes of Health. Ref National Center for Biotechnology Information (NCBI). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 1988. [Acceso el 21 de Enero 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 211 Open Targets Platform. [Acceso el 21 de Enero 2024]. Disponible en: <https://platform.opentargets.org/>
- 212 Villajos IMMSG, Hernández NH, Pérez RPV, *et al.* Diferente expresión de CD45RA y CD45RO por linfocitos T CD4+ en asma intrínseca y extrínseca. *Rev Esp Alergol Inmunol Clín.* Junio de 1998;Vol. 13, Núm. 3:160–6.
- 213 Grimm EA, Sikora AG, Ekmekcioglu S. Molecular Pathways: Inflammation-Associated Nitric-Oxide Production as a Cancer-Supporting Redox Mechanism and a Potential Therapeutic Target. *Clinical Cancer Research.* 14 de octubre de 2013;19(20):5557–63. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1554.

- <sup>214</sup> Zhou J, Kwak KJ, Wu Z, *et al.* PLAUR Confers Resistance to Gefitinib Through EGFR/P-AKT/Survivin Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2018;47(5):1909-1924. doi: 10.1159/000491071.
- <sup>215</sup> Su C, Mo J, Dong S, *et al.* Integrin $\beta$ -1 in disorders and cancers: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Cell Communication and Signaling.* 26 de enero de 2024;22(1):71. doi: 10.1186/s12964-023-01338-3.
- <sup>216</sup> Goldberg MV, Drake CG. LAG-3 in Cancer Immunotherapy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011;344:269–78. doi: 10.1007/82\_2010\_114.
- <sup>217</sup> Cai L, Li Y, Tan J, *et al.* Targeting LAG-3, TIM-3, and TIGIT for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* Diciembre de 2023;16(1):1–34. doi: 10.1186/s13045-023-01499-1.
- <sup>218</sup> Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. *Sci Signal.* 26 de mayo de 2009;2(72):re3. doi: 10.1126/scisignal.272re3.
- <sup>219</sup> Chen Y, Zhang J, Cui W, Silverstein RL. CD36, a signaling receptor and fatty acid transporter that regulates immune cell metabolism and fate. *Journal of Experimental Medicine.* 19 de abril de 2022 Apr 19;219(6):e20211314. doi: 10.1084/jem.20211314.
- <sup>220</sup> Feng WW, Zuppe HT, Kurokawa M. The Role of CD36 in Cancer Progression and Its Value as a Therapeutic Target. *Cells.* 11 de junio de 2023;12(12):1605. doi: 10.3390/cells12121605.
- <sup>221</sup> Aloia A, Müllhaupt D, Chabbert CD, *et al.* A Fatty Acid Oxidation-dependent Metabolic Shift Regulates the Adaptation of *BRAF*-mutated Melanoma to MAPK Inhibitors. *Clin Cancer Res.* 15 de noviembre de 2019;25(22):6852-6867. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-19-0253
- <sup>222</sup> Veillette A. SLAM-Family Receptors: Immune Regulators with or without SAP-Family Adaptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Marzo de 2010 Mar;2(3):a002469. doi: 10.1101/cshperspect.a002469
- <sup>223</sup> Yigit B, Wang N, Herzog R, Terhorst C. SLAMF Receptors: Immune Regulators in Health and Disease. *Clin Immunol.* Julio de 2019;204:3–13. doi: 10.1016/j.clim.2018.10.013.

- 224 Friend R, Bhutani M, Voorhees PM, *et al.* Clinical potential of SLAMF7 antibodies &ndash; focus on elotuzumab in multiple myeloma. *DDDT*. 20 de marzo de 2017;11:893–900. doi: 10.2147/DDDT.S98053.
- 225 O'Connell P, Hyslop S, Blake MK, *et al.* SLAMF7 Signaling Reprograms T Cells toward Exhaustion in the Tumor Microenvironment. *J Immunol*. 01 de enero de 2021;206(1):193-205. doi: 10.4049/jimmunol.2000300.
- 226 Yigit B, Wang N, Ten Hacken E, *et al.* SLAMF6 as a Regulator of Exhausted CD8+ T Cells in Cancer. *Cancer Immunol Res*. Septiembre de 2019;7(9):1485-1496. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0664.
- 227 Sade-Feldman M, Yizhak K, Bjorgaard SL, *et al.* Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma. *Cell*. 01 de noviembre de 2018;175(4):998-1013.e20. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.038.
- 228 Fernández-García V, González-Ramos S, Martín-Sanz P, *et al.* NOD1 in the interplay between microbiota and gastrointestinal immune adaptations. *Pharmacological Research*. 01 de septiembre de 2021;171:105775. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105775.
- 229 Velloso FJ, Trombetta-Lima M, Anschau V, *et al.* NOD-like receptors: major players (and targets) in the interface between innate immunity and cancer. *Biosci Rep*. 9 de abril de 2019;39(4):BSR20181709. doi: 10.1042/BSR20181709.
- 230 Maisonneuve C, Tsang DKL, Foerster EG, *et al.* Nod1 promotes colorectal carcinogenesis by regulating the immunosuppressive functions of tumor-infiltrating myeloid cells. *Cell Rep*. 26 de enero de 2021;34(4) . doi: 10.1016/j.celrep.2020.108677
- 231 Bagheri H, Pourhanifeh MH, Derakhshan M, *et al.* CXCL-10: a new candidate for melanoma therapy? *Cell Oncol*. Enero de 2020;43(3):353–65. doi: 10.1007/s13402-020-00501-z.
- 232 Rivas-Fuentes S, Salgado-Aguayo A, Arratia-Quijada J, *et al.* Regulation and biological functions of the CX3CL1-CX3CR1 axis and its relevance in solid cancer: A mini-review. *J Cancer*. 01 de enero de 2021;12(2):571-583. doi: 10.7150/jca.47022.
- 233 Zheng J, Yang M, Shao J, *et al.* Chemokine receptor CX3CR1 contributes to macrophage survival in tumor metastasis. *Mol Cancer*. 18 de noviembre de 2013;12(1):141. doi: 10.1186/1476-4598-12-141.

- <sup>234</sup> DiNatale A, Kaur R, Qian C, *et al.* Subsets of cancer cells expressing CX3CR1 are endowed with metastasis-initiating properties and resistance to chemotherapy. *Oncogene*. Febrero de 2022;41(9):1337-1351. doi: 10.1038/s41388-021-02174-w.
- <sup>235</sup> Schmall A, Al-Tamari HM, Herold S, *et al.* Macrophage and cancer cell cross-talk via CCR2 and CX3CR1 is a fundamental mechanism driving lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de febrero de 2015;191(4):437-47. doi: 10.1164/rccm.201406-1137OC.
- <sup>236</sup> Vasco C, Rizzo A, Cordiglieri C, *et al.* The Role of Adhesion Molecules and Extracellular Vesicles in an In Vitro Model of the Blood-Brain Barrier for Metastatic Disease. *Cancers (Basel)*. 3 de junio de 2023;15(11):3045. doi: 10.3390/cancers15113045.
- <sup>237</sup> Pan JK, Lin WD, Kuo YL, *et al.* ICAM2 initiates trans-blood-CSF barrier migration and stemness properties in leptomeningeal metastasis of triple-negative breast cancer. *Oncogene*. Septiembre de 2023;42(39):2919-2931. doi: 10.1038/s41388-023-02769-5.
- <sup>238</sup> Ishigami T, Uzawa K, Fushimi K, *et al.* Inhibition of ICAM2 induces radiosensitization in oral squamous cell carcinoma cells. *Br J Cancer*. 22 de abril de 2008;98(8):1357-65. doi: 10.1038/sj.bjc.6604290.
- <sup>239</sup> Yoon KJ, Phelps DA, Bush RA, *et al.* ICAM-2 expression mediates a membrane-actin link, confers a nonmetastatic phenotype and reflects favorable tumor stage or histology in neuroblastoma. *PLoS One*. 2008;3(11):e3629. doi: 10.1371/journal.pone.0003629.
- <sup>240</sup> Tanaka H, Yashiro M, Sunami T, *et al.* ICAM-2 gene therapy for peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma. *Clin Cancer Res*. 15 de julio de 2004;10(14):4885-92. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-0393-03.
- <sup>241</sup> Ihanus E, Uotila LM, Toivanen A, *et al.* Red-cell ICAM-4 is a ligand for the monocyte/macrophage integrin CD11c/CD18: characterization of the binding sites on ICAM-4. *Blood*. 15 de enero de 2007 Jan 15;109(2):802-10. doi: 10.1182/blood-2006-04-014878.
- <sup>242</sup> UniprotKB. ICAM4 - Intercellular adhesion molecule 4 - Homo sapiens (Human). [Acceso el 3 de Febrero 2024]. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q14773/entry>

- 243 Kim M, Lee SJ, Shin S, *et al.* Novel natural killer cell-mediated cancer immunotherapeutic activity of anisomycin against hepatocellular carcinoma cells. *Sci Rep.* 13 de julio de 2018;8(1):10668. doi: 10.1038/s41598-018-29048-8.
- 244 Davis EJ, Johnson DB, Sosman JA, *et al.* Melanoma: What do all the mutations mean? *Cancer.* 2018;124(17):3490–9. doi: 10.1002/cncr.31345.
- 245 Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, *et al.* KIT as a Therapeutic Target in Metastatic Melanoma. *JAMA.* 8 de junio de 2011;305(22):2327–34. doi: 10.1001/jama.2011.746.
- 246 Natali PG, Nicotra MR, Winkler AB, *et al.* Progression of human cutaneous melanoma is associated with loss of expression of c-kit proto-oncogene receptor. *Int J Cancer.* 9 de septiembre de 1992 Sep 9;52(2):197–201. doi: 10.1002/ijc.2910520207.
- 247 Bar-Eli M. Role of Interleukin-8 in Tumor Growth and Metastasis of Human Melanoma. *Pathobiology.* 15 de junio de 1999;67(1):12–8. doi: 10.1159/000028045
- 248 Filimon A, Preda IA, Boloca AF, *et al.* Interleukin-8 in Melanoma Pathogenesis, Prognosis and Therapy—An Integrated View into Other Neoplasms and Chemokine Networks. *Cells.* Enero de 2022;11(1):120. doi: 10.3390/cells11010120.
- 249 Waugh DJJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 01 de noviembre de 2008;14(21):6735–41. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4843.
- 250 Cai G, Zhu L, Chen X, *et al.* TRAF4 binds to the juxtamembrane region of EGFR directly and promotes kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6 de noviembre de 2018;115(45):11531–6. doi: 10.1073/pnas.1809599115.
- 251 Zhong K, Liu X, Ding W, *et al.* TRAF inhibition drives cancer cell apoptosis and improves retinoic acid sensitivity in multiple cancers models. *Discov Oncol.* 30 de junio de 2023;14:117. doi: 10.1007/s12672-023-00703-5.
- 252 Li X, Zeng S, Ding Y, *et al.* Comprehensive Analysis of the Potential Immune-Related Biomarker Transporter Associated With Antigen Processing 1 That Inhibits Metastasis and Invasion of Ovarian Cancer Cells. *Front Mol Biosci.* 10 de diciembre de 2021;8:763958. doi: 10.3389/fmolb.2021.763958.
- 253 Tu Z, Li K, Ji Q, *et al.* Pan-cancer analysis: predictive role of TAP1 in cancer prognosis and response to immunotherapy. *BMC Cancer.* 9 de febrero de 2023;23(1):133. doi: 10.1186/s12885-022-10491-w.

- 254 Li B, Feng Y, Hou Q, *et al.* Antigen Peptide Transporter 1 (TAP1) Promotes Resistance to MEK Inhibitors in Pancreatic Cancers. *Int J Mol Sci.* 28 de junio de 2022;23(13):7168. doi: 10.3390/ijms23137168.
- 255 Xu M., Li L., Liu Z., *et al.* ABCB2 (TAP1) as the downstream target of SHH signaling enhances pancreatic ductal adenocarcinoma drug resistance. *Cancer Lett.* 2013;333:152–158. doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.002
- 256 Ling A, Löfgren-Burström A, Larsson P, *et al.* TAP1 down-regulation elicits immune escape and poor prognosis in colorectal cancer. *Oncoimmunology.* 7 de agosto de 2017; 6(11):e1356143. doi: 10.1080/2162402X.2017.1356143
- 257 Zhu R, Chen YT, Wang BW, *et al.* TAP1, a potential immune-related prognosis biomarker with functional significance in uveal melanoma. *BMC Cancer.* 11 de febrero de 2023;23(1):146. <https://doi.org/10.1186/s12885-023-10527-9>
- 258 Zhang X, Sabio E, Krishna C, *et al.* Qa-1b Modulates Resistance to Anti-PD-1 Immune Checkpoint Blockade in Tumors with Defects in Antigen Processing. *Molecular Cancer Research.* 01 de junio de 2021;19(6):1076–84. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-20-0652.
- 259 Yan L, Yu Z, Wang H, *et al.* Bioinformatics analysis identifies PSMB8 as a key gene in the cutaneous malignant melanoma tumor microenvironment. *Ann Transl Med.* Diciembre de 2022;10(24):1354. doi: 10.21037/atm-22-5761.
- 260 Chen D, Jin C, Dong X, *et al.* Pan-cancer analysis of the prognostic and immunological role of PSMB8. *Sci Rep.* 14 de octubre de 2021;11(1):20492. doi: 10.1038/s41598-021-99724-9.
- 261 Kalaora S, Lee JS, Barnea E, *et al.* Immunoproteasome expression is associated with better prognosis and response to checkpoint therapies in melanoma. *Nat Commun.* 14 de febrero de 2020;11(1):896. doi: 10.1038/s41467-020-14639-9.
- 262 Kiuchi T, Tomaru U, Ishizu A, *et al.* Expression of the immunoproteasome subunit  $\beta 5i$  in non-small cell lung carcinomas. *J Clin Pathol.* Mayo de 2021;74(5):300-306. doi: 10.1136/jclinpath-2020-206618.
- 263 Lee M, Song IH, Heo SH, *et al.* Expression of Immunoproteasome Subunit LMP7 in Breast Cancer and Its Association with Immune-Related Markers. *Cancer Res Treat.* Enero de 2019;51(1):80-89. doi: 10.4143/crt.2017.500.

- 264 Kwon C.H., Park H.J., Choi Y.R., *et al.* PSMB8 and PBK as potential gastric cancer subtype-specific biomarkers associated with prognosis. *Oncotarget*. 2016;7:21454. doi: 10.18632/oncotarget.7411.
- 265 Simson L, Ellyard JI, Dent LA, *et al.* Regulation of Carcinogenesis by IL-5 and CCL11: A Potential Role for Eosinophils in Tumor Immune Surveillance1. *The Journal of Immunology*. 01 de abril de 2007;178(7):4222–9. doi: 10.4049/jimmunol.178.7.4222.
- 266 Gebhardt C, Sevko A, Jiang H, *et al.* Myeloid Cells and Related Chronic Inflammatory Factors as Novel Predictive Markers in Melanoma Treatment with Ipilimumab. *Clinical Cancer Research*. 14 de diciembre de 2015;21(24):5453–9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0676.
- 267 Moreira, A., Leisgang, W., Schuler, G., *et al.* Eosinophilic count as a biomarker for prognosis of melanoma patients and its importance in the response to immunotherapy. *Immunotherapy*. 2017. 9(2), 115–121. doi:10.2217/imt-2016-0138
- 268 Kartolo A, Holstead R, Hopman W, *et al.* Prognosticating role of serum eosinophils on immunotherapy efficacy in patients with advanced melanoma. *Immunotherapy*. Febrero de 2021;13(3):217-225. doi: 10.2217/imt-2020-0265.
- 269 Simon SCS, Hu X, Panten J, *et al.* Eosinophil accumulation predicts response to melanoma treatment with immune checkpoint inhibitors. *Oncoimmunology*. Febrero de 2020;9(1):1727116. doi: 10.1080/2162402X.2020.1727116.
- 270 Onesti CE, Josse C, Boulet D, *et al.* Blood eosinophilic relative count is prognostic for breast cancer and associated with the presence of tumor at diagnosis and at time of relapse. *Oncoimmunology*. 13 de mayo de 2020;9(1):1761176. doi: 10.1080/2162402X.2020.1761176.
- 271 Lin S, Zhang X, Huang G, *et al.* Myeloid-derived suppressor cells promote lung cancer metastasis by CCL11 to activate ERK and AKT signaling and induce epithelial-mesenchymal transition in tumor cells. *Oncogene*. Febrero de 2021;40(8):1476–89. doi: 10.1038/s41388-020-01605-4.
- 272 Huang WY, Lin YS, Lin YC, *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Promote Tumor Aggressiveness in Head and Neck Cancer through Chemokine Ligand 11 and C-C Motif Chemokine Receptor 3 Signaling Circuit. *Cancers (Basel)*. 27 de junio de 2022;14(13):3141. doi: 10.3390/cancers14133141.

- 273 Salcedo R, Young HA, Ponce ML, *et al.* Eotaxin (CCL11) Induces In Vivo Angiogenic Responses by Human CCR3+ Endothelial Cells1. *The Journal of Immunology*. 15 de junio de 2001;166(12):7571–8. doi: 10.4049/jimmunol.166.12.7571
- 274 von Wasielewski R, Seth S, Franklin J, *et al.* Tissue eosinophilia correlates strongly with poor prognosis in nodular sclerosing Hodgkin's disease, allowing for known prognostic factors. *Blood*. 15 de febrero de 2000;95(4):1207–13. doi: 10.1182/blood.V95.4.1207.004k34\_1207\_1213
- 275 Willems M, Scherpereel A, Wasielewski E, *et al.* Excess of blood eosinophils prior to therapy correlates with worse prognosis in mesothelioma. *Front Immunol*. 21 de marzo de 2023;14:1148798. doi: 10.3389/fimmu.2023.1148798.
- 276 Zhu F, Liu P, Li J, *et al.* Eotaxin-1 promotes prostate cancer cell invasion via activation of the CCR3-ERK pathway and upregulation of MMP-3 expression. *Oncology Reports*. 01 de mayo de 2014;31(5):2049–54. doi: 10.3892/or.2014.3060
- 277 Assidi M. Strong prognostic value of SLAMF7 protein expression in patients with lymph node-positive breast cancer. *Oncol Lett*. 19 de octubre de 2022;19;24(6):433. doi: 10.3892/ol.2022.13553.
- 278 Roh SA, Kwon YH, Lee JL, *et al.* SLAMF7 and TREM1 Mediate Immunogenic Cell Death in Colorectal Cancer Cells: Focus on Microsatellite Stability. *Anticancer Res*. Noviembre de 2021;41(11):5431–44. doi: 10.21873/anticancer.15355.
- 279 Cui Z, Sun S, Li J, *et al.* UBE2L3 promotes squamous cell carcinoma progression in the oral cavity and hypopharynx via activating the NF- $\kappa$ B signaling by increasing I $\kappa$ B $\alpha$  degradation. *Cell Biology International*. 2022;46(5):806–18. doi: 10.1002/cbin.11772
- 280 Ma X, Zhao J, Yang F, *et al.* Ubiquitin conjugating enzyme E2 L3 promoted tumor growth of NSCLC through accelerating p27kip1 ubiquitination and degradation. *Oncotarget*. 24 de agosto de 2017;8(48):84193–203. doi: 10.18632/oncotarget.20449
- 281 Liu Y, Song C, Ni H, *et al.* UBE2L3, a susceptibility gene that plays oncogenic role in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat*. Noviembre de 2018;25(11):1363-1371. doi: 10.1111/jvh.12963

- 282 Nurzat Y, Su W, Min P, *et al.* Identification of Therapeutic Targets and Prognostic Biomarkers Among Integrin Subunits in the Skin Cutaneous Melanoma Microenvironment. *Front Oncol.* 30 de septiembre de 2021;11:751875. doi: 10.3389/fonc.2021.751875.
- 283 Kwak M, Erdag G, Leick KM, *et al.* Associations of immune cell homing gene signatures and infiltrates of lymphocyte subsets in human melanomas: discordance with CD163+ myeloid cell infiltrates. *Journal of Translational Medicine.* 28 de agosto de 2021;19(1):371. doi: 10.1186/s12967-021-03044-5.
- 284 Fernandes GNC. Immunotherapy as a Turning Point in the Treatment of Melanoma Brain Metastases. *Discoveries (Craiova).* 30 de junio de 2023;11(2):e169. doi: 10.15190/d.2023.8
- 285 Cohen JV, Tawbi H, Margolin KA, *et al.* Melanoma central nervous system metastases: current approaches, challenges, and opportunities. *Pigment Cell Melanoma Res.* Noviembre de 2016;29(6):627–42. doi: 10.1111/pcmr.12538.
- 286 Wang X, Ji Q, Yan X, *et al.* The Impact of Liver Metastasis on Anti-PD-1 Monoclonal Antibody Monotherapy in Advanced Melanoma: Analysis of Five Clinical Studies. *Front Oncol.* 29 de septiembre de 2020;10:546604. doi: 10.3389/fonc.2020.546604.
- 287 Conway JW, Rawson RV, Lo S, *et al.* Unveiling the tumor immune microenvironment of organ-specific melanoma metastatic sites. *J Immunother Cancer.* 12 de septiembre de 2022;10(9):e004884. doi: 10.1136/jitc-2022-004884.
- 288 Yu J, Green MD, Li S, *et al.* Liver metastasis restrains immunotherapy efficacy via macrophage-mediated T cell elimination. *Nat Med.* Enero de 2021;27(1):152–64. doi: 10.1038/s41591-020-1131-x.
- 289 Francino MP. Antibiotics and the Human Gut Microbiome: Dysbioses and Accumulation of Resistances. *Front Microbiol.* 12 de enero de 2016;6:1543. doi: 10.3389/fmicb.2015.01543.
- 290 Eng L, Sutradhar R, Niu Y, *et al.* Impact of Antibiotic Exposure Before Immune Checkpoint Inhibitor Treatment on Overall Survival in Older Adults With Cancer: A Population-Based Study. *JCO.* 10 de junio de 2023;41(17):3122–34. doi: 10.1200/JCO.22.00074.

- <sup>291</sup> Crespin A, Le Bescop C, de Gunzburg J, *et al.* A systematic review and meta-analysis evaluating the impact of antibiotic use on the clinical outcomes of cancer patients treated with immune checkpoint inhibitors. *Front Oncol.* 2 de marzo de 2023;13:1075593. doi: 10.3389/fonc.2023.1075593.
- <sup>292</sup> Yang J, Li Y, Wen Z, *et al.* Oscillospira - a candidate for the next-generation probiotics. *Gut Microbes.* Enero 2021;13(1):1987783. doi: 10.1080/19490976.2021.
- <sup>293</sup> Gophna U, Konikoff T, Nielsen HB. *Oscillospira* and related bacteria – From metagenomic species to metabolic features. *Environmental Microbiology.* Marzo de 2017 Mar;19(3):835–41. doi: 10.1111/1462-2920.13658.
- <sup>294</sup> Pan ZY, Chang YX, Han N, *et al.* Short-term high-dose gavage of hydroxychloroquine changes gut microbiota but not the intestinal integrity and immunological responses in mice. *Life Sci.* 2021;264:118450. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118450
- <sup>295</sup> Chaput N, Lepage P, Coutzac C, *et al.* Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann Oncol.* 01 de junio de 2017;28(6):1368–79. doi: 10.1093/annonc/mdx108.
- <sup>296</sup> Dora D, Bokhari SMZ, Aloss K, *et al.* Implication of the Gut Microbiome and Microbial-Derived Metabolites in Immune-Related Adverse Events: Emergence of Novel Biomarkers for Cancer Immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 01 de febrero de 2023;24(3):2769. doi: 10.3390/ijms24032769.
- <sup>297</sup> Kekkonen RA, Kajasto E, Miettinen M, *et al.* Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and IFN- $\gamma$  production. *World J Gastroenterol.* 28 de febrero de 2008;14(8):1192–203. doi: 10.3748/wjg.14.1192.
- <sup>298</sup> Diana CR, Humberto HS, Jorge YF. Probiotic Properties of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Aguamiel of *Agave salmiana*. *Probiotics Antimicrob Proteins.* Junio de 2015;7(2):107–17. doi: 10.1007/s12602-015-9187-5.
- <sup>299</sup> Karami S, Roayaei M, Hamzavi H, *et al.* Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens. *Int J Pharm Investig.* 2017;7(3):137–41. doi: 10.4103/jphi.JPHI\_8\_17.

- <sup>300</sup> Zununi Vahed S, Barzegari A, *et al.* *Leuconostoc mesenteroides*-derived anticancer pharmaceuticals hinder inflammation and cell survival in colon cancer cells by modulating NF- $\kappa$ B/AKT/PTEN/MAPK pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 01 de octubre de 2017;94:1094–100. doi: 10.1016/j.biopha.2017.08.033.
- <sup>301</sup> Zahran WE, Elsonbaty SM, Moawed FSM. Lactobacillus rhamnosus ATCC 7469 exopolysaccharides synergizes with low level ionizing radiation to modulate signaling molecular targets in colorectal carcinogenesis in rats. *Biomed Pharmacother*. Agosto de 2017;92:384-393. doi: 10.1016/j.biopha.2017.05.089
- <sup>302</sup> Zhang M, Lv Y, Hou S, *et al.* Differential Mucosal Microbiome Profiles across Stages of Human Colorectal Cancer. *Life*. Agosto de 2021;11(8):831.doi: 10.3390/life11080831.
- <sup>303</sup> Su Q, Jin C, Bo Z, *et al.* Association between gut microbiota and gastrointestinal cancer: a two-sample bi-directional Mendelian randomization study. *Front Microbiol*. 18 de julio de 2023;14:1181328. doi: 10.3389/fmicb.2023.1181328
- <sup>304</sup> Chng KR, Chan SH, Ng AHQ, *et al.* Tissue Microbiome Profiling Identifies an Enrichment of Specific Enteric Bacteria in *Opisthorchis viverrini* Associated Cholangiocarcinoma. *EBioMedicine*. Junio de 2016;8:195-202. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.04.034.
- <sup>305</sup> Fusco W, Lorenzo MB, Cintoni M, *et al.* Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. *Nutrients*. 6 de mayo de 2023;15(9):2211. doi: 10.3390/nu15092211.
- <sup>306</sup> Zaplana T, Miele S, Tolonen AC. *Lachnospiraceae* are emerging industrial biocatalysts and biotherapeutics. *Front Bioeng Biotechnol*. 4 de enero de 2024;11:1324396. doi: 10.3389/fbioe.2023.1324396.
- <sup>307</sup> Gosling J, Moore WEC. *Gemmiger formicilis*, n.gen., n.sp., an Anaerobic Budding Bacterium from Intestines. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 01 de abril de 1975;25(2):202–7. doi: 10.1099/00207713-25-2-202
- <sup>308</sup> Guo H, Chou WC, Lai Y, *et al.* Multi-omics analyses of radiation survivors identify radioprotective microbes and metabolites. *Science*. 30 de octubre de 2020;370(6516):eaay9097. doi: 10.1126/science.aay9097.

- <sup>309</sup> Segain J, de la Bletiere DR, Bourreille A, *et al.* Butyrate inhibits inflammatory responses through NFκB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*. Septiembre de 2000;47(3):397–403. doi: 10.1136/gut.47.3.397.
- <sup>310</sup> Bruera E, Sweeney C. Cachexia and asthenia in cancer patients. *The Lancet Oncology*. 01 de noviembre de 2000;1(3):138–47. doi: 10.1016/S1470-2045(00)00033-4.
- <sup>311</sup> Mo J, Darke AK, Guthrie KA, *et al.* Association of Fatigue and Outcomes in Advanced Cancer: An Analysis of Four SWOG Treatment Trials. *JCO Oncol Pract*. Agosto de 2021;17(8):e1246-e1257. doi: 10.1200/OP.20.01096.
- <sup>312</sup> Hajjar J, Mendoza T, Zhang L, *et al.* Associations between the gut microbiome and fatigue in cancer patients. *Sci Rep*. 12 de marzo de 2021;11(1):5847. doi: 10.1038/s41598-021-84783-9
- <sup>313</sup> Wei H, Xie L, Zhao Y, *et al.* Diverse gut microbiota pattern between mild and severe cancer-related fatigue in lung cancer patients treated with first-line chemotherapy: A pilot study. *Thorac Cancer*. Enero de 2023;14(3):309-319. doi: 10.1111/1759-7714.
- <sup>314</sup> González-Mercado VJ, Lim J, Marrero S, *et al.* Gut microbiota and fatigue in rectal cancer patients: a cross-sectional pilot study. *Support Care Cancer*. 01 de agosto de 2021;29(8):4615–21. doi: 10.1007/s00520-021-06013-2.
- <sup>315</sup> Xiao C, Fedirko V, Beitler J, *et al.* The role of the gut microbiome in cancer-related fatigue: pilot study on epigenetic mechanisms. *Support Care Cancer*. Junio de 2021;29(6):3173-3182. doi: 10.1007/s00520-020-05820-3.
- <sup>316</sup> Robert Caroline, Grob Jean J., Stroyakovskiy Daniil, *et al.* Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 15 de agosto de 2019;381(7):626–36. doi: 10.1056/NEJMoa1904059.