



MEDIKUNTZA
ETA ERIZAINNTZA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE MEDICINA
Y ENFERMERÍA

Trabajo Fin de Grado
Grado en Medicina

Implicación de la microbiota intestinal en la respuesta a la inmunoterapia del cáncer colorrectal

Autor:

Javier Panizo Fra

Director/a:

Estíbaliz Mateo Alesanco

Leticia Abecia

Leioa 27 de abril 2023
©2023, Javier Panizo Fra

ÍNDICE

- 1. ABSTARCT**
- 2. INTRODUCCIÓN**
 - 2.1.CÁNCER DE COLON**
 - 2.2. TERAPIAS CONTRA EL CÁNCER COLORRECTAL**
 - 2.3. MICROBIOTA INTESTINAL**
 - 2.4. CÁNCER COLORRECTAL Y MICROBIOTA INTESTINAL**
- 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**
- 4. MATERIAL Y MÉTODOS**
- 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**
 - 5.1.INFLUENCIA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA TUMORIGÉNESIS DEL CÁNCER COLORRECTAL**
 - 5.1.1. Bacterias que favorecen la carcinogénesis colorrectal**
 - 5.1.1.1. Fusobacterium Nucleatum*
 - 5.1.1.2. Bacteroides Fragilis*
 - 5.1.1.3. Streptococcus Bovis*
 - 5.1.1.4. Enterococcus faecalis*
 - 5.1.1.5. Escherichia coli*
 - 5.1.1.6. Peptostreptococcuss anaerobius*
 - 5.1.1.7. Alistipes*
 - 5.1.2. Bacterias que inhiben la carcinogénesis colorrectal**
 - 5.1.2.1. Bifidobacterium*
 - 5.1.2.2. Lactobacillus*
 - 5.1.2.3. B. Fragilis*
 - 5.1.2.4. Akkermansia muciniphila*
 - 5.1.2.5. Faecalibacterium prausuntzii*
 - 5.2. INTERACCIÓN ENTRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y LA INMUNOTERAPIA DEL CCR**
 - 5.2.1. Especies de bacterias y su influencia en la inmunoterapia**
 - 5.2.1.1. Bifidobacterium y su influencia en la inmunoterapia**
 - 5.2.1.2. Bacteroides y su influencia en la inmunoterapia**

5.2.1.3. *Lactobacillus* y su influencia en la inmunoterapia

5.2.1.4. Género *Alistipes* y su influencia en la inmunoterapia

5.2.1.5. *Akkermansia muciniphila* y su influencia en la inmunoterapia

5.2.1.6. *Enterococcus spp.* y su influencia en la inmunoterapia

5.2.1.7. *E.coli pks+* y su influencia en la inmunoterapia

5.3. ESTRATEGIAS PARA MODULAR LA MICROBIOTA INTESTINAL Y SUS APLICACIONES CLÍNICAS EN INMUNOTERAPIA Y CARCINOMA COLORRECTAL

5.3.1. Probióticos

5.3.2. Prebióticos

5.3.3. Postbióticos

5.3.4. Antibióticos

5.3.5. Trasplante de microbiota fecal

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFÍA

1.ABSTRACT

La microbiota intestinal cumple importantes funciones en el organismo, pero una de las más importantes es la inmunomodulación. Se ha demostrado que la alteración de la microbiota intestinal, puede favorecer que se activen distintos mecanismos que promuevan la inflamación del intestino y la carcinogénesis. El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los cánceres más frecuentes y mortales en el mundo. La etiología de esta enfermedad obedece a una multitud de causas tanto ambientales como genéticas y su tratamiento es muy variado debido a que depende de muchos factores. La inmunoterapia con inhibidores del punto de control inmunitario (IPCI), es un tratamiento novedoso que se utiliza para algunos tipos concretos de CCR. En esta revisión bibliográfica se pretende determinar el efecto de la microbiota intestinal tanto en el desarrollo como en la eficacia del tratamiento de CCR mediante inmunoterapia. Se ha demostrado que la presencia de algunos géneros y especies bacterianas puede favorecer o inhibir el CCR. Además, se ha visto que la microbiota intestinal está implicada en la inmunoterapia de varios tipos de este cáncer, ya que existen especies bacterianas que ayudan en el tratamiento de esta enfermedad. Por ello, la posibilidad de poder manipular la microbiota intestinal mediante tratamientos con probióticos, prebióticos, postbióticos y trasplante de microbiota fecal, puede abrir un nuevo camino para manejar la eficacia de la inmunoterapia en este tipo de cáncer y mejorar de manera global el pronóstico de esta enfermedad.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. CÁNCER DE COLON

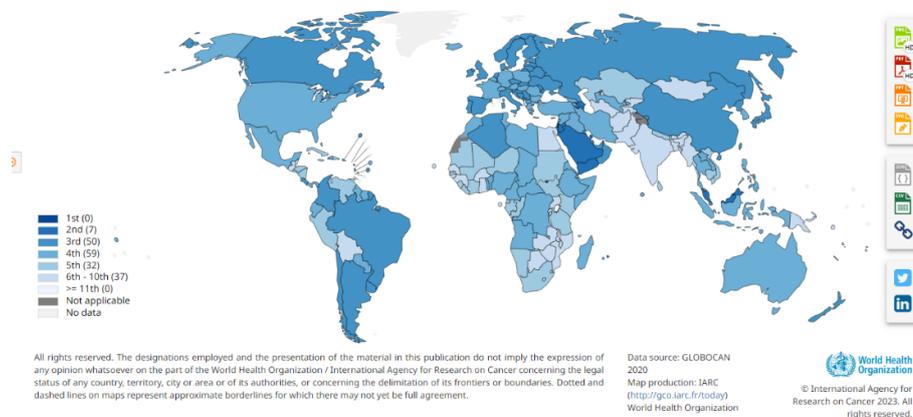
El CCR es el tercer tipo de cáncer más frecuente en todo el mundo; en 2020 se diagnosticaron casi 2 millones de casos, y es la segunda causa más común de muerte por cáncer, provocando casi un millón de muertes al año (**Figura 1**). En la mayoría de los países europeos la tasa de mortalidad de este cáncer se encuentra entre las primeras (3, 35). Concretamente en España en 2022, los cánceres más frecuentemente diagnosticados fueron los de colon y recto (43.370 nuevos casos), mama (34.750), pulmón (30.948), próstata (30.884) y vejiga urinaria (22.295) (36).

Según el último informe proporcionada por el Instituto Nacional de Estadística en 2020, el CCR en España fue la segunda causa de muertes en ambos sexos (11.131 muertes por cáncer de colon). Entre los varones, los responsables del mayor número de fallecimientos fueron el cáncer de pulmón y el CCR, mientras que, en mujeres ocupa el tercer lugar después del cáncer de mama y pulmón. (36). En Estados Unidos es la tercera causa más frecuente de muerte por cáncer tanto en hombres como en mujeres (**Figura 1**).

En todo el mundo, la probabilidad de padecer CCR se sitúa en torno al 4-5% y muchos rasgos o hábitos personales se consideran factores de riesgo, ya que aumentan las probabilidades de desarrollar pólipos o CCR. El principal factor de riesgo del CCR es la edad, pero existen otros factores de riesgo inherentes como los antecedentes personales de CCR o de enfermedad inflamatoria intestinal. El riesgo en pacientes con colitis ulcerosa aumenta un 3,7%, mientras que si padecen la enfermedad de Crohn tienen un riesgo de 2,5% mayor de desarrollar CCR. La inflamación crónica de la enfermedad inflamatoria intestinal suele producir un crecimiento celular anómalo conocido como displasia. Aunque las células displásicas aún no son malignas, tienen más posibilidades de volverse anaplásicas y convertirse en un tumor. El aumento del riesgo debido a los antecedentes familiares puede derivarse de mutaciones hereditarias o del entorno (25).

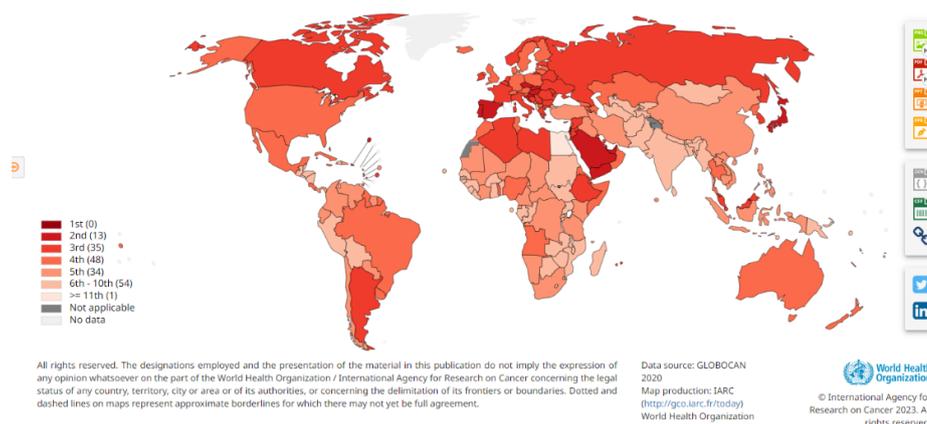
A)

Ranking (Colorectum,), estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, both sexes, all ages (excl. NMSC)



B)

Ranking (Colorectum,), estimated age-standardized mortality rates (World) in 2020, both sexes, all ages (excl. NMSC)



C)

Ranking (Colorectum,), estimated age-standardized mortality rates (World) in 2020, both sexes, all ages, WHO Europe (excl. NMSC)

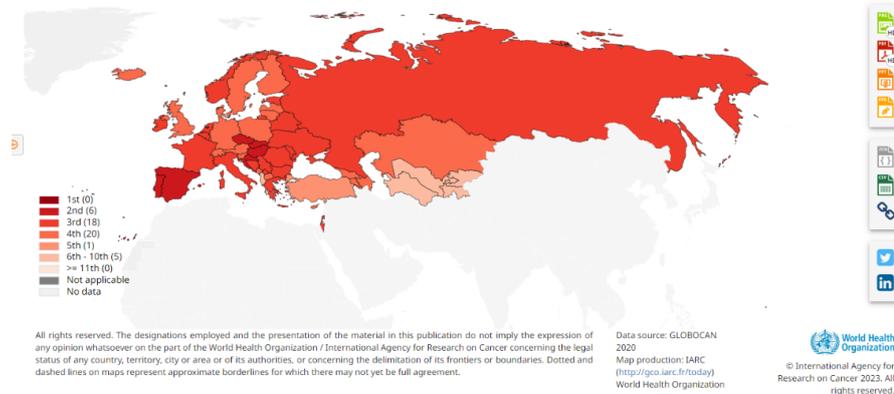


Figura 1: Incidencia (A) y tasa de mortalidad (B) por CCR en el mundo y mortalidad según sexo y edad en Europa (C) (35).

En cualquier caso, la mortalidad de cáncer de colon parece que evoluciona de forma más rápida que en otros tumores debido también a los cambios en el estilo de vida y en la dieta. Entre estos se incluye el alcohol, el tabaco, la obesidad, el sedentarismo y el seguir una dieta no saludable (36). La mayoría de los casos de CCR son esporádicos y se desarrollan lentamente pero aproximadamente el 5% de los casos de CCR son hereditarios y están estrechamente relacionados con el síndrome de Lynch, CCR hereditario no polipósico. Se cree que la tumorigénesis colorrectal es un proceso de múltiples pasos. Se ha considerado una secuencia adenoma-carcinoma que puede tardar varios años en producirse. La tumorigénesis colorrectal pasa por una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas, como mutaciones somáticas, inestabilidad cromosómica, inestabilidad de microsatélites y metilación del ADN, así como acetilación de histonas, que conducen a la activación de oncogenes y a la inactivación de genes supresores de tumores (3).

En la **Figura 2** se observa cómo evolucionan los pólipos adenomatosos hacia displasia grave que se convierte en un pólipo precanceroso y de ahí al adenocarcinoma y como éste puede comenzar a extenderse hacia capas más profundas de la pared intestinal (34).

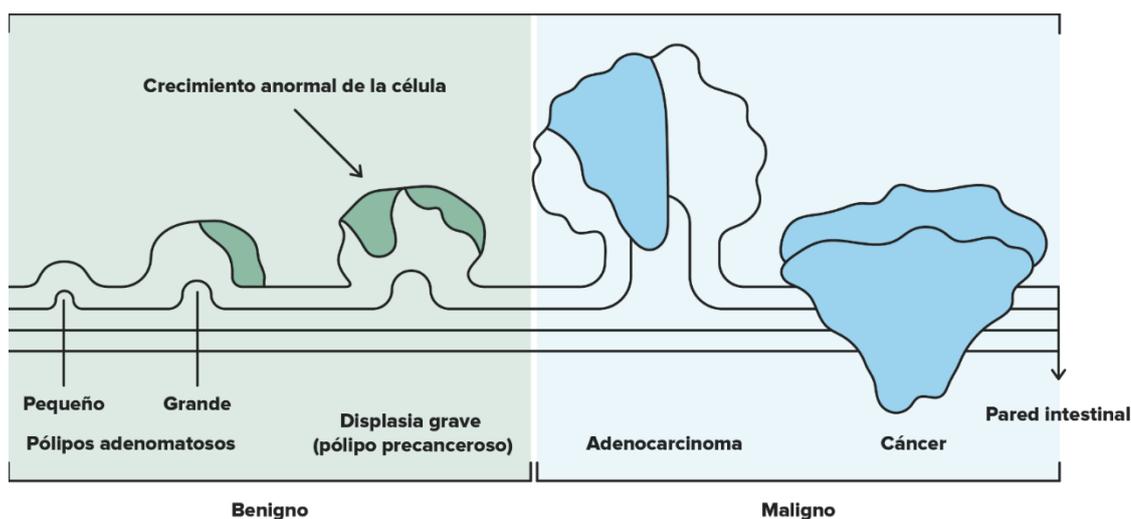


Figura 2: Progresión del CCR, desde pólipos adenomatosos hasta adenocarcinoma (34).

Los síntomas del CCR pueden ser vagos e inespecíficos y pueden ser producidos por el tumor primario o por las metástasis cuando ya existe un diagnóstico avanzado (36):

- Tumor primario: Cambios en el hábito intestinal como estreñimiento, diarrea o ritmo alternante, eliminación de moco y/o sangre en las heces, dolor abdominal o pélvico. Los síntomas relacionados con una obstrucción intestinal son ausencia de deposición, náuseas y vómitos, y dolor cólico abdominal.
- Metástasis: Ictericia, ascitis, disnea, dolor óseo, dolor abdominal, entre otros, dependiendo del órgano en el que se localizan las metástasis.
- También puede existir anemia, por sangrado crónico, y/o un síndrome constitucional, es decir, disminución del apetito, cansancio y pérdida de peso.
- Los síntomas de alarma que hacen sospechar un CCR son la alteración del ritmo intestinal, el dolor abdominal y la rectorragia o hematoquecia.

En la exploración médica los signos que se detectan pueden ser ninguno o alguno de los siguientes: nódulos, masas en el abdomen, tumor rectal en el tacto rectal, organomegalias, ascitis y adenopatías (36).

En los estudios de Le et al. (44) y Overman et al. (45) se ha visto que los tumores con alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H) muestran mejores tasas de respuesta a los IPCI en comparación con los tumores con estabilidad de microsatélites (MSS). El fenotipo del tumor MSI-H está causado por deficiencias en la reparación de errores de emparejamiento del ADN (dMMR), que desencadenan la generación de mutaciones con cambio, desplazamiento o desfase del marco de lectura (frameshift mutation) en varios loci del genoma. Estas mutaciones pueden dar lugar a neoantígenos en las células tumorales que estimulan respuestas inmunitarias en los pacientes (46). En consecuencia, el CCR con MSI-H se asocia a menudo con subtipos de CCR con fenotipo metilador CpG (30). Por tanto, los tumores MSI-H presentan características relacionadas con la inmunidad, incluyendo una mayor infiltración de células inmunes, la regulación al alza de genes relacionados con la inmunidad y una mayor inmunogenicidad. Los IPCI presentan una baja tasa de eficacia en los tumores MSS. En los tumores MSI-H sólo el 30-50% muestran mejores respuestas terapéuticas (2).

2.2. TERAPIAS CONTRA EL CCR

Los tratamientos actuales para el CCR incluyen la escisión local endoscópica y quirúrgica, la radioterapia, la cirugía extensa para la enfermedad locorregional y metastásica, terapias ablativas locales para las metástasis, la quimioterapia paliativa, la terapia dirigida y la inmunoterapia. Aunque estos tratamientos han duplicado la supervivencia global de los pacientes hasta tres años en los estadios avanzados de la enfermedad, el CCR sigue estando asociado a un mal pronóstico y a tasas muy bajas de supervivencia a largo plazo. El desarrollo y la progresión del CCR son procesos multifactoriales que se asocian también al fallo progresivo de la inmunovigilancia, que es la capacidad natural y/o estimulada por la terapia del sistema inmunitario para controlar la progresión del cáncer. Sin embargo, el papel de la alteración de la vigilancia inmunitaria de la mucosa en el desarrollo del CCR aún no se conoce por completo (10).

La inmunoterapia constituye una importante opción terapéutica y aprovecha las respuestas inmunitarias para crear un efecto antineoplásico (12). Esta terapia incluye los fármacos IPCI, las vacunas contra el cáncer y las células T receptoras de antígenos quiméricos. Las estrategias clásicas de vacunación y las células T con receptores de antígenos quiméricos han mostrado grandes beneficios clínicos pero van acompañadas de una toxicidad grave (11).

En cambio, los IPCI se utilizan para un gran número de tumores sólidos, como el melanoma, el cáncer de células renales, el cáncer hepatocelular, el carcinoma urotelial, el carcinoma de cabeza y cuello, el cáncer de pulmón no microcítico y microcítico, el CCR dMMR o el CCR con MSI-H y el cáncer gástrico (4). En la actualidad, los IPCI que se utilizan en el tratamiento del cáncer, han ejercido un impacto significativo en la supervivencia de pacientes con enfermedades avanzadas. No obstante, el tratamiento con IPCI puede asociarse a toxicidades graves relacionadas con el sistema inmunitario, como la colitis asociada a IPCI (9).

Las terapias de bloqueo de puntos de control han mostrado buenas respuestas en varios tipos de CCR, en particular cuando se combinan con quimioterapia (11).

Hasta el momento, existen dos clases principales de IPCI: la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y los inhibidores del receptor de muerte programada y su ligando 1 (PD-1/PD-L1).

PD-L1 se expresa en las células estromales y tumorales y se une a su receptor PD-1 en los linfocitos T citotóxicos (4). De esta forma inhibe las células T y la producción de citocinas, como IL-2 e IFN- γ , así como la proliferación y diferenciación de células B y la secreción de inmunoglobulinas promoviendo así la tumorigénesis (6). La inmunoterapia anti-PD-L1 y anti-PD-1 se dirige a este complejo y a la inmunosupresión que provoca (4) (**Figura 3**).

La proteína CTLA-4 se sobreexpresa en los linfocitos T reguladores y en los linfocitos T CD4+ y CD8+ activados (4). Los linfocitos T son inducidos a no responder y participan en la regulación negativa de la respuesta inmunitaria. CTLA-4 aparece en abundancia en diversos tipos de cáncer, lo que conduce a un crecimiento tumoral incontrolado (6) (**Figura 4**). Por tanto, los anticuerpos anti-CTLA-4 potencian la inmunidad antitumoral.

A continuación, se presentan las **Figuras 3 y 4 (37)**, en las que se muestra el mecanismo de acción, más en detalle, de anti-PD-L1 y de anti-PD-1 (**Figura 3**) y de anti-CTLA4 (**Figura 4**).

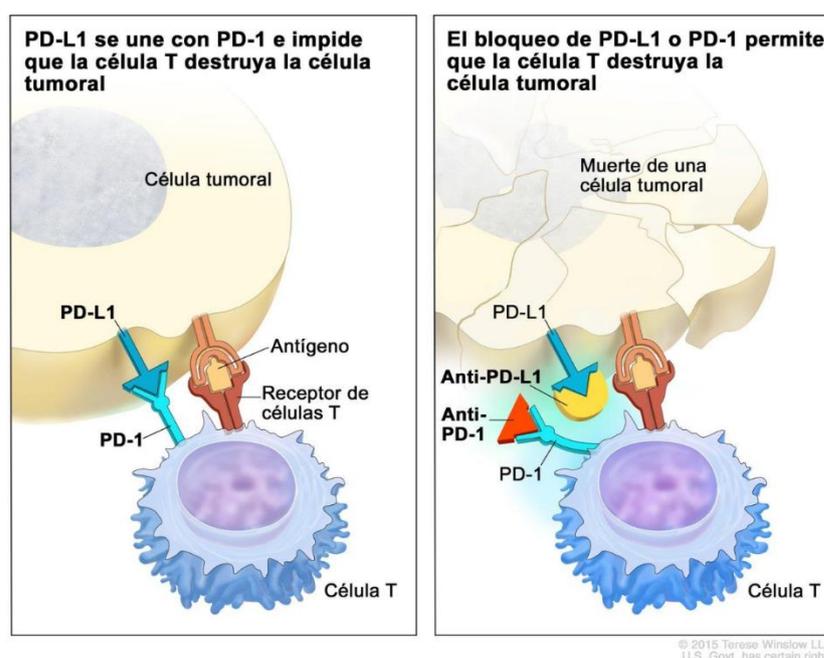


Figura 3: Inhibidor de puntos de control inmunitario. Las proteínas de puntos de control, como PD-L1 (en las células tumorales) y PD-1 (en las células T), ayudan a mantener el control de las reacciones inmunitarias. La unión de PD-L1 a PD-1 impide que la célula T destruya las células tumorales del cuerpo (panel izquierdo). El bloqueo de la unión de PD-L1 con PD-1 mediante un inhibidor de puntos de control inmunitario (anti-PD-L1 o anti-PD-1) permite que las células T destruyan las células tumorales (panel derecho). (37)

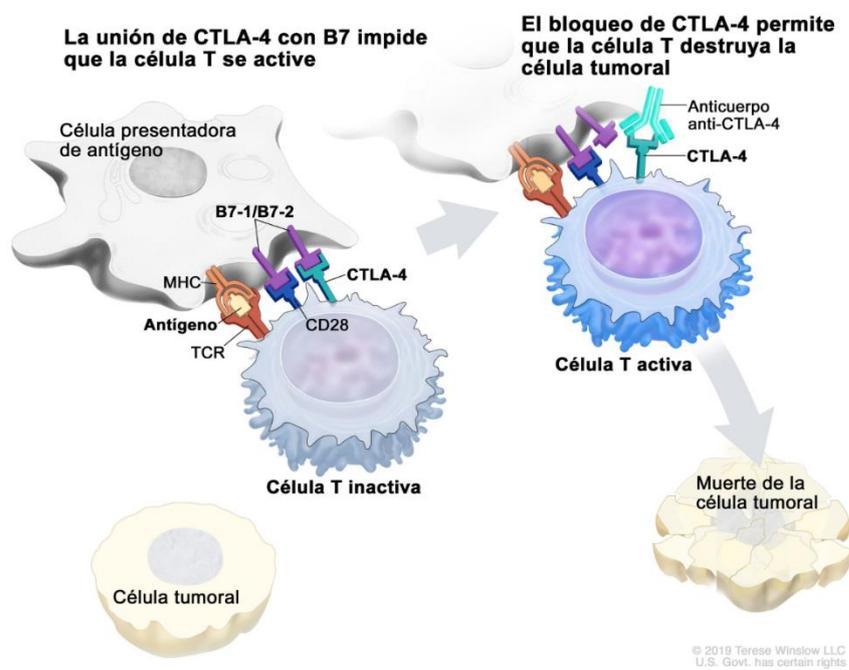


Figura 4: Inhibidor de puntos de control inmunitario. Las proteínas de puntos de control, como B7-1/B7-2 en las células presentadoras de antígeno y CTLA-4 en las células T, ayudan a mantener bajo control las reacciones inmunitarias. Cuando el receptor de las células T (TCR) se une al antígeno y a las proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la célula presentadora de antígeno y CD28 se une a B7-1/B7-2 en la célula presentadora de antígeno, es posible que se active la célula T. Sin embargo, la unión de B7-1/B7-2 con CTLA-4 mantiene las células T inactivas de manera que no pueden destruir las células tumorales del cuerpo (panel izquierdo). El bloqueo de la unión de B7-1/B7-2 con CTLA-4 con un inhibidor de puntos de control (anticuerpo anti-CTLA-4) permite que la célula T se active y destruya las células tumorales (panel derecho) (37).

Los fármacos de IPCI aprobados incluyen: (i) anti-CTLA-4: ipilimumab; (ii) anti-PD-L1: nivolumab, durvalumab, avelumab; y (iii) anti-PD-1: atezolizumab y pembrolizumab (4).

Nivolumab e Ipilimumab. Ipilimumab, comercializado con el nombre comercial de YERVOY, es un inhibidor de CTLA-4 que se aprobó para el tratamiento del CCR MSI-H y dMMR, basándose en los resultados del mismo estudio en el que se aprobó la monoterapia con Nivolumab. En un estudio de Overman et al. (47), 82 pacientes dMMR o MSI-H fueron tratados con una combinación de ipilimumab y nivolumab,

seguida de monoterapia con nivolumab, y obtuvieron una razón de probabilidades del 46% (Intervalo de confianza del 95%: 35,58). La combinación de nivolumab e ipilimumab desactiva dos puntos de control diferentes que regulan a la baja la respuesta inmunitaria, lo que se traduce en una mejor respuesta clínica. El ipilimumab tiene una semivida de aproximadamente 15 días y presenta un aclaramiento lineal constante en el tiempo, a diferencia del nivolumab y el pembrolizumab (14).

Pembrolizumab es un inhibidor de PD-1 para el tratamiento de tumores sólidos MSI-H y dMMR irresecables o metastásicos que no responden bien a otras formas de tratamiento. Se comercializa con el nombre de KEYTRUDA y recibió la aprobación acelerada de la Food And Drug Administration (FDA) sobre la base de un estudio en el que participaron 149 pacientes con cáncer MSI-H y dMMR, 90 de los cuales padecían CCR. En este estudio, pembrolizumab mostró una razón de probabilidades del 39,6%, intervalo de confianza del 95%: 31,7, 47,9. Ahamandi et al. (48) han estudiado las propiedades farmacocinéticas (FC) del pembrolizumab y han descubierto que su semivida es de 27,3 días, que presenta un aclaramiento lineal de 0,22 L al día y un volumen de distribución pequeño (14).

Nivolumab, comercializado con el nombre de OPDIVO, es un inhibidor de PD-1 para el tratamiento del CCR MSI-H y dMMR. Al igual que pembrolizumab, nivolumab también recibió la aprobación acelerada de la FDA, basada en un estudio sobre 74 pacientes con CCR MSI-H o dMMR, que mostró una razón de probabilidades del 32%. Bajaj et al. (49) hallaron que la FC de nivolumab es lineal, mostrando un aclaramiento que disminuye con el tiempo, hasta un 25% del valor original, lo que puede estar relacionado con la mejora del estado del cáncer.

Hasta la fecha, sólo los pacientes con CCR de tipo dMMR y MSI-H parecen beneficiarse de la inmunoterapia, lo que ha llevado a la aprobación por parte de la FDA de los IPCI sólo para pacientes con CCR dMMR/MSI-H. Sin embargo, sólo alrededor del 15% de todos los CCR son dMMR/MSI-H (4).

En abril del 2020, Pembrolizumab, Nivolumab y la combinación de Nivolumab e Ipilimumab fueron aprobados por la FDA para el tratamiento de casos de CCR metastásico MSI-H y dMMR que progresan tras el tratamiento con fluoropirimidina, oxaliplatino e irinotecán (14).

2.3. MICROBIOTA INTESTINAL

El microbioma humano está formado por una gran diversidad de microorganismos, entre ellos virus, procariotas como arqueas y bacterias, y eucariotas. Un ser humano adulto alberga el mismo número de células microbianas que sus propias células humanas y la colonización por estos microorganismos comienza desde la gestación situándose más del 95% de esta microbiota en el tracto gastrointestinal (50). Concretamente en el estómago el contenido de microorganismos es relativamente bajo debido a los jugos gástricos que generan un ambiente ácido. Sin embargo, la concentración de microorganismos va creciendo a lo largo del intestino delgado, desde el duodeno proximal hasta el íleon terminal, y debido a la motilidad propulsiva del intestino delgado periódicamente se da un aclaramiento de los microorganismos que proliferan en la luz. La población de microorganismos en el colon es mucho mayor y la población viva del colon puede alcanzar un peso variable de 300-600 g (33). La microbiota intestinal se remodela en función de la dieta, el modo de vida, las enfermedades, el envejecimiento, el consumo de fármacos y otros factores ambientales (2).

La mayoría de los taxones microbianos identificados a partir de muestras de heces humanas pertenecen a los filos de Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria y Verrucomicrobiota. Más del 90% de ellos pertenecen a los filos Firmicutes o Bacteroidetes, representados principalmente por los géneros *Veillonella* y *Bacteroides*, respectivamente. Aunque la densidad microbiana de estos dos filos puede diferir entre individuos, la cantidad de genes microbianos que codifican las funciones metabólicas permanece estable. Las comparaciones a gran escala que incluyen muestras de diferentes individuos tomadas de distintos lugares del intestino muestran no solo diferencias entre individuos, sino también entre lugares anatómicos dentro del intestino (2). La disbiosis y la translocación microbiana se han asociado a muchos trastornos de la salud, como inflamaciones, trastornos autoinmunitarios y lesiones precancerosas o cancerosas (4).

La colonización de microorganismos comensales en el tracto gastrointestinal tras el nacimiento es necesaria para la maduración del sistema inmunitario, especialmente el desarrollo del sistema inmunitario de la mucosa intestinal, que influye en los

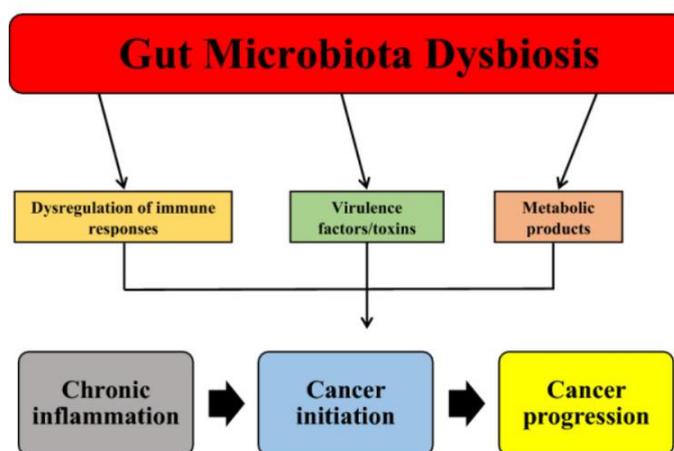
mecanismos de tolerancia del huésped para diferenciar entre bacterias comensales (antígenos casi propios y tolerados) y bacterias patógenas. Las células epiteliales intestinales presentan una barrera física y bioquímica que aísla la luz intestinal del interior del organismo. Además, están en estrecho contacto con microorganismos comensales y son muy sensibles a las señales inmunitarias y microbianas. Estas células y las células de Paneth, (un tipo específico de células epiteliales situadas en la base de las criptas intestinales), secretan péptidos antimicrobianos que funcionan como antibióticos naturales, ya sea matando directamente a las bacterias o inactivándolas. Las células epiteliales y linfoides del intestino delgado expresan "receptores de reconocimiento de patrones", como los receptores tipo Toll, que participan en el reconocimiento de moléculas características conservadas presentes en los microorganismos que se denominan patrones moleculares asociados a patógenos. Esta actuación de los receptores tipo Toll, es responsable del desarrollo normal del sistema inmunitario de la mucosa intestinal (13).

La microbiota intestinal desempeña diversas funciones en el organismo humano como la inmunomodulación que se ha explicado previamente y es responsable de muchos procesos metabólicos y de la biosíntesis. La síntesis de vitaminas constituye una de las funciones clave de la microbiota intestinal, como la riboflavina, la vitamina B1, la biotina, la vitamina K y la cobalamina. También desempeñan un papel crucial en el metabolismo de los hidratos de carbono no digeribles: los transforman en ácidos grasos de cadena corta, como el ácido butírico, el ácido acético y el propiónico, que son producidos por los principales filos del bacterioma, como Bacteroidetes y los Firmicutes. La alteración del proceso metabólico anterior conduce a la modificación de la producción de ácidos grasos de cadena corta y al desequilibrio metabólico general. Además de estas funciones, también intervienen en la producción de ácidos biliares. La microbiota intestinal también produce neuromoduladores, con una implicación significativa en el eje intestino-cerebro, que incluye los sistemas nerviosos periférico y central, así como el sistema nervioso entérico. Muchos trastornos neurológicos y psiquiátricos están estrechamente relacionados con el microbioma intestinal. Según la metagenómica, la alteración del genoma y la disbiosis microbiana pueden causar una predisposición a desarrollar una serie de neoplasias, incluidos trastornos no neoplásicos, como la atopia, alteraciones intestinales funcionales, como

el síndrome del intestino irritable, la enfermedad inflamatoria intestinal y el síndrome metabólico (12).

2.4.CCR Y MICROBIOTA INTESTINAL

La disbiosis de la microbiota intestinal y el aumento de la abundancia de microbiota patógena podrían promover la inflamación crónica y, posteriormente, el inicio y la progresión del cáncer a través de tres mecanismos, incluyendo la desregulación de la respuesta inmune, factores de virulencia/toxinas y productos metabólicos (26) (**Figura 5**).



5).

Figura 5: Disbiosis de la microbiota intestinal y su relación con el CCR..

Un individuo sano presenta un microbioma con alta diversidad microbiana y abundancia de microbiota beneficiosa. Esta eubiosis activa las células T mediante la presentación de antígenos por las células presentadoras de antígenos y estas células T activadas expresan PD-1 y CTLA-4 que previene el daño que el sistema inmunitario podría causar por la activación excesiva de las células T (6).

La mucosa intestinal es una entidad heterogénea compuesta por células epiteliales monocapa, células caliciformes, células de Paneth, células inmunitarias y elementos bioquímicos. Los microorganismos y sus metabolitos pueden activar a las células dendríticas intestinales para que migren a los ganglios linfáticos mesentéricos y activen y diferencien las células T Naive en T reguladoras, células Th17 o células T efectoras. Los linfocitos diferenciados y efectoras pueden migrar de nuevo a la mucosa intestinal o a la circulación sanguínea. Las células T reguladoras secretan la citocina antiinflamatoria IL-10, que inhibe las respuestas de las citocinas proinflamatorias. La

IL-17 secretada por los Th17 induce a las células epiteliales intestinales a secretar agentes antimicrobianos y a desarrollar uniones estrechas. Cuando las células dendríticas intestinales, presentan microorganismos comensales como antígenos en el intestino, las células activadas, que incluyen células T helper, células B, células Th17 y T reguladoras pueden entrar en la circulación sanguínea y promover respuestas inmunitarias contra antígenos idénticos o contra otros antígenos mediante reacciones cruzadas con epítomos similares. En el CCR, la disfunción de la barrera superficial conduce a la infiltración de organismos comensales y sus metabolitos que, a su vez, activan las células mieloides asociadas al tumor e inducen inflamación local. Concretamente, las bacterias patobióticas (organismos con capacidad de inducir en hospederos susceptibles y condiciones ambientales específicas algunas patologías) y patógenas invaden el tejido colorrectal y favorecen la aparición de inflamación y tumorigénesis. Las bacterias portadoras de marcadores genotóxicos promueven la acumulación de lesiones genéticas en las células epiteliales intestinales e inician el desarrollo del cáncer. La inflamación crónica altera la composición de las bacterias comensales y provoca una disbiosis que propaga aún más la inflamación tisular (13). En la **Figura 6** se observan las interacciones de las bacterias de la luz intestinal con las células de la mucosa intestinal y con las células inmunitarias en el inicio del cáncer de colon.

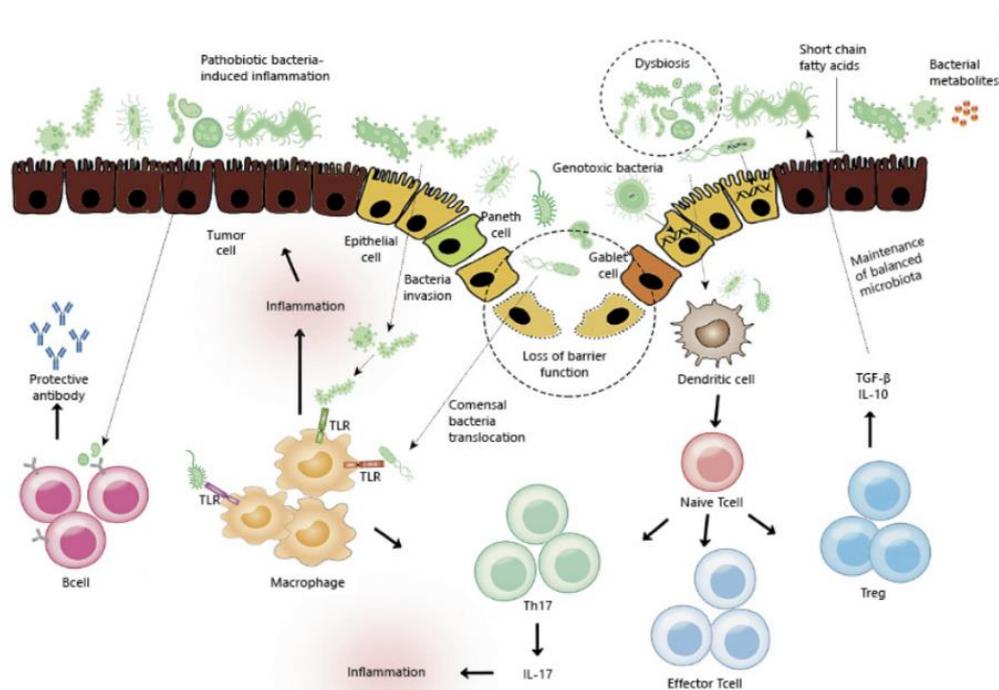


Figura 6: Estructura intestinal, microbiota e inmunidad en el CCR. (13).

El microbioma humano del intestino puede influir en la carcinogénesis colorrectal a través de diferentes tipos de mecanismos (13). En la **Figura 7**, que se presenta a continuación, se pueden observar las distintas interacciones entre la microbiota intestinal y las células del sistema inmune para intervenir en la formación del CCR. Primero se empieza con una inflamación crónica que llevará acompañada, inestabilidad genómica. Esto producirá proliferación celular que por diferentes mecanismos en los que intervienen los microorganismos y el sistema inmune, finalmente acabarán produciendo el CCR.

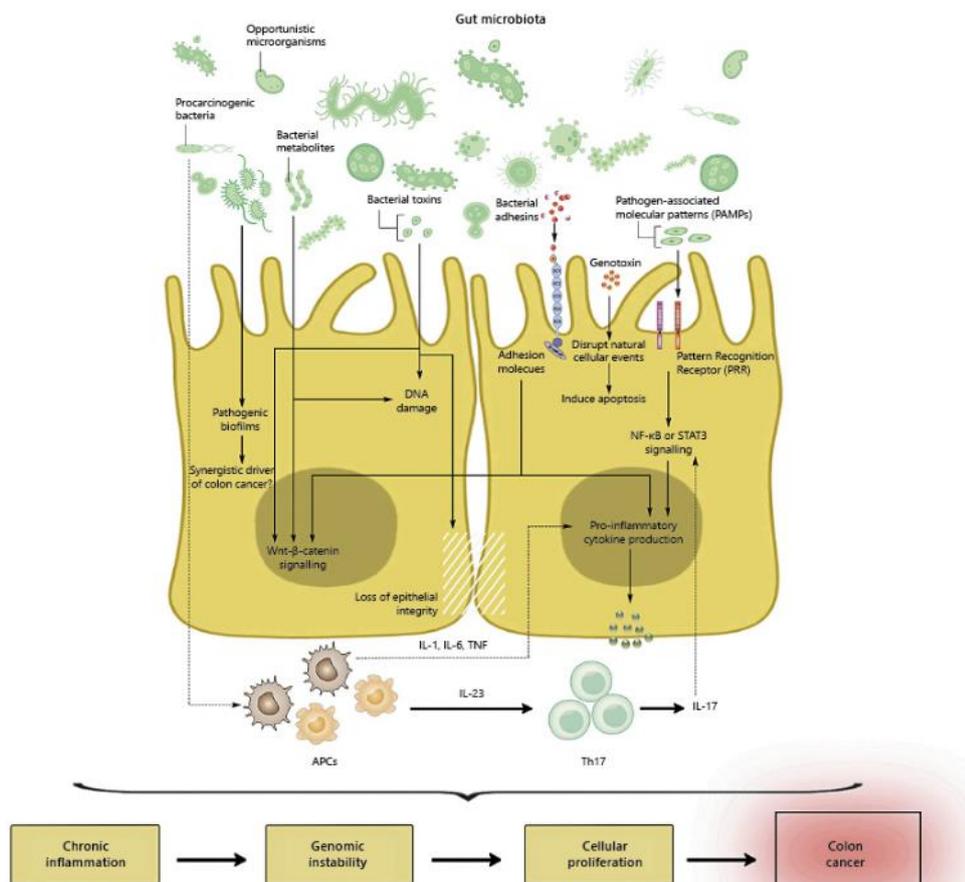


Figura 7: Mecanismos implicados en el CCR. (13).

A principios de la década de 1970, se describió por primera vez en un modelo murino libre de gérmenes que el microbioma intestinal afectaba a la formación del CCR, ya que inocular el carcinógeno 1,2-dimetilhidrazina en el colon de estos ratones se observó que el grado de formación de CCR se reducía significativamente comparándolo con ratones que no estaban libre de microorganismos (58). En aquel momento, no fue posible especificar qué microorganismos causaban este fenómeno. Sin embargo, un experimento similar en el que se utilizaron varios modelos murinos de cáncer de colon (ratones C57BL/6 APCMin/+ de seis semanas de edad y ratones congénitos de tipo salvaje confirmó que la presencia o ausencia de microorganismos intestinales tenía un efecto significativo en la formación de CCR (7).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis planteada dentro de este Trabajo Fin de Grado es la siguiente: la microbiota intestinal es capaz de intervenir en la formación del CCR y de modular los efectos de la inmunoterapia del CCR.

Para probar esta hipótesis se ha planteado como objetivo principal realizar una revisión bibliográfica para conocer el impacto de la composición microbiana intestinal tanto en el desarrollo como en la eficacia del tratamiento de CCR mediante inmunoterapia. Para abordar este objetivo general se proponen los siguientes objetivos secundarios: i) analizar la posibilidad de manipulación de la microbiota intestinal del ser humano y ii) demostrar si la modificación de la microbiota puede mejorar la eficacia de la inmunoterapia del CCR.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una búsqueda de trabajos científicos en PubMed, la base de datos de MEDLINE de acceso libre y especializada en ciencias de la salud. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

En una primera búsqueda se utilizaron las palabras o descriptores “*microbiota gut*” “*immunotherapy*” y “*colorectal cancer*” y se obtuvieron 124 resultados. A continuación, se añadieron los criterios de selección “*free full text*” “*english*” y “*español*” reduciéndose de esta forma a 91 resultados. Se seleccionaron los documentos de “*review*” y “*systematic review*” quedando 53 artículos. Se descartaron los artículos anteriores a 2018, resultando 47 artículos.

A continuación, se excluyeron 10 trabajos más centrados en la inmunoterapia y el cáncer de colon sin relacionarlos con la microbiota intestinal. Además, se excluyeron 14 trabajos que no estaban centrados en el cáncer de colon.

En una primera selección de artículos se obtuvieron 23.

Por otra parte, se realizó otra búsqueda usando las palabras en inglés “*bifidobacterium*” “*immunotherapy*” y “*colorectal cancer*” con los filtros “*english*”

y “español” y “free full text” y se obtienen siete artículos de los cuales se seleccionaron dos en los que se encuentra información sobre el género *Bifidobacterium* y su relación con el cáncer colorrectal.

Además escribiendo las palabras en inglés “immunotherapy”, “colorectal cancer” y “lactobacillus” y “free full text” en el buscador de PubMed con los filtros “english” y “español” se encontraron nueve artículos. Se eliminaron los anteriores a 2019 y resultaron siete de los cuales se escogieron los dos que tenían relación con inmunoterapia y no tanto con otros tratamientos del cáncer de colon.

En una siguiente búsqueda de artículos se utilizaron las palabras “immunotherapy” “colorectal cancer” “immune checkpoint inhibitors” añadiendo los filtros “english” y “español” y “free full text” y “review” y “systematic review”. También se descartaron los artículos anteriores a 2021. Obtuvimos 123 resultados y se seleccionaron dos artículos, para necesarios para añadir más información acerca de la inmunoterapia más actual.

Igualmente se realizó otra búsqueda con el objetivo de encontrar literatura reciente de 2023. Se llevó a cabo mediante los términos “microbiota gut” “immunotherapy” “colorectal cancer” y con los filtros “english” y “español” y “free full text” y “review” y “systematic review”. Se descartaron todos los artículos previos a 2023 y se obtuvieron 9 artículos. De ellos se incorporan al trabajo actual dos, que estaban más centrados en la inmunoterapia con IPCI y el CCR en concreto, debido a que había algunos que trataban más sobre otros tipos de cánceres. Asimismo, y como última búsqueda se encontraron dos artículos más, uno en la plataforma Scielo sobre *A. muciniphila* y otro en la plataforma Elsevier sobre generalidades de la microbiota intestinal. Finalmente, la bibliografía asciende a 33 artículos.

También se han consultado páginas web de actualidad como es la Organización mundial de la salud, más concretamente el apartado del observatorio global del cáncer para obtener los mapas de frecuencia del cáncer colorrectal. Se revisó también la página web de La Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), en el apartado del cáncer colorrectal en España para obtener datos estadísticos. Se revisó la página web del Hospital Clinic de Barcelona. Por último, se obtuvo información acerca del mecanismo de acción de los IPCI en la página del instituto nacional del cáncer en NIH.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. INFLUENCIA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA TUMORIGÉNESIS DEL CCR.

Actualmente se han ido identificando multitud de microorganismos que están relacionados con el CCR y las interacciones que estos tienen con el sistema inmune del hospedador. La mayoría de estos microorganismos corresponden a bacterias y en las **Tablas 1 y 2** se recogen, respectivamente, las bacterias que promueven la formación de CCR y las que lo inhiben (7, 11).

Tabla 1: Especies bacterianas promotoras de CCR

| Nombre de la bacteria | Datos generales | Efecto |
|--|---|--|
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> | Bacteria anaerobia Gram negativa | Produce colitis y CCR |
| <i>Bacteroides fragilis</i> enterotoxigénica | Bacteria anaerobia Gram negativa | Produce colitis y CCR |
| <i>Streptococcus bovis</i> | Bacteria Anaerobia facultativa Gram positiva | Produce colitis y CCR |
| <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> | Bacteria Anaerobia Gram positiva | Produce CCR |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Bacteria Anaerobia facultativa Gram positiva | Produce colitis y CCR |
| <i>Escherichia coli</i> | Bacteria Anaerobia facultativa Gram negativa | Se han asociado con la enfermedad inflamatoria intestinal humana y el CCR |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | Bacteria microaerófila Gram negativa | Produce colitis y CCR |
| <i>Helicobacter pylori</i> | Bacteria capnófilo Gram negativa | Induce cáncer gástrico y posible asociación con CCR |
| <i>Mycobacterium avium</i> | Micobacteria microaerobia Gram positiva | Induce enfermedad inflamatoria intestinal y tiene una posible asociación con CCR |
| <i>Bilophila wadsworthia</i> | Bacteria bacilo sacarolítico anaerobio Gram negativa | Posible asociación con CCR y causa inflamación |

Tabla 2: Microorganismos inhibidores del CCR.

| Nombre de la bacteria | Datos generales | Funciones en colitis y CCR |
|---|---|--|
| <i>Akkermansia muciniphila</i> | Gram negativa estrictamente anaerobia | Inhibe la colitis inducida por dextrano sulfato de sodio y el CCR |
| <i>Clostridium butyricum</i> | Anaerobio Gram positiva productor de butirato | Inhibe colitis y CCR |
| <i>Odoribacter splanchnicus</i> | Gram negativa estrictamente anaerobia | Inhibe colitis y CCR |
| Nontoxicogenic <i>Bacteroides fragilis</i> | Bacilos anaerobios Gram negativas | Inhibe colitis y CCR |
| <i>Bacteroides</i> sp. 4_1_36 | Bacilos anaerobios Gram negativas | Inhibe la colitis inducida por dextrano sulfato y se asocia negativamente al CCR |
| <i>Bacteroides</i> sp. D20 | Bacilos anaerobios Gram negativas | Inhibe la colitis inducida por dextrano sulfato y se asocia negativamente al CCR |
| <i>Bacteroides uniformis</i> | Bacilos anaerobios Gram negativas | Inhibe la colitis inducida por dextrano sulfato y se asocia negativamente al CCR |
| <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> | Anaerobia y Gram positiva, es una de las bacterias comensales más abundantes e importantes del intestino humano | La abundancia de esta bacteria se asocia negativamente con la tumorigénesis del colon en múltiples escenarios |
| <i>Holdemanella biformis</i> (humana) and <i>Faecalibaculum rodentium</i> (Homólogo en ratón) | Gram positiva obligatoriamente anaerobia que puede liberar tanto ácidos grasos de cadena corta como ácidos grasos de cadena larga | Inhibe la colitis y el CCR |
| <i>Clostridium immunis</i> | Anaerobia Gram positiva | Inhibe la colitis inducida por dextrano sulfato. Se necesitan más estudios funcionales y clínicos para evaluar el potencial de esta especie como candidata para controlar el desarrollo del CCR. |
| <i>Peptostreptococcus russellii</i> | Anaerobia Gram positiva | Inhibe la colitis inducida por dextrano sulfato. |
| <i>Propionibacterium freudenreichii</i> | Anaerobio Gram positiva aerotolerante que estimula selectivamente el crecimiento de las bifidobacterias probióticas | Inhibe la colitis inducida por dextrano sulfato e induce la apoptosis <i>in vitro</i> de las células del CCR |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> | Anaerobio Gram positiva | Inhibe CCR |
| <i>Lactobacillus coryniformis</i> | Anaerobia facultativa, microaerófila, Gram positiva | Inhibe CCR |

| | | |
|------------------------------------|---|---|
| <i>Pediococcus pentosaceus</i> | Anaerobia Gram positiva | Inhibe CCR |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> | Anaerobia facultativa, microaerófila, Gram positiva | Inhibe CCR |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG | Gram positiva y anaerobia facultativa | Prevención de la proliferación epitelial anormal en pacientes con antecedentes de pólipos y mejoran la barrera de unión hermética del epitelio intestinal Supresión de la progresión y el volumen del tumor en un modelo de ratón de CCR |
| <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 | Gram positiva | Prevención de la proliferación epitelial anormal en pacientes con antecedentes de pólipos y mejoran la barrera de unión hermética del epitelio intestinal Supresión de la progresión y el volumen del tumor en un modelo de ratón de CCR |

5.1.1. Bacterias que favorecen la carcinogénesis colorrectal

En la bibliografía se ha descrito ampliamente el papel de las bacterias intestinales en la tumorigénesis del CCR. Las bacterias pueden promover la tumorigénesis dañando directamente el ADN del huésped, modulando el microambiente inmunitario local y activando las vías del huésped implicadas en la carcinogénesis (19).

5.1.1.1. *Fusobacterium nucleatum*

Esta bacteria Gram-negativa participa en el desarrollo y la progresión tumoral y puede estar relacionada con sus efectos proliferativos e inmunosupresores (25) Un estudio confirmó que los transcritos de *F. nucleatum* aumentaban aproximadamente 400 veces en el tejido tumoral del CCR en comparación con el tejido normal (7). En un estudio en el que se utilizó el modelo de CCR de ratón adenomatous polyposis coli +/-, *F. nucleatum* desarrolló un entorno proinflamatorio que indujo la progresión de la neoplasia en las células epiteliales intestinales y reclutó células inmunitarias infiltrantes del tumor (7).

La abundancia de *F. nucleatum* en el tejido tumoral se correlaciona directamente con un aumento de la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-12, IL-17 o TNF- α (25), lo que concuerda con la regulación al alza del factor nuclear kappa B. Varios mecanismos están implicados en la tumorigénesis del CCR por *F. nucleatum*,

incluidos factores de virulencia, productos del metabolismo, modulación inmunitaria y microARN (26). Además, *F. nucleatum* contribuye a la carcinogénesis de colon liberando péptidos cortos y ácidos grasos de cadena corta, que reclutan células supresoras derivadas de mieloides, que abolen la actividad de las células T CD4+. A su vez, las proteínas bacterianas de adhesión FadA y Fap2 parecen estar muy implicadas en la tumorigénesis debida a *F. nucleatum*. La proteína FadA promueve la tumorigénesis mediante la activación de la señalización WNT/ β -catenina (4). La proteína Fap2 de *F. nucleatum* puede evitar la lisis de células tumorales mediada por células NK. Además, esta proteína Fap2 es capaz de interactuar con el receptor de inmunoglobulina de células T e ITIM (dominio TIGIT) de las células NK y, como resultado, inhibir su potencial citotóxico (25). Por otro lado, *F. nucleatum* potencia la angiogénesis que es una característica distintiva del cáncer y que proporciona oxígeno y nutrientes a las células tumorales para garantizar su crecimiento (26).

Se han hecho estudios que demuestran que la abundancia de *F. nucleatum* en el intestino está asociada específicamente con el CCR dMMR. Lee et al. (51) clasificaron los tumores de CCR dMMR en tumores con alto contenido de *F. nucleatum* y tumores con bajo contenido de *F. nucleatum*. Los tumores con *F. nucleatum*-alto se caracterizan por un mayor crecimiento e invasión tumoral, un microambiente inmune con disminución de células T FoxP3+ a través del tumor y una alta proporción de macrófagos antiinflamatorios en el centro tumoral. Estos hallazgos correlacionan la presencia de *F. nucleatum* con respuestas inmunitarias precancerosas en tumores CCR dMMR (4).

Por otra parte, *F. nucleatum* también está relacionada con la supervivencia del CCR. En un metaanálisis, Gethings-Behncke et al. (52) indicaron que la elevada abundancia de *F. nucleatum* en pacientes con CCR se asociaba a un peor pronóstico. Por ejemplo, se ha descubierto que esta bacteria promueve la resistencia del CCR a la quimioterapia (19). Otros dos metaanálisis confirmaron que *F. nucleatum* intestinal y fecal podría ser un valioso marcador diagnóstico del CCR (26).

Esta bacteria es determinante en la formación y el seguimiento del CCR, y también como posible marcador diagnóstico. Sin embargo, es necesaria la realización de más estudios acerca de ella para conocer bien su papel en esta enfermedad y su tratamiento.

5.1.1.2. *Bacteroides fragilis*

Las especies de *Bacteroides* son bacilos anaerobios Gram-negativos que normalmente son mutualistas y constituyen la parte más importante de la microbiota comensal.

B. fragilis, se clasifica en dos subtipos, que incluyen: *B. fragilis* enterotoxigénico (ETBF) y *B. fragilis* no toxigénico. Se ha informado de que ETBF era considerablemente más abundante en las lesiones precancerosas y cancerosas del CCR que en los controles sanos, y la toxina de *B. fragilis* de la mucosa, podría considerarse un factor de riesgo y un marcador de cribado para el desarrollo del CCR. Dicha toxina es una metaloproteasa dependiente de zinc que interviene en la transducción de señales de las células epiteliales del colon, como las vías Wnt, factor nuclear kappa B y MAPK (26). Esta especie, además desempeña un papel en la promoción de tumores al elevar el transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3) y la respuesta Th17 durante la tumorigénesis del colon. Aunque la activación de STAT3 es necesaria para la tumorigénesis del colon, por sí sola no es suficiente para desencadenarla por ETBF (7). En particular, la activación del factor nuclear kappa B, antes mencionada, dependiente de IL-17 da lugar a la formación de un gradiente proximal a distal de quimiocinas CXCL12 en la mucosa, que media en el reclutamiento de células mieloides inmaduras polimorfonucleares que expresan CXCR2 para provocar paralelamente la tumorigénesis distal del colon mediada por ETBF (7).

Asimismo, Wu et al. (53) descubrieron que la toxina secretada por ETBF, puede estimular la transcripción y traducción del protooncogen c-Myc, desencadenando así una proliferación celular persistente (19).

5.1.1.3. *Streptococcus bovis*

Uno de los factores de riesgo del CCR es la presencia de *S. bovis* en el hospedador. Este coco Gram positivo y anaerobio facultativo normalmente coloniza el tracto gastrointestinal y la aparición de endocarditis o bacteriemia inducida por *S. bovis* es una pista de su implicación en el cáncer de colon. La asociación entre inflamación y carcinogénesis de colon se confirmó cuando se observó la relación entre el potencial proinflamatorio de las proteínas de *S. bovis* y sus propiedades carcinogénicas. Se ha descubierto que *S. bovis* desempeña un papel activo en el desarrollo del CCR, quizá a

través de una secuencia de desarrollo o propagación tumoral basada en la inflamación en la que intervienen la IL-1, la ciclooxigenasa-2 y la IL-8 (7).

5.1.1.4. *Enterococcus faecalis*

La infección por *E. faecalis*, bacteria Gram-positiva, induce daños en el ADN de las células epiteliales intestinales mediante la formación de un superóxido. Así, se ha demostrado que la abundancia de *E. faecalis* aumenta significativamente en los pacientes con CCR en comparación con los individuos sanos. Además, estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que *E. faecalis* puede producir radicales hidroxilo, que son potentes mutágenos que causan roturas del ADN, mutaciones puntuales y entrecruzamiento proteína-ADN, contribuyendo así a la inestabilidad cromosómica y al riesgo de CCR (7).

5.1.1.5. *Escherichia coli*

E. coli es una bacteria comensal Gram-negativa, habitualmente presente en el intestino del ser humano. Sin embargo, algunas cepas pueden estar relacionadas con la aparición de CCR (25). *E. coli* produce la genotoxina colibactina a través del clúster de genes híbridos de la sintetasa peptídica no ribosomal (NRPS)-poliquetasa sintasa (PKS). La colibactina alquila además el ADN e induce roturas de doble cadena, aneuploidía y división incorrecta de las células epiteliales colónicas (11). Por ejemplo, Iyadorai et al. (54) descubrieron que *E. coli pks+* es más frecuente en pacientes con CCR que en casos sanos y que las cepas *E. coli pks+* desempeñan un papel importante en el inicio y desarrollo de tumores. De hecho, se ha observado que *E. coli* podría inducir CCR en ratones deficientes en IL-10, lo que propone que la inflamación es fundamental para la tumorigénesis. Además, *E. coli* patógena puede sintetizar toxinas denominadas ciclomodulinas, entre las que se incluyen el factor inhibidor del ciclo, el factor necrotizante citotóxico, la colibactina y las toxinas distensoras citoléticas, que son genotoxinas que interfieren en el ciclo celular. *E. coli* también promueve la supervivencia de las células tumorales mediante la inducción de la citoquina inhibidora de macrófagos 1, así como una expresión sostenida de (26).

5.1.1.6. *Peptostreptococcus anaerobius*

Esta bacteria Gram-positiva induce un microambiente inmunitario proinflamatorio y promueve la formación de tumores en el intestino aumentando la expresión de citocinas proinflamatorias y reclutando células inmunitarias infiltrantes del tumor, como las células inmunosupresoras derivadas de mieloides. *P. anaerobius* aumenta los niveles de especies reactivas del oxígeno que interactúan con los receptores tipo Toll TLR 2 y TLR4 en las células del colon para promover la síntesis de colesterol y la proliferación celular, causando en última instancia displasia de las células del colon (7).

5.1.1.7. *Alistipes*

Se ha descrito que el género *Alistipes* contribuye a la carcinogénesis colorrectal. Moschen et al. (56) demostraron que la especie *A. finegoldii* promueve el CCR a través de la vía IL-6/STAT 3 (1).

5.1.2. Bacterias que inhiben la carcinogénesis colorrectal

5.1.2.1. *Bifidobacterium*

Este género de bacterias Gram-positivas producen ácido láctico y acetato y se ha visto que su presencia en el intestino parece inhibir el CCR mediante la prevención de infecciones enteropatógenas, la acidificación del medio y la reducción en la producción de ácidos biliares. Las bifidobacterias tienen el potencial de correlacionarse con una supervivencia favorable del CCR mediante el aumento de la respuesta inmune del huésped a las células cancerosas (23).

5.1.2.2. *Lactobacillus*

Es un género de bacterias Gram-positivas, presentes en el intestino. La especie *Lactobacillus coryniformis* mejora el CCR al aliviar la inflamación y los daños en la barrera intestinal (11). Además, se ha demostrado el efecto de las especies *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus* sobre el crecimiento del cáncer en el modelo de cáncer asociado a colitis inducida por azoximetano/dextrano sulfato sódico. La especie *L. fermentum* puede inhibir la formación de tumores colónicos y mitigar la producción de citoquinas proinflamatorias. Además, puede alterar la composición de la microbiota intestinal

reduciendo la presencia de *Bacteroides*. Así pues, los probióticos *Lactobacillus* son beneficiosos para aliviar la progresión del CCR (15).

Por otra parte, las cepas *L. rhamnosus GG* y *Bifidobacterium lactis Bb12* ayudan a prevenir la proliferación epitelial anormal en pacientes con antecedentes de pólipos y mejoran la barrera de unión hermética del epitelio intestinal. Se sugirió que los lactobacilos y las bifidobacterias desempeñan un papel en la supresión de la progresión y el volumen del tumor en un modelo de ratón de CCR (7).

5.1.2.3. *Bacteroides fragilis*

Como ya se ha mencionado previamente, algunas especies, como ETBF, promueven la colitis y el CCR, mientras que otras se han identificado como agentes antitumorales. Tanto en modelos de ratón Wild Type como CCR, el tratamiento con *Bacteroides fragilis no toxigénico* reduce la colitis crónica provocada por bacterias y el desarrollo tumoral (11).

5.1.2.4. *Akkermansia muciniphila*

Es una bacteria Gram-negativa que reside en la capa mucosa y desempeña una función de degradación de la mucina en el intestino humano. Interactúa con el epitelio intestinal en la gestión de la nutrición y controla la obesidad inducida por la dieta mediante la mejora de los perfiles metabólicos (11).

En modelos preclínicos, *A. muciniphila* se asocia con una menor inducción de CCR en ratones receptores de trasplante fecal humano. En particular, *A. muciniphila* estimula la proliferación y la migración de los enterocitos adyacentes a las heridas colónicas, a través de la señalización redox mediada por receptor de formilpéptido 1 y NADPH Oxidasa 1, en las células epiteliales, mejorando así la reparación de las heridas de la mucosa y protegiendo a los ratones de la colitis inducida químicamente. En el modelo de CCR asociado a colitis inducida por azoximetano/dextrano sulfato sódico, el tratamiento con *A. muciniphila* podría atenuar la carcinogénesis al potenciar las células T CD8+ citotóxicas (11).

5.1.2.5. *Faecalibacterium prausnitzii*

Esta bacteria anaerobia Gram-positiva es una de las bacterias comensales más abundantes e importantes del intestino del ser humano. Debido a que es una bacteria clave productora de butirato, la abundancia de esta bacteria se asocia con una menor tumorigénesis del colon en múltiples escenarios (11).

5.2. INTERACCION ENTRE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y LA INMUNOTERPIA DEL CCR

Como ya hemos explicado anteriormente son muchas las interacciones de la microbiota intestinal con la formación de tumores de colon. A continuación, se explica la relación entre la microbiota intestinal y la eficacia de los tratamientos de inmunoterapia para el CCR ya que las últimas investigaciones han confirmado que las interacciones de la microbiota con el huésped pueden influir en la capacidad de respuesta a las inmunoterapias contra el cáncer mediante la modulación de la inmunidad innata y adaptativa (26). Por ejemplo, Tanoue et al. (56) demostraron que la presencia de 11 especies bacterianas provenientes de donantes humanos sanos aumentaba la frecuencia de células T CD8⁺ IFN γ ⁺ colónicas tras la inoculación en ratones libres de microorganismos. Además, el efecto de la terapia anti-PD-1 en ratones injertados con células de adenocarcinoma de colon MC38, se vio notablemente mejorado tras la colonización con estas 11 especies bacterianas (56).

Una microbiota intestinal sana puede activar las células presentadoras de antígenos y éstas activar las células T mediante la presentación de antígenos. Las células T activadas expresan PD-1 y CTLA-4. Una microbiota intestinal sana favorece la unión del anti-PD-1 al PD-1 inhibiendo así la unión del PD-L1 a las células T y ejerciendo indirectamente efectos antitumorales. Esta eubiosis promueve la unión del anti-CTLA-4 al CTLA-4, inhibe la inactivación de las células T y ejerce efectos tumorocidas. La especie bacteriana *B. fragilis* puede potenciar el efecto del Anti-CTLA-4 (6) (**Figura 8**).

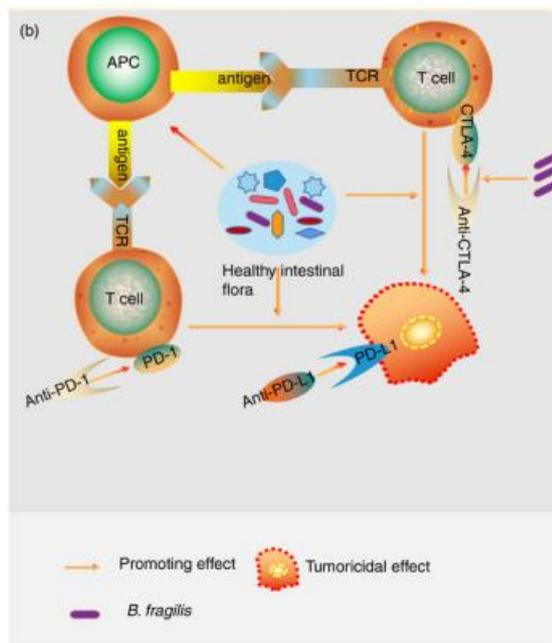


Figura 8 (6): Efectos de la microbiota intestinal en la resistencia a la inmunoterapia.

La microbiota intestinal media en la inmunoterapia anticancerosa colaborando con anti-CTLA-4 y anti-PD-1 por lo que tiene un gran potencial para el tratamiento de tumores mediado por PD-1/PD-L1 (**Figura 8**) (6). En un estudio realizado con modelos murinos se sugirió que la eficacia del tratamiento anti-PD-1 a través de la producción de células T CD8⁺ IFN- γ ⁺ era mayor en los ratones libres de microorganismos +11-mix a los que se administraron por vía oral 11 cepas bacterianas que en los ratones libres de microorganismos +10-mix o puramente libre de microorganismos. Los investigadores realizaron trasplante de microbiota fecal (FMT) de pacientes humanos con cáncer que respondieron a IPCI a ratones portadores de tumores, estériles o tratados con antibióticos y descubrieron que el efecto antitumoral de los anti-PD-1 era mayor en dichos ratones. La microbiota fecal de los pacientes que no respondieron a la IPCI no tuvo este efecto en los ratones (6).

En los tratamientos con inmunoterapia puede darse el escape inmunitario, que se ha identificado con frecuencia en varios tipos de cáncer, incluido el CCR, y lo que supone un importante problema. Una de las principales explicaciones es la inactivación y el agotamiento de las células T relacionadas con el tumor a través de la activación de receptores coinhibidores, los denominados receptores de punto de control inmunitario, en la superficie de las células T, que incluyen PD-1 y CTLA-4. Los hallazgos iniciales

de un estudio, mostraron que el anticuerpo dirigido a CTLA-4, ipilimumab podía tratar a ratones libres de patógenos específicos pero no a ratones libres de microorganismos. Además, antibióticos como la ampicilina, la colistina y la estreptomicina comprometen los efectos antitumorales de este anticuerpo, lo que indica el papel clave de la microbiota intestinal en los resultados de la inmunoterapia (10).

5.2.1. Especies de bacterias y su influencia en la inmunoterapia

Existen diferentes especies de la microbiota intestinal que se han asociado con una mayor eficacia de la inmunoterapia con IPCI, pero los mecanismos subyacentes por los que el microbioma mejora la inmunidad antitumoral no están claros. La composición de la microbiota tiene efectos tanto beneficiosos como perjudiciales sobre el estado de salud del ser humano y la sensibilidad de IPCI podría modularse por la microbiota intestinal (26).

En la **Figura 9** se presenta un esquema que permite dilucidar mejor como son las interacciones de la IPCI con dos especies concretas de bacterias, *Bifidobacterium spp.* y *B. fragilis*, con las células inmunitarias (16). El tratamiento anti-PD-L1 coopera con *Bifidobacterium spp.* residentes, lo que conduce a la activación de las células dendríticas, promoviendo la activación, expansión y función de las células efectoras T. Los anti-CTLA4 promueven el enriquecimiento de *Bacteroides spp.* residentes y potencian la activación de las células dendríticas y efectoras T, al tiempo que suprimen la función de las células T reguladoras. Todos estos mecanismos mejoran la eficacia antitumoral, en contraste con los antibióticos que podrían disminuirla (16).

El género *Bifidobacterium spp.* presente en el intestino facilita que el tratamiento anti-PD-L1 activando como paso final a las células T efectoras que aumentarán su actividad antitumoral. Además, la especie *B. fragilis* puede ser reducido mediante antibioterapia e interactúa con el tratamiento anti-CTLA4 para por un lado inhibir a las células T reguladoras y, por otro lado, activar a las células dendríticas para que estas activen a las células T efectoras y aumenten su actividad antitumoral (**Figura 9**).

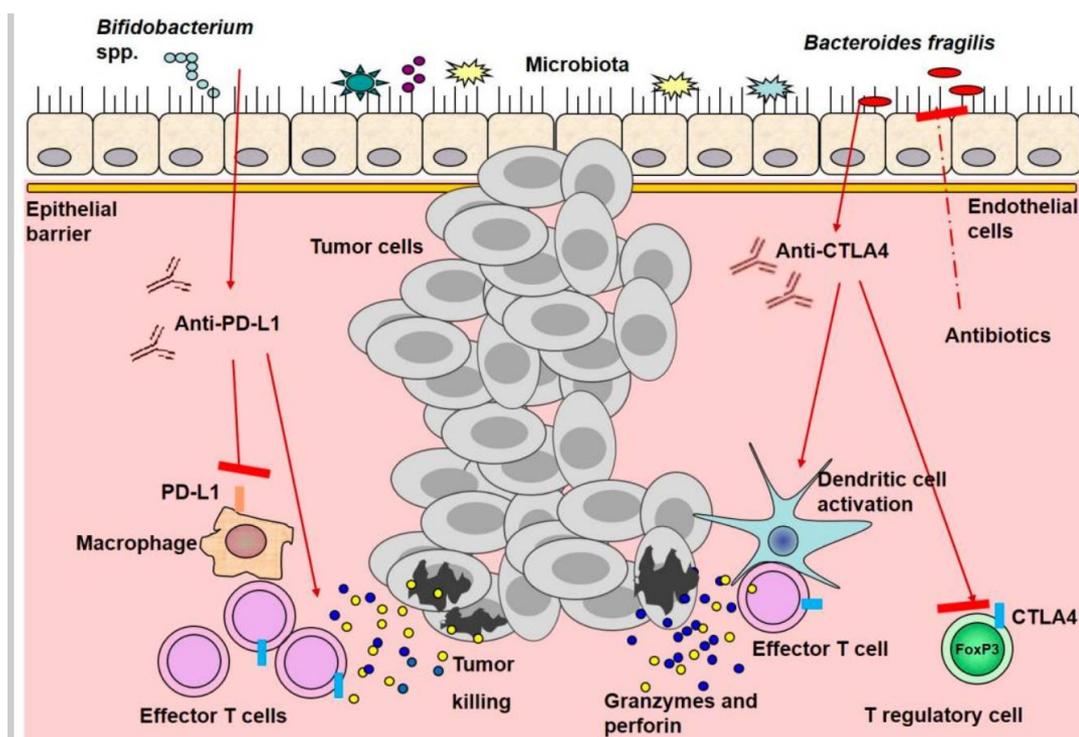


Figura 9: Interacciones de los inhibidores de puntos de control inmunitarios con la microbiota y las células inmunitarias (16). Las flechas rojas representan estimulación, mientras que las flechas rojas con rectángulo rojo representan inhibición (16).

Como se ha visto, hay ciertas bacterias presentes en la microbiota intestinal que ejercen una gran regulación sobre la inmunoterapia y el sistema inmune, ahora se van a tratar más en profundidad algunos de los géneros o especies de estas bacterias que presentan interacciones más relevantes en los tratamientos.

5.2.1.1. *Bifidobacterium* y su influencia en la inmunoterapia

Se ha observado que un aumento significativo de la abundancia de *Bifidobacterium* podía elevar los niveles de linfocitos infiltrantes de tumores (26) y potenciar la activación de las células T CD8+ y las funciones de las células dendríticas reunidas en el microambiente tumoral, produciendo en consecuencia este efecto antitumoral combinado con PD-L1 (**Figura 9**) (6). Además, se ha demostrado que la administración oral de *Bifidobacterium* induce el mismo efecto que el tratamiento anti-PD-L1 pero que la combinación de ambos tratamientos inhibe casi por completo el crecimiento tumoral (6). También se ha descubierto que un aumento de las bifidobacterias dentro del tumor mejoraría la función de las células NK y, por tanto, potenciaría el efecto terapéutico de los bloqueantes PD-1 (31).

Recientemente, un estudio indicó que las bifidobacterias podrían acumularse en el microambiente tumoral y convertir los tumores no respondedores en respondedores a la inmunoterapia con anti-CD47 de forma dependiente del IFN y del estimulador de los genes del interferón (STING) (26).

El estudio de Mager et al. (42), se realizó para determinar si la composición de la microbiota puede potenciar la eficacia de la IPCI en tumores MSS. El estudio se centró en el análisis del microbioma de tumores colorrectales de ratón inducidos por azoximetano/dextrano sulfato sódico, que respondieron a IPCI, que reveló que *Bifidobacterium pseudolongum* era más abundante en los respondedores en comparación con los no respondedores. Se probó en ratones portadores de tumores libre de microorganismos que al inyectar células MC38 del CCR con esta cepa bacteriana y tratarlas con anticuerpos IPCI, provocó la reducción del tamaño del tumor y el aumento de la activación de células T en estos animales. Sorprendentemente, la sustitución de *B. pseudolongum* por inosina, un metabolito producido por esta bacteria, en combinación con anti-CTLA4 y CpG (un compuesto inmunoestimulador común contra el cáncer) condujo a resultados similares en este modelo de cáncer Mager et al. (42).

Por tanto, como se ha mencionado, hay distintos estudios que apoyan que el género *Bifidobacterium* combinado con IPCI tienen efectos antitumorales para el CCR y que facilita la respuesta al tratamiento.

5.2.1.2. *Bacteroides* y su influencia en la inmunoterapia

Este género presenta diferentes interacciones con la inmunoterapia. En el estudio de Roberti et al. (41), utilizaron un modelo de ratón de xenoinjerto de CCR, y consiguieron retrasar el crecimiento tumoral en ratones tratados con oxaliplatino más nivolumab en combinación con las especies de bacterias *B. fragilis* o *E. ramosum*. Estas bacterias indujeron la producción de IL-1 β e IL-12p70 por las CD en el microambiente tumoral. Esto, a su vez, impulsó la diferenciación de las células T en células Th1, provocando una respuesta contra el tumor (41).

Por otro lado, en otra investigación se demostró que en un modelo de cáncer de colon de fenotipo metilador de CpG, la colonización por ETBF aumenta el número de células

T CD8⁺ productoras de IFN γ que infiltran el tumor en comparación con los ratones APCMin/+ ETBF, y que el anti-PD-L1 es eficaz para reducir la carga tumoral en estos animales (30).

Otros estudios mostraron que la microbiota intestinal se modificó en diferentes modelos de ratones, incluido un modelo de CCR, tratados con anti-CTLA-4, como lo demuestra el aumento relativo de Bacteroidales y Burkholderiales y la reducción de Clostridiales. La administración oral de *B. fragilis* con *Bacteroides thetaiotaomicron* o *Burkholderia cepacia* mejoró la eficacia de la terapia anti-CTLA-4 al inducir una respuesta Th1 y desarrollar la maduración de las células dendríticas. Sin embargo, en los ratones libres de microorganismos y los libres de microorganismos específicos a los que se aplicaron antibióticos de amplio espectro, la función de la terapia anti-CTLA-4 se redujo significativamente. El resultado pudo revertirse mediante FMT en pacientes con especies dominantes de *Bacteroides* (13).

Además, se observó en un estudio que analizó a pacientes con cánceres gastrointestinales tratados con terapia anti-PD-1/PD-L1, que los pacientes que respondedores mostraron una abundancia de *Prevotella* y *Bacteroides* (31).

Por último, se ha descubierto que un fármaco tradicional chino, la decocción Gegen Qinlian, podía potenciar la eficacia de la inmunoterapia con anticuerpos anti-PD-1 e inhibir el crecimiento tumoral in vivo. La combinación de GQD y anti-PD-1 modula la microbiota intestinal, aumentando la abundancia de *Bacteroides acidifaciens* y *Bacteroidales* S24-7. La terapia combinada también aumentó notablemente la proporción de células T CD8⁺ en los tejidos tumorales y la sangre periférica y elevó la expresión de IFN- γ e IL-2 (26).

Este género de bacterias es muy amplio y como se ha demostrado en los estudios, promueve la eficacia de los distintos tratamientos con IPCI en el CCR. Aunque se necesitan todavía más estudios.

5.2.1.3. *Lactobacillus* y su influencia en la inmunoterapia

Este género de bacterias Gram-positivas también parece presentar buenos en combinación con los IPCI.

En un estudio reciente se demostró que los exopolisacáridos derivados de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* promueven la activación de células T CCR6+CD8+ en las placas de Peyer intestinales, así como el número de células CD8+ productoras de IFN γ que se infiltran preferentemente en tumores CCL20 positivos y mejoran la eficacia terapéutica del tratamiento anti-CTLA4 o anti-PD-1 (30).

Estos exopolisacáridos mencionados se podrían llegar a usar como postbióticos, de los cuales más adelante se hablará.

5.2.1.4. *Alistipes* y su influencia en la inmunoterapia

A pesar de los efectos patógenos observados para *Alistipes* en el CCR, se ha demostrado que este género tiene un papel beneficioso en la inmunoterapia del cáncer al modular el microambiente tumoral. (1)

En el CCR, la línea celular MC38 se ha utilizado en dos estudios que trataron las células con anti-IL-10 más oligonucleótidos CpG y anti-PD-1 o anti-CTLA-4, respectivamente. Se demostró que *Alistipes shahii* y *Ruminococcus spp.* desempeñaban el papel de promotores de la respuesta antitumoral (4).

En el estudio realizado por Iida et al. (57) se inyectaron ratones C57Bl/6 por vía subcutánea con células de carcinoma de colon MC38 y se pretrataron con antibióticos (vancomicina, imipenem y neomicina). Los autores descubrieron que los antibióticos provocaban una disminución de la eficacia de la erradicación tumoral debido a una reducción de la producción de TNF y se observó también una reducción en paralelo de *Alistipes shahii*. Desde el punto de vista clínico, el estudio indicó que cuando hay una reducción de *Alistipes*, se produce una reducción paralela de las respuestas óptimas a la inmunoterapia contra el cáncer (1).

5.2.1.5. *Akkermansia muciniphila* y su influencia en la inmunoterapia

Es una bacteria Gram-negativa, que coloniza la microbiota intestinal y se encarga de degradar la mucina del epitelio intestinal. (32).

En un estudio reciente de Routy et al. (43), se informó que el FMT o la suplementación oral con *A. muciniphila* de respondedores al bloqueo PD-1 restauró la eficacia del bloqueo PD-1 en modelos murinos. También declararon que los tumores de ratones

FMT contenían una alta población de células T CCR9+CXCR3+CD4+ que mejoraban el efecto del anti-PD-1 de una manera dependiente de IL-12. Estos autores descubrieron que *A. muciniphila* estimula a las CD para que secreten IL-12, que es un componente crucial del efecto anticancerígeno del bloqueo de PD-1 ya que el análisis de heces informó de que los pacientes que respondían al bloqueo PD-1 tenían diversas composiciones bacterianas intestinales con una alta frecuencia de *Akkermansia* y *Alistipes* (13).

En otro estudio, en ratones portadores de tumores de CCR de tipo estabilidad de microsatélites, los cambios en el microbioma intestinal afectaron a la expresión de las citocinas relacionadas con la inmunidad IFN- γ e IL-2 en el microambiente tumoral, lo que dio lugar a un efecto terapéutico diferente del anticuerpo PD-1, y *Prevotella_sp._CAG:485* y *Akkermansia* puede que mantengan la eficacia normal del anticuerpo PD-1 (5).

5.2.1.6. *Enterococcus* spp. y su influencia en la inmunoterapia

Es un género de bacterias gran-positivas. Se han descrito también interacciones entre este género de bacterias y la inmunoterapia del CCR. Por ejemplo, Griffin et al. (59) describieron que en modelos de xenoinjertos murinos, la mayoría de las veces utilizando la línea celular MC38 del SMS, la expresión de una peptidoglicano hidrolasa (antígeno secretado A, SagA) en *Enterococcus* spp. facilita la liberación de muramil dipéptidos que activan las vías de señalización NOD2 y la expresión de genes proinflamatorios factor nuclear kappa B. Estos cambios promueven la infiltración tumoral por células CD45+ y CD8+, al tiempo que potencian la eficacia del tratamiento anti-CTLA4 en xenoinjertos MC38184. (30)

5.2.1.7. *E.coli pks* + y su influencia en la inmunoterapia

Hasta ahora solo se han mencionado bacterias que mejoran la eficacia de las terapias con IPCI.

Sin embargo, se ha demostrado en un estudio que *E.coli pks*+ se transloca a los ganglios linfáticos mesentéricos, donde disminuye la abundancia de células T citotóxicas, lo que a su vez reduce la invasión de células inmunitarias en los márgenes

del tejido tumoral e inhibe el tratamiento anti-PD-1 en ratones portadores de tumores MC38 (30).

A lo largo de esta revisión y a través de diferentes estudios se ha ido observando la cantidad de interacciones que existen entre la microbiota intestinal y la inmunoterapia con IPCI. Se han descrito sobre todo bacterias que causan beneficio en la interacción con dicha terapia y que por lo tanto desde el punto de vista clínico pueden ser de gran interés para aumentar la supervivencia global de los pacientes con CCR.

5.3. ESTRATEGIAS PARA MODULAR LA MICROBIOTA INTESTINAL Y SUS APLICACIONES CLÍNICAS EN INMUNOTERAPIA Y CCR

Como se ha visto, existe una clara influencia de la microbiota intestinal sobre la inmunoterapia en el CCR. Esto tiene gran relación con la variedad de bacterias que existen en el intestino y que sean capaces de modular el sistema inmunitario. Algunas bacterias causan beneficio en la terapia y otras, perjuicio. Además, la ausencia o falta de algunas especies de bacterias por tratamientos antibióticos puede producir alteraciones en la eficacia de estas terapias, reduciendo la supervivencia global del cáncer. Para evitar esto existen distintas medidas que se pueden llevar a cabo para modular la microbiota intestinal y poder ayudar a la mejoría de la eficacia de la inmunoterapia.

La **Figura 10 (26)** representa las estrategias aplicadas para la modulación de la microbiota intestinal y los mecanismos de acción de cada una de ellas.

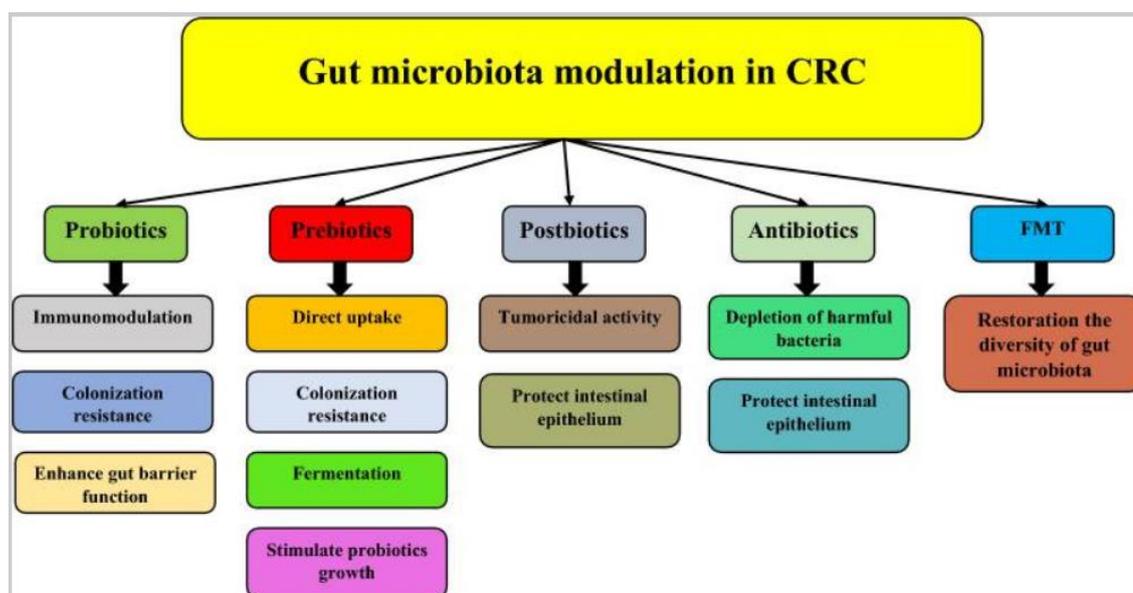


Figura 10: Estrategias aplicadas para modular la microbiota intestinal en el CCR y mecanismos de acción de cada estrategia. Probióticos: Los probióticos ejercen sus efectos sobre la composición de la microbiota intestinal a través de la inmunomodulación, la inhibición de la colonización de bacterias patógenas y la mejora de las funciones de barrera intestinal. **Prebióticos:** Actúan como elementos moduladores de la microbiota intestinal a través de la absorción directa por el intestino y ejerciendo actividades antiinflamatorias, la prevención de la colonización de patógenos al interactuar con ellos, la fermentación por la microbiota intestinal y la estimulación de las bacterias intestinales beneficiosas. **Postbióticos:** Ejercen sus funciones tumorocidas a través de la inhibición selectiva de las células tumorales y la protección del epitelio intestinal mediante la inhibición de la apoptosis en las células epiteliales y el aumento de la secreción de IgA. **Antibióticos:** Los antibióticos podrían eliminar las bacterias nocivas del intestino y preservar el epitelio intestinal. FMT: Esta estrategia ayuda a restaurar la diversidad de la microbiota en el intestino (26).

Cada vez se están realizando más esfuerzos para aumentar la eficacia del tratamiento tumoral y reducir los efectos secundarios mediante el trasplante de microbioma fecal, así como la terapia probiótica (7). Por ejemplo, se ha demostrado que la presencia de estas especies bacterianas inmunopotenciadoras específicas, como *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium spp.* y *Bacteroides fragilis*, es fundamental para la terapia con IPCI. Por lo tanto, la modulación de la composición de la microbiota parece ser una estrategia crítica para el tratamiento futuro (15).

5.3.1. Probióticos

Los probióticos son microorganismos, incluidas bacterias, levaduras y mohos, que pueden mejorar la salud del huésped cuando se administran en una cantidad adecuada. *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y *Enterococcus* son los géneros bacterianos más utilizados como probióticos. Los probióticos afectan al intestino en la prevención y el tratamiento del CCR a través de tres mecanismos principales: inmunomodulación, inhibición de la colonización de bacterias patógenas y mejora de las funciones de barrera intestinal. (**Figura 10**) (26).

Los probióticos podrían inhibir la proliferación de microorganismos perjudiciales disminuyendo el pH luminal, produciendo péptidos antimicrobianos y reduciendo las enzimas pro-tumorigénicas (26).

Algunos probióticos pueden ayudar no sólo a potenciar los efectos de los agentes terapéuticos anticancerosos, sino también a aliviar los efectos secundarios causados por los tratamientos convencionales contra el cáncer (7).

Los probióticos de nueva generación (PNG) se definen como “microorganismos vivos identificados a partir de análisis comparativos de la microbiota que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped”. Los PNG se han aislado recientemente gracias a las nuevas herramientas que permiten aislar, identificar y modificar estas bacterias comensales; por lo tanto, la eficacia y la seguridad de los PNG siguen sin estar claras. No obstante, los PNG, como *Bifidobacterium spp*, *Bacteroides fragilis*, *Akkermansia muciniphila* y *Faecalibacterium prausnitzii* han abierto nuevas perspectivas terapéuticas en el CCR (9).

Un probiótico de gran relevancia es *A. muciniphila*. Según datos publicados recientemente, existe un vínculo entre la microbiota intestinal, los probióticos, los PNG y el sistema inmunitario, así como la eficacia de la inmunoterapia. Y, como ya se ha mencionado, *A. muciniphila* influye en el efecto de la inmunoterapia basada en agentes anti-PD-1. Además, en el estudio de, Routy et al. (43) se demostró que tanto el trasplante de la microbiota de pacientes que respondían a los IPCI como la suplementación con este PNG (*A. muciniphila*) por sí solos restauraron la sensibilidad a la inmunoterapia (8).

F. prausnitzii, es utilizado como probiótico ya que participa en la producción de butirato, por lo que puede contribuir al mantenimiento de la homeostasis intestinal. En la actualidad, los PNG se consideran una estrategia terapéutica potencial novedosa para mejorar el tratamiento del CCR. (9) Sin embargo, en los casos de *F. prausnitzii* sobrecrecidos, los pacientes tenían un mayor riesgo de presentar colitis relacionada con los inhibidores de CTLA-4 (12).

Un estudio reciente, en el que se utilizó una combinación de anti-ePD-L1 y antocianina de arándano prebiótica para tratar el CCR en ratones, sugirió que los prebióticos pueden mejorar la eficacia del IPCI al restaurar la diversidad de la microbiota. Otros estudios en ratones también han demostrado que probióticos como *Bifidobacterium* y *Mucorophilus* en combinación con IPCI pueden mejorar la eficacia terapéutica. Del

mismo modo, la administración de *Lactobacillus rhamnosus GG* mejora la eficacia terapéutica anti-PD-1 al promover la función de las células T CD8+. Curiosamente, otro modelo de ratón demostró que la administración de un probiótico (*Bifidobacterium longum* o *L. rhamnosus GG*) reducía la frecuencia de células T CD8+ IFN- γ (+) que mostraban una respuesta antitumoral desfavorable (31).

Todos estos estudios apoyan la idea de que la modulación de la microbiota intestinal mediante probióticos podría ayudar a la mejoría de la eficacia de la inmunoterapia en el cáncer.

5.3.2. Prebióticos

Los prebióticos son "ingredientes fermentados selectivamente que provocan cambios específicos en la composición y/o las actividades de la microbiota gastrointestinal que confieren beneficios para el bienestar y la salud del huésped". Los polifenoles, los ácidos grasos poliinsaturados y los carbohidratos, incluidos los galactooligosacáridos, los xilooligosacáridos, los fructooligosacáridos, los fructanos y la inulina, poseen propiedades prebióticas. Los prebióticos ejercen sus funciones a través de varios mecanismos: estimulación de las bacterias intestinales beneficiosas, fermentación a través de la microbiota intestinal, absorción directa por el intestino y ejercicio de actividades antiinflamatorias, y prevención de la colonización de patógenos al interactuar con ellos (**Figura 10**). Se ha demostrado que la administración de prebióticos podría aumentar la abundancia de probióticos, incluyendo *Akkermansia*, *Roseburia*, *Ruminococcus* y *Faecalibacterium* (26).

5.3.3. Postbióticos

Los postbióticos se definen como fracciones celulares, células microbianas inactivadas y metabolitos celulares elaborados con células vivas probióticas durante la fermentación y que contienen diversos beneficios para la salud del huésped. Los postbióticos ejercen sus actividades antitumorales mediante: inhibiendo selectivamente las células tumorales y protegiendo el epitelio intestinal mediante la inhibición de la apoptosis en las células epiteliales y el aumento de la secreción de IgA. Otro mecanismo de acción de los postbióticos está relacionado con su capacidad

para suprimir la inflamación intestinal y mantener la integridad de la barrera intestinal. (26).

Los postbióticos también se han evaluado como coadyuvantes de terapias anticancerígenas. Se probó in vivo la eficacia combinada de lisados celulares de *L. acidophilus* con un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4. En contraste con la monoterapia anti-CTLA-4, los lisados de *L. acidophilus* atenuaron la pérdida de peso corporal y la administración combinada protegió significativamente a los ratones frente al desarrollo de CCR, lo que sugiere una potenciación de la actividad antitumoral anti-CTLA-4. Además, la combinación sinérgica produjo un aumento de las células T CD8+, especialmente de las células T efectoras de memoria, una disminución de las Tregs, y activó alternativamente los macrófagos en el microambiente tumoral. Por último, la administración combinada inhibió significativamente el aumento anormal de proteobacterias y contrarrestó en parte la disbiosis inducida por el CCR en ratones (10).

De esta forma se puede ver como los postbióticos son una forma de mejorar la eficacia de los IPCI y que pueden ser una buena línea de investigación en el tratamiento del CCR.

5.3.4. Antibióticos

Se ha demostrado que el uso de antibióticos tiene efectos negativos en la microbiota intestinal, como la reducción de la biodiversidad de bacterias, la selección de organismos resistentes a los antibióticos y cambios en las funciones metabólicas. Aunque cada vez hay más pruebas de que los antibióticos aumentan el riesgo de CCR, también podrían disminuir el tamaño y el número de tumores mediante la manipulación del microbioma intestinal (26). Por ejemplo, DeStefano Shields et al. (40) informaron de que el tratamiento con el antibiótico cefoxitina podía eliminar por completo y de forma duradera la colonización enterotoxigénica por *B. fragilis* en un modelo de ratón de neoplasia intestinal (40).

5.3.5. Trasplante de microbiota fecal

El FMT, es un método bioterapéutico interesante y de lo más innovador, se define como la transferencia de heces de individuos sanos a otros pacientes (26). En otro

estudio, Sobhani et al. (39) indicaron que el trasplante de heces frescas de pacientes con CCR a ratones libres de microorganismos podía inducir la hipermetilación de varios genes, de forma similar a los patrones de alteración de los pacientes con CCR (39).

El FMT, puede ser prometedor para mejorar la eficacia de los IPCI y reducir las reacciones adversas. Un estudio reciente halló un mayor efecto antitumoral de los bloqueantes de PD-1 en el microbioma fecal de pacientes con cáncer trasplantados con respuesta a IPCI en comparación con los trasplantados sin respuesta a IPCI en ratones libres de microorganismos o con antibióticos. Además, un estudio demostró en ratones con CCR que el FMT ejerce una función antiinflamatoria al restaurar la proporción y la diversidad de la microbiota intestinal, lo que también apoya que el uso del tratamiento " FMT + IPCI" para mejorar la eficacia de la inmunoterapia y para reducir reacciones adversas (31).

En un estudio realizado por Li et al. (38) se describieron alteraciones en la consistencia del bacterioma en casos de pacientes con una respuesta activa a los inhibidores de PD-1. Más concretamente, estos pacientes presentaron una mayor cantidad de *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium longum* y *Collinsella aerofaciens*. Las muestras fecales que presentaban los taxones microbianos mencionados se caracterizaron como muestras fecales "respondedoras" y se transfirieron mediante FMT a ratones libres de microorganismos. Posteriormente, los ratones libres de gérmenes empezaron a expresar el fenotipo fecal de los respondedores (12).

Recientemente, se está reclutando un ensayo clínico en humanos (NCT04729322) que estudia el efecto del FMT y la reintroducción de la terapia anti-PD-1 (pembrolizumab o nivolumab) para el tratamiento del CCR metastásico en no respondedores a anti-PD-1. Aunque todavía se está investigando, estamos empezando a explotar el enorme potencial de la microbiota intestinal para predecir la respuesta a la inmunoterapia y mejorar la vigilancia inmunológica para una intervención inmunoterapéutica más precisa (5).

6. CONCLUSIONES

El CCR, es una enfermedad muy prevalente y con alta tasa de mortalidad en el mundo. Existen multitud de tratamientos eficaces para tratar el CCR, por ejemplo algunos tipos específicos de CCR responden muy bien a la inmunoterapia con IPCI. Por otro lado, la microbiota intestinal es muy variada y abundante en el intestino y posee diversas funciones para mantener la homeostasis intestinal, como la biosíntesis o la inmunomodulación. Por ello, y debido a esta gran cantidad de interacciones con el sistema inmune, se ha demostrado que la microbiota intestinal puede ejercer un importante papel en la inflamación y en la carcinogénesis colorrectal. Existen en nuestro organismo géneros y especies bacterianos que promueven la evolución desde inflamación a carcinogénesis pero también hay muchas otras que participarán de forma activa en la inhibición de este proceso.

Además, se han descrito múltiples interacciones entre algunos géneros de bacterias como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* o *Bacteroides*, y la respuesta a la inmunoterapia con IPCI para el CCR. Este conocimiento permite plantear el uso de estas bacterias como coadyuvantes en el tratamiento inmunoterapéutico del CCR en forma de probióticos, postbióticos y trasplante de microbiota fecal.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Parker BJ, Wearsch PA, Veloo ACM, Rodriguez-Palacios A. The genus *Alistipes*: Gut bacteria with emerging implications to inflammation, cancer, and mental health. *Front Immunol* [Internet]. 2020;11:906. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32582143/>
2. Silva M, Brunner V, Tschurtschenthaler M. Microbiota and colorectal cancer: From gut to bedside. *Front Pharmacol* [Internet]. 2021;12:760280. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34658896/>
3. Nenkov M, Ma Y, Gaßler N, Chen Y. Metabolic reprogramming of colorectal cancer cells and the microenvironment: Implication for therapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22(12):6262. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34200820/>
4. Koulouridi A, Messaritakis I, Gouvas N, Tsiaoussis J, Souglakos J. Immunotherapy in solid tumors and gut Microbiota: The correlation-A special reference to colorectal cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020;13(1):43. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33375686/>

5. Hou X, Zheng Z, Wei J, Zhao L. Effects of gut microbiota on immune responses and immunotherapy in colorectal cancer. *Front Immunol* [Internet]. 2022;13:1030745. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36426359/>
6. Yang X, Guo Y, Chen C, Shao B, Zhao L, Zhou Q, et al. Interaction between intestinal microbiota and tumour immunity in the tumour microenvironment. *Immunology* [Internet]. 2021;164(3):476–93. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34322877/>
7. Kim J, Lee HK. Potential role of the gut microbiome in colorectal cancer progression. *Front Immunol* [Internet]. 2021;12:807648. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35069592/>
8. Kaźmierczak-Siedlecka K, Skonieczna-Żydecka K, Hupp T, Duchnowska R, Marek-Trzonkowska N, Połom K. Next-generation probiotics - do they open new therapeutic strategies for cancer patients? *Gut Microbes* [Internet]. 2022;14(1):2035659. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35167406/>
9. Kaźmierczak-Siedlecka K, Daca A, Fic M, van de Wetering T, Folwarski M, Makarewicz W. Therapeutic methods of gut microbiota modification in colorectal cancer management - fecal microbiota transplantation, prebiotics, probiotics, and synbiotics. *Gut Microbes* [Internet]. 2020;11(6):1518–30. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32453670/>
10. Perillo F, Amoroso C, Strati F, Giuffrè MR, Díaz-Basabe A, Lattanzi G, et al. Gut Microbiota manipulation as a tool for colorectal cancer management: Recent advances in its use for therapeutic purposes. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020;21(15):5389. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32751239/>
11. Xing C, Du Y, Duan T, Nim K, Chu J, Wang HY, et al. Interaction between microbiota and immunity and its implication in colorectal cancer. *Front Immunol* [Internet]. 2022;13:963819. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35967333/>
12. Koustas E, Trifylli E-M, Sarantis P, Papadopoulos N, Aloizos G, Tsagarakis A, et al. Implication of gut microbiome in immunotherapy for colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* [Internet]. 2022;14(9):1665–74. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36187397/>
13. Azimi M, Keshavarz Shahbaz S, Mansourabadi AH, Mohamed Khosroshahi L, Pourkalhor S, Rezakhani M, et al. Intestinal Microbiota: Novel personalized cancer immunotherapy in colorectal cancer. *Int Arch Allergy Immunol* [Internet]. 2022;183(11):1147–65. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35988536/>
14. Damilakis E, Mavroudis D, Sfakianaki M, Souglakos J. Immunotherapy in metastatic colorectal cancer: Could the latest developments hold the key to improving patient survival? *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020;12(4):889. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32268531/>
15. Lee M-H. Harness the functions of gut microbiome in tumorigenesis for cancer treatment. *Cancer Commun (Lond)* [Internet]. 2021;41(10):937–67. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34355542/>

16. Velikova T, Krastev B, Lozenov S, Gencheva R, Peshevska-Sekulovska M, Nikolaev G, et al. Antibiotic-related changes in microbiome: The hidden villain behind colorectal carcinoma immunotherapy failure. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22(4):1754. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33578709/>
17. Grassilli E, Cerrito MG. Emerging actionable targets to treat therapy-resistant colorectal cancers. *Canc Drug Resist* [Internet]. 2022;5(1):36–63. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35582524/>
18. De Souza ALPB. Finding the hot spot: identifying immune sensitive gastrointestinal tumors. *Transl Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2020;5:48. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33073043/>
19. Gao F, Yu B, Rao B, Sun Y, Yu J, Wang D, et al. The effect of the intratumoral microbiome on tumor occurrence, progression, prognosis and treatment. *Front Immunol* [Internet]. 2022;13:1051987. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36466871/>
20. Liu Y, Li Z, Wu Y, Jing X, Li L, Fang X. Intestinal bacteria encapsulated by biomaterials enhance immunotherapy. *Front Immunol* [Internet]. 2020;11:620170. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33643302/>
21. Zhuo Q, Yu B, Zhou J, Zhang J, Zhang R, Xie J, et al. Lysates of *Lactobacillus acidophilus* combined with CTLA-4-blocking antibodies enhance antitumor immunity in a mouse colon cancer model. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):20128. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31882868/>
22. Owens JA, Saedi BJ, Naudin CR, Hunter-Chang S, Barbian ME, Eboka RU, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG orchestrates an antitumor immune response. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2021;12(4):1311–27. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34111601/>
23. Kosumi K, Hamada T, Koh H, Borowsky J, Bullman S, Twombly TS, et al. The amount of *Bifidobacterium* genus in colorectal carcinoma tissue in relation to tumor characteristics and clinical outcome. *Am J Pathol* [Internet]. 2018;188(12):2839–52. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30243655/>
24. Shi Y, Zheng W, Yang K, Harris KG, Ni K, Xue L, et al. Intratumoral accumulation of gut microbiota facilitates CD47-based immunotherapy via STING signaling. *J Exp Med* [Internet]. 2020;217(5). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32142585/>
25. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017;18(1):197. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5297828/>
26. Wang Y, Li H. Gut microbiota modulation: a tool for the management of colorectal cancer. *J Transl Med* [Internet]. 2022;20(1):178. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9022293/>
27. Mendonça Gorgulho C, Krishnamurthy A, Lanzi A, Galon J, Housseau F, Kaneno R, et al. Gutting it out: Developing effective immunotherapies for patients with

- colorectal cancer: Developing effective immunotherapies for patients with colorectal cancer. *J Immunother* [Internet]. 2021;44(2):49–62. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8092416/>
28. Ooki A, Shinozaki E, Yamaguchi K. Immunotherapy in colorectal cancer: Current and future strategies. *J Anus Rectum Colon* [Internet]. 2021;5(1):11–24. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7843143/>
29. Fan A, Wang B, Wang X, Nie Y, Fan D, Zhao X, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: current achievements and future perspective. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2021;17(14):3837–49. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8495390/>
30. Dougherty MW, Jobin C. Intestinal bacteria and colorectal cancer: etiology and treatment. *Gut Microbes* [Internet]. 2023;15(1):2185028. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10026918/>
31. Yuan H, Gui R, Wang Z, Fang F, Zhao H. Gut microbiota: A novel and potential target for radioimmunotherapy in colorectal cancer. *Front Immunol* [Internet]. 2023;14:1128774. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9927011/>
32. Amaral Montesino C, Abrego Sánchez A, Díaz Granados MA, González Ponce R, Salinas Flores A, Rojas García OC. Akkermansia muciniphila, an investigation window for the regulation of metabolism and related diseases. *Nutr Hosp* [Internet]. 2021 [citado el 30 de marzo de 2023];38(3):675–6. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112021000300675
33. Guarner F, Malagelada JR. La flora bacteriana del tracto digestivo. *Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2003 [citado el 12 de abril de 2023];26(Supl.1):1–5. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-gastroenterologia-hepatologia-14-articulo-la-flora-bacteriana-del-tracto-13043240>
34. Causas del Cáncer de Colon y Recto [Internet]. Clínic Barcelona. [citado el 21 diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.clinicbarcelona.org/asistencia/enfermedades/cancer-de-colon-y-recto/causas>
35. The International Agency for Research on Cancer (IARC). Global Cancer Observatory [Internet]. Iarc.fr. [citado el 15 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>
36. Cáncer de colon y recto [Internet]. Seom.org. 2022 [citado el 12 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://seom.org/info-sobre-el-cancer/colon-recto?start=9>
37. Diccionario de cáncer del NCI [Internet]. Instituto Nacional del Cáncer. 2011 [citado el 24 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/inhibidor-de-puntos-de-control-inmunitario>

38. Li W, Deng Y, Chu Q, Zhang P. Gut microbiome and cancer immunotherapy. *Cancer Lett* [Internet]. 2019;447:41–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30684593/>
39. Sobhani I, Bergsten E, Couffin S, Amiot A, Nebbad B, Barau C, et al. Colorectal cancer-associated microbiota contributes to oncogenic epigenetic signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2019;116(48):24285–95. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6883805/>
40. DeStefano Shields CE, Van Meerbeke SW, Housseau F, Wang H, Huso DL, Casero RA Jr, et al. Reduction of Murine colon tumorigenesis driven by enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* using cefoxitin treatment. *J Infect Dis* [Internet]. 2016;214(1):122–9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4907405/>
41. Roberti MP, Yonekura S, Duong CPM, Picard M, Ferrere G, Tidjani Alou M, et al. Chemotherapy-induced ileal crypt apoptosis and the ileal microbiome shape immunosurveillance and prognosis of proximal colon cancer. *Nat Med* [Internet]. 2020;26(6):919–31. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32451498/>
42. Mager LF, Burkhard R, Pett N, Cooke NCA, Brown K, Ramay H, et al. Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy. *Science* [Internet]. 2020;369(6510):1481–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32792462/>
43. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* [Internet]. 2018;359(6371):91–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29097494/>
44. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* [Internet]. 2017;357(6349):409–13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5576142/>
45. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz H-J, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2017;18(9):1182–91. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6207072/>
46. Kloor M, von Knebel Doeberitz M. The immune biology of microsatellite-unstable cancer. *Trends Cancer* [Internet]. 2016;2(3):121–33. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28741532/>
47. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz H-J, Gelsomino F, Aglietta M, et al. Durable clinical benefit with nivolumab plus ipilimumab in DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*

- [Internet]. 2018;36(8):773–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29355075/>
48. Ahamadi M, Freshwater T, Prohn M, Li CH, de Alwis DP, de Greef R, et al. Model-based characterization of the pharmacokinetics of pembrolizumab: A humanized anti-PD-1 monoclonal antibody in advanced solid tumors. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* [Internet]. 2017;6(1):49–57. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5270291/>
49. Bajaj G, Wang X, Agrawal S, Gupta M, Roy A, Feng Y. Model-based population pharmacokinetic analysis of nivolumab in patients with solid tumors. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* [Internet]. 2017;6(1):58–66. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5270302/>
50. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biol* [Internet]. 2016;14(8):e1002533. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4991899/>
51. Lee JA, Yoo S-Y, Oh HJ, Jeong S, Cho N-Y, Kang GH, et al. Differential immune microenvironmental features of microsatellite-unstable colorectal cancers according to *Fusobacterium nucleatum* status. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2021;70(1):47–59. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32623478/>
52. Gethings-Behncke C, Coleman HG, Jordao HWT, Longley DB, Crawford N, Murray LJ, et al. *Fusobacterium nucleatum* in the colorectum and its association with cancer risk and survival: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2020;29(3):539–48. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31915144/>
53. Wu S, Morin PJ, Maouyo D, Sears CL. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology* [Internet]. 2003;124(2):392–400. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12557145/>
54. Iyadorai T, Mariappan V, Vellasamy KM, Wanyiri JW, Roslani AC, Lee GK, et al. Prevalence and association of pks+ *Escherichia coli* with colorectal cancer in patients at the University Malaya Medical Centre, Malaysia. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(1):e0228217. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6986756/>
55. Moschen AR, Gerner RR, Wang J, Klepsch V, Adolph TE, Reider SJ, et al. Lipocalin 2 protects from inflammation and tumorigenesis associated with gut Microbiota alterations. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016;19(4):455–69. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27078067/>
56. Tanoue T, Morita S, Plichta DR, Skelly AN, Suda W, Sugiura Y, et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature* [Internet]. 2019;565(7741):600–5. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30675064/>

57. Iida N, Dzutsev A, Stewart CA, Smith L, Bouladoux N, Weingarten RA, et al. Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science* [Internet]. 2013;342(6161):967–70. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6709532/>
58. Reddy BS, Narisawa T, Wright P, Vukusich D, Weisburger JH, Wynder EL. Colon carcinogenesis with azoxymethane and dimethylhydrazine in germ-free rats. *Cancer Res* [Internet]. 1975;35(2):287–90. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/162868/>
59. Griffin ME, Espinosa J, Becker JL, Luo J-D, Carroll TS, Jha JK, et al. Enterococcus peptidoglycan remodeling promotes checkpoint inhibitor cancer immunotherapy. *Science* [Internet]. 2021;373(6558):1040–6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9503018/>