



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

MECANISMOS MOLECULARES Y REGULACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL EN EL DESARROLLO y PROGRESIÓN EN EL CÁNCER DE MAMA HORMONA DEPENDIENTE (HR+).

Estudio prospectivo BRIANNA

Investigador principal:

- Dra. M. Leonor Fernández-Murga (Grupo de Investigación Hospital Arnau de Vilanova)
- Dr. Antonio LLombart-Cussac (Grupo de Investigación Hospital Arnau de Vilanova)

Colaboradores:

- Dr. Juan Miguel García-Gómez (Universidad Politécnica de Valencia)
- Dra. Sabina Asensio (Universidad Politécnica de Valencia)
- Dr. Guillermo Quintás (Servicio de Metabolómica, LEITAT/ISILa Fe)
- Dr. Giuseppe D Àuria (Dep. Bioinformática, FISABIO)
- Dra. Lluçia Martínez (Dep. Secuenciación, FISABIO)
- Lucía Serrano (Grupo de Investigación Hospital Arnau de Vilanova)
- María Portero (Grupo de Investigación Hospital Arnau de Vilanova)
- Cristina Linares (Grupo de Investigación Hospital Arnau de Vilanova)
- Dr. Enrique O'Connor (Universidad de Valencia)
- Vicente Carañana (Grupo de Investigación Hospital Arnau de Vilanova)

RESUMEN

Interacción entre las bacterias intestinales y el cáncer de mama sensible a las hormonas

El cuerpo humano está habitado por billones de microorganismos que pueblan principalmente el tracto gastrointestinal (TG). Estos microorganismos son cada vez más reconocidos como actores importantes en la salud y la enfermedad (como el cáncer), así como en la respuesta a diferentes terapias. Los microorganismos intestinales (MI) pueden estudiarse recogiendo muestras fecales, lo que proporciona una imagen en tiempo real de las bacterias de nuestro intestino. Este proyecto dilucidará el impacto de las composiciones de los microorganismos intestinales con el metabolismo de los estrógenos (estroboloma) y el desarrollo del cáncer de mama en mujeres con receptores

hormonales positivos (RH+) posmenopáusicas. Para lograr nuestros objetivos, estudiaremos la correlación de los microorganismos intestinales con la clínica y el estilo de vida. Utilizaremos una aplicación de teléfono móvil (WAKAMOLA) para monitorizar periódicamente el estilo de vida de cada mujer. Todos estos datos se integrarán mediante herramientas de inteligencia artificial, lo que nos permitirá identificar a las mujeres en riesgo y ofrecerles recomendaciones dietéticas, cambios de estilo de vida más saludables y opciones de tratamiento más eficaces.

1. ANTECEDENTES:

Microbiota humana:

El tracto gastrointestinal alberga más de 1.000 especies bacterianas diferentes, y se calcula que el número de bacterias que transportamos asciende a 10¹¹ por gramo de contenido luminal [1,2]. La composición de la microbiota del tracto gastrointestinal refleja variables del huésped, como el modo de administración, la genética, la dieta, la ingesta de alcohol, la exposición ambiental, fármacos como antibióticos y terapias contra el cáncer [3,4]. Los avances en la secuenciación del ARN ribosómico 16S (ARNr) y la bioinformática permiten, actualmente, estudiar la función y la composición del microbioma bacteriano, así como evaluar el conjunto de sus genes (conocido como el metagenoma) [5,6].

Los seres humanos y los microbios han desarrollado conjuntamente una compleja e intrincada relación que beneficia al huésped y permite a la microbiota intestinal prosperar en un equilibrio mutuamente ventajoso. Las alteraciones del microbioma se han asociado a enfermedades inflamatorias, autoinmunes y malignas [7,8]. Un desequilibrio patológico de la comunidad microbiana, conocido como **disbiosis**, puede promover la oncogénesis e inducir la progresión tumoral, así como influir en las respuestas a las terapias contra el cáncer y en los perfiles de toxicidad de los agentes citotóxicos [9,10]. El microbioma intestinal humano es activo y funcional, y ejerce efectos tanto a nivel local como a larga distancia que incluyen mensajeros metabólicos, hormonales e inmunológicos [11,12]. Por lo tanto, las interacciones huésped-microbio pueden influir en la carcinogénesis a través de mecanismos como la inducción de respuestas genotóxicas, la alteración del microambiente, el metabolismo y la inflamación crónica [13,14].

El microbioma incluye un estroboloma:

Plottel y Blaser definen al "estroboloma" como "el conjunto de genes bacterianos entéricos cuyos productos son capaces de metabolizar estrógenos" [1]. Los estrógenos (E) circulan en la sangre en forma libre o unida a proteínas y ejercen diversos efectos biológicos. Los E parentales se someten a un metabolismo hepático de primer paso que da lugar a metabolitos cuya potencia hormonal y vida media varían [2]. En el hígado, los E y sus metabolitos se conjugan y se excretan en la bilis, las heces y la orina [3-5]. Sin embargo, aproximadamente el 65% del estradiol, el 48% de la estrona y el 23% del estriol se recuperan en la bilis [6]. Los E conjugados hepáticamente excretados en la bilis pueden ser desconjugados por especies bacterianas con actividad **β -glucuronidasa**, **sulfatasa** y **β -glucosidasa** en el intestino, lo que conduce a su reabsorción en la circulación [7,8]. Estas actividades enzimáticas pueden ser moduladas por la dieta y por el contexto bacteriano [9,10]. El papel de estas actividades enzimáticas bacterianas en el riesgo de cáncer de mama (o en la reducción del riesgo) no se ha explorado.

Un estroboloma enriquecido en actividad deconjugadora de hidroxiesteroides bacterianos puede contribuir a la modulación de la interconversión de formas conjugadas de estrógenos, así como de moléculas androgénicas y fármacos, todo ello relevante para el entorno estrogénico general del huésped [11]. Así pues, el alcance de las funciones enzimáticas del estroboloma puede ir más allá de la función de desconjugación.

Exposición a estrógenos y riesgo de cáncer de mama (CM):

El subtipo más frecuente de cáncer de mama (CM) expresa receptores hormonales (RH+) y afecta a más del 70% de las pacientes [1]. Se prevé que la incidencia de tumores invasivos HR+ aumente entre un 2 y un 4% anual hasta 2030 entre las mujeres posmenopáusicas [1]. Los Estrógenos (E) son reconocidos como un factor importante en la etiología de los CM RH+, desempeñando una función significativa en la iniciación y promoción del crecimiento tumoral [2,3]. La relación entre los metabolitos E y los estrógenos parentales se ha asociado al riesgo de cáncer de mama posmenopáusico. El riesgo aumenta con niveles circulantes más altos de E [4,5].

El microbioma modula los niveles de E circulantes, comentado anteriormente [5-8]. La edad, la dieta, el alcohol, así como varios factores ambientales a lo largo de la vida se han relacionado de forma independiente con el riesgo de cáncer de mama, y todos ellos tendrían un gran impacto en el estroboloma.

Hemos postulado que, un estroboloma enriquecido en enzimas que favorecen la desconjugación promovería la reabsorción de Estrógenos libre y, por tanto, aumentaría la carga relativa total de estrógenos, contribuyendo potencialmente al riesgo y la promoción de neoplasias malignas de origen hormonal como el CM el hormono- dependiente (RH+)/receptor del factor de crecimiento epidérmico humano negativo (HER2-).

Además, es probable que la composición bacteriana del estroboloma se vea afectada por factores específicos del huésped como la edad, el origen étnico, las influencias ambientales, la dieta, el alcohol, el peso, las terapias anticancerígenas y el uso de antibióticos, que pueden ejercer presiones selectivas sobre las poblaciones bacterianas y podrían participar en el mecanismo molecular del cáncer de mama. Los patrones de abundancia de la enzima β -glucuronidasa, y potencialmente de otras enzimas presentes en el estroboloma (β -glucosidasa, sulfatasa, etc.), están relacionados con los fenotipos del metabolismo de los fármacos y pueden predecir las respuestas individuales de las pacientes a los agentes endocrinos.

En conclusión, las interacciones entre el microbioma intestinal y el CM inducido por estrógenos son cada vez mayores, y esperamos que nuestra investigación identifique aspectos y mecanismos distintivos del microbioma intestinal que puedan utilizarse para desarrollar enfoques novedosos para la evaluación del riesgo, la prevención y la terapia del cáncer de mama HR+.

2. OBJETIVOS:

Objetivo primario:

- Demostrar que las diferencias en los niveles séricos de estrógenos entre pacientes con cáncer de mama y controles sanos están relacionadas con alteraciones en la diversidad/abundancia del estroboloma.

Objetivos Secundarios

- Estudiar los mecanismos por los que la microbiota intestinal actúa y regula el desarrollo y progresión del cáncer de mama hormono-dependiente (CM RH+).
- Dilucidar el mecanismo por el cual la microbiota intestinal actúa y regula la respuesta inmune innata en CM RH+.
- Mediante la aplicación "Wakamola", un chatbot creado por la UPV para teléfonos móviles, estudiaremos el estilo de vida, comportamiento social, actividad física, dieta, etc. de forma continua en pacientes y controles (Fig 1).

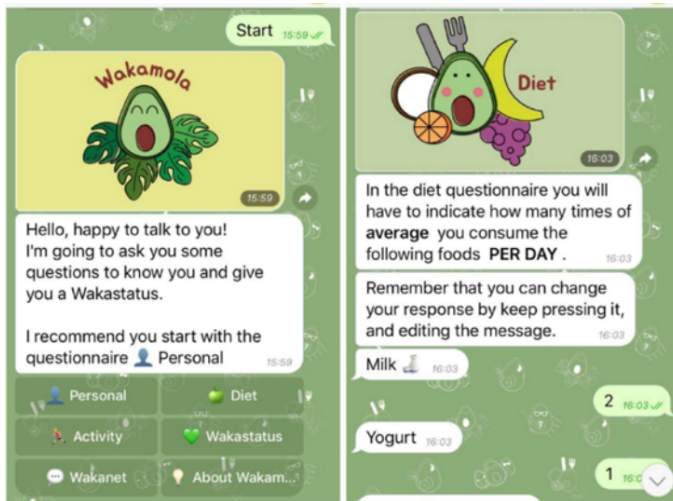


Figura 1: Captura de pantalla del menú principal y la sección de dieta de Wakamola.

El chatbot Wakamola se utilizará para obtener información relativa a los hábitos de salud de los participantes, centrándose en la dieta y la actividad física. Wakamola implementa una versión modificada del cuestionario de adherencia a la dieta mediterránea compatible con FFQ, que pregunta al usuario sobre la frecuencia de consumo de

determinados concretos y grupos de alimentos. Wakamola también registra información sobre actividad física implementando el cuestionario estándar de actividad física de IPAQ, que pregunta por las frecuencias de los ejercicios a diferentes intensidades y permite calcular una medida global de actividad física por semana utilizando METs como unidades. El primer paso de la inteligencia artificial hacia el análisis exploratorio y la explotación de datos consiste en realizar una extracción de características a partir de las distintas fuentes de datos. Wakamola proporciona una lista de 52 variables/factores que contiene la frecuencia de consumo de alimentos.

- **El objetivo final es generar un algoritmo para la prevención, diagnóstico y pronóstico de la CM HR+.**

Se realizará una integración de datos ómicos experimentales, cuestionarios de estilo de vida y dieta, datos demográficos y clínicos mediante deep y machine learning (herramientas de inteligencia artificial) (Fig.2).

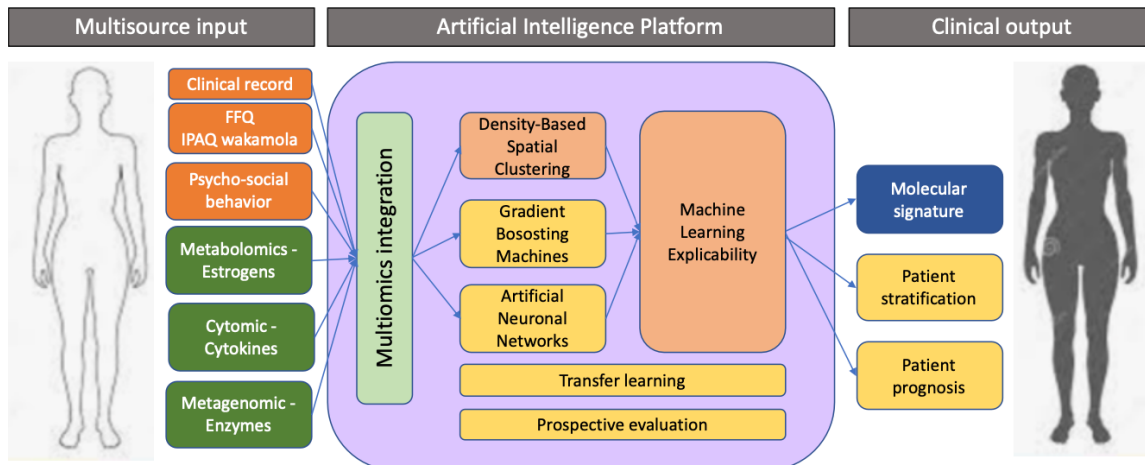


Figura 2: “OMICS Integration” considera a los pacientes como un todo y capta los mecanismos biológicos.

3. POBLACIÓN DE ESTUDIO:

El proyecto desarrollará un estudio prospectivo paciente-control. Una paciente será considerada para el estudio si cumple los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión

- Mujer posmenopáusica,
- Diagnóstico de carcinoma de mama infiltrante en estadios I a III con criterios de fenotipo luminal (ER/PR positivo, HER2 negativo) (el cáncer de mama que tenga al menos un 1% de células con ER positivo debe considerarse ER positivo según las directrices de la NCCN y la ASCO).
- Consentimiento firmado

Criterios de exclusión:

- Terapia local o sistémica previa para el cáncer.
- Tratamiento con antibióticos orales o corticosteroides crónicos en los últimos tres meses.
- Antecedentes previos de cáncer, incluido el de mama pero sin limitarse a él.
- Tratamiento endocrino previo.

Controles: mujeres posmenopáusicas sin cáncer de mama que cumplan los criterios de inclusión/exclusión. Los controles se emparejarán con los casos por edad (± 2 años), categoría de índice de masa corporal y hospital de reclutamiento.

4. RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO EN LA SOCIEDAD:

Sólo hay 7 estudios registrados en ClinicalTrials.gov relacionados con el cáncer de mama y la microbiota, 3 ya finalizados y 4 actualmente en curso. En cuanto a los estudios en curso, se trata de ensayos que investigan diversas estrategias de intervención (probióticos, actividad física, dieta). Sin embargo, los conocimientos actuales no son suficientes para explicar cómo las diferentes especies microbianas y sus metabolitos pueden contribuir a la variabilidad en cuanto al desarrollo del cáncer o la respuesta al tratamiento entre pacientes. Además, gran parte de nuestros conocimientos sobre la circulación enterohepática y el metabolismo de los estrógenos se basan en investigaciones realizadas durante la década de 1970. Los recientes avances en los métodos analíticos (NGS y espectrometría de masas), incluida la medición precisa y sensible de diferentes estrógenos en suero y orina, deberían proporcionar herramientas para realizar comparaciones significativas entre sujetos. Un estudio reciente que investigaba las diferencias en la composición del microbioma intestinal entre mujeres posmenopáusicas mostró un microbioma fecal menos diverso y una composición estadísticamente alterada en pacientes con cáncer de mama recién diagnosticado en comparación con controles sanos, y este hallazgo justifica un seguimiento. A pesar de que el microbioma y los datos metabolómicos como biomarcadores predictivos se investigan ampliamente, aún estamos lejos de su traslación a la clínica. Esto puede atribuirse a la falta de estudios consistentes, tanto en términos de número de pacientes (muy poco reclutamiento) como de variabilidad metodológica.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que realiza el análisis simultáneo de la microbiota del intestino, y la respuesta inmune y también el primer intento de vincular el microbioma con el comportamiento (dieta, costumbres sociales, hábitos, entorno familiar, actividad física utilizando las tecnologías de chatbot Wakamola) de la mujer posmenopáusica con potencial riesgo de cáncer de mama, integrando toda esta información utilizando herramientas de inteligencia artificial. Fusionando datos de heces, orina y sangre, aumentaremos enormemente la posibilidad de identificar una firma predictiva y válida que pueda ser validada en ensayos clínicos de mayor envergadura. Esta última podría introducirse fácilmente en la práctica clínica para ayudar a los médicos en la toma de decisiones terapéuticas y, en consecuencia, mejorar la supervivencia de las pacientes con la administración de tratamientos personalizados.

5. PRESUPUESTO:

PRESUPUESTO	
ANÁLISIS DE METAGENÓMICA N=100 muestras Estudio de la microbiota (taxonomía y transcriptómica)	27.200 €
METABOLOMICA and LIPIDOMICA N=100	13.522,80 €
CHATBOT WAKAMOLA (UPV) •Análisis de datos multifuente (microbiota, niveles de estrógenos, información nutricional, demográfica, social, actividad física...) utilizando Deep Learning. •Evaluación del algoritmo de diagnóstico en función del input (microbiota, nivel de estrógenos, información nutricional, demográfica, social, actividad física...). •Desarrollo de software de apoyo a la toma de decisiones basado en el algoritmo diagnóstico.	0,00 €
PUBLICACIONES Y DISEMINACIÓN DE LOS RESULTADOS •Costo de al menos 3 comunicaciones a congresos (2 internacional, 1 nacional) y 3-4 publicaciones con peer-reviewed. •Diseminación de los resultados	6.000 €
Costos directos de ejecución	46.722,80 €
Overheads (20%)	9.344,56 €
COSTE TOTAL	56.067,36 €

6. BIBLIOGRAFÍA:

Humans Microbiota:

1. Macpherson AJ et al. Nat. Rev. Immunol. (2004) 4: 478-485
2. Hooper LV et al. Nature (2001) Science 292: 1115-1118
3. Goodrich et al. Cell (2014) 158: 250-262
4. Ley RE et al. Cell (2006) 124: 837-848
5. Clarridge JE. Clin. Microbiol. Rev. (2004) 17: 840-862
6. Thomas T et al. Microb. Inform. Exp. (2012) 2:3
7. Zitvogel L et al. Sci.Transl. Med. (2015) 21: 271-280
8. Yang J et al. Breast Cancer (2016) DOI 10.107/s12282-016-0734-z
9. Goodman B et al. J. Pathol 2018 Apr;244(5):667-676
10. Bashiardes S et al. Semin. Immunol. (2017) 32: 74-81
11. Mikó E et al. Cell (2019) 8: 293 DOI 10.3390/cells8040293
12. Maynard CL et al. Nature (2012) 489: 231-241
13. Shapira I et al. ISRN Oncol. (2013) 2013:693920

14. Hullar MA et al. *Cancer J* (2014) 20: 170-175

The Microbiome Includes an Estrobolome:

1. Plottel CS, Blaser MJ. *Cell Host. Microbe.* (2011) 10: 324-335
2. Zhu BT et al. *Endocrinology* ((2006) 147:4132-4150
3. Zhu BT et al. *Carcinogenesis* (1998) 19: 1-27
4. Raftogianis R et al. *J.Nat. Cancer Inst. Monog.* (2000) 27: 113-124
5. Bongiovanni AM et al. *Chemical and Biological Aspects of steroid conjugation* (1970), Bernstein S, Solomon S eds. New York Springer
6. Sandberg AA et al. *J. Clin. Invest.* (1957) 36: 1266-1278
7. Pollet et al. *Structure* (2017) 25: 967-977
8. Ervin ME et al. *J.Biol. Chem.* (2019) 6;294(49):18586-18599
9. Goldin BR et al. *N. Engl. J. Med* (1982) 307: 1542-1547
10. Muegge BD et al. *Science* (2011) 332: 970-974
11. Samavat MS et al. *Cancer Letter* (2015) 356:231-243

Estrogen Exposure and Breast Cancer (BC) Risk

1. Kwa M et al. *JNCI J. Nat Cancer Inst.* (2016) 108: 1-10
2. Russo.J, Russo H J. *Steroid. Biochem. Mol. Biol.* (2006) 102: 89-96
3. Furth PA et. al. *Ann.Y. Acad. Sci* (2011)1229:147-155
4. Huang Z et al. *Drug Metab. Dispos* (1998)24:990-905
5. Samavat H et al. *Cancer Lett.* (2015) 28: 231-243
6. Mikó E et al. *Cells* (2019) 8:293-326
7. Yang J et al. *Breast Cancer* (2016) DOI 10.107/s12282-016-0734-z
8. Zitvogel L et al. *Sci.Transl. Med.* (2015) 21: 271-280