



Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias
Médicas y Quirúrgicas

ESTUDIO DEL MICROBIOMA PULMONAR EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN

Violeta Esteban Ronda

Directora de la tesis:

Dra. Dña. María Francisca Colom Valiente

Codirectora de la tesis:

Dra. Dña. Consuelo Ferrer Rodríguez

Universidad Miguel Hernández de Elche

-2024-

MODALIDAD E INDICIOS DE CALIDAD

La presente Tesis Doctoral, titulada “Estudio del microbioma pulmonar en pacientes con cáncer de pulmón”, se presenta bajo la modalidad de **tesis convencional con el siguiente artículo científico como indicio de calidad:**

- Esteban V, Javaloyes J, Martínez-López S, Sancho-Chust JN, Gálvez B, Chiner E, et al. Alveolar macrophage expression differs according to lung cancer subtype. Arch Bronconeumol. 2024;60(1):59-61. DOI: 10.1016/j.arbres.2023.10.010

Esta revista está indexada en el *Journal Citations Reports*. Tiene un factor de impacto de 8 (2022). En la categoría de Sistema Respiratorio, esta revista se encuentra en el primer cuartil, en la posición 10 de 66 revistas.



Además, en el momento de depósito de la presente tesis doctoral, la siguiente publicación se encuentra pendiente de ser aceptada en la revista *Mycopathologia* con cambios y disponible actualmente como preprint (DOI: 10.21203/rs.3.rs-4187603/v1), (72).

- [Submitted to *Mycopathologia*, MYCO-D-24-00107, under review] Esteban V, Gilabert P, Ferrer C, Gálvez B, Chiner E, Colom MF. Affinity of *Malassezia* and other yeasts for pulmonary lipids.

Esta revista está indexada en el *Journal Citations Reports*. Tiene un factor de impacto de 5,5 (2022). En la categoría de Micología, esta revista se encuentra en el primer cuartil, en la posición 6 de 30 revistas.





La Dra. Dña. *María Francisca Colom Valiente*, directora, y la Dra. Dña. *Consuelo Ferrer Rodríguez*, codirectora de la tesis doctoral titulada **“Estudio del microbioma pulmonar en pacientes con cáncer de pulmón”**

INFORMAN:

Que Dña. *Violeta Esteban Ronda* ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado **“Estudio del microbioma pulmonar en pacientes con cáncer de pulmón”** conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmamos para los efectos oportunos, en Alicante a 31 de mayo de 2024

Directora de la tesis

Dra. Dña. *María Francisca Colom Valiente*

Codirector/a de la tesis

Dra. Dña. *Consuelo Ferrer Rodríguez*



La Dra. Dña. *María del Mar Masiá Canuto*, Coordinadora del Programa de Doctorado en **Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas**

INFORMA:

Que Dña. *Violeta Esteban Ronda* ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado “**Estudio del microbioma pulmonar en pacientes con cáncer de pulmón**” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en Alicante a 31 de mayo de 2024

Profa. Dra. Dña. *María del Mar Masiá Canuto*

Coordinadora del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas

FINANCIACIÓN

La presente Tesis Doctoral se ha realizado a través de la financiación de las siguientes becas de investigación:

- Beca Fundación RESPIRA de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía torácica Categoría General (1134/2020), dotada con 9000€.
- Beca Fundación de Neumología de la Comunidad Valenciana de la Sociedad Valenciana de Neumología, Investigador Joven 2021, dotada con 9000€.



ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS.....	17
RESUMEN.....	21
ABSTRACT	25
I. INTRODUCCIÓN.....	29
A. Perspectiva histórica	31
B. El microbioma pulmonar.....	33
B.1 La disbiosis y su relación con la enfermedad.....	35
B.2 Componente bacteriano.....	36
B.3 Componente fúngico.....	38
B.4 Componente vírico.....	39
C. El cáncer de pulmón.....	41
D. El sistema inmunitario en el cáncer de pulmón.....	42
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	45
A. Hipótesis de trabajo.....	47
B. Objetivos principales.....	47
C. Objetivos secundarios.....	47
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
A. Diseño del estudio.....	51
B. Población a estudio y período analizado.....	51
C. Cálculo del tamaño muestral.....	51
D. Criterios de inclusión y exclusión.....	51
E. Variables.....	52
F. Procedimientos del estudio.....	53
F.1. Lavado broncoalveolar.....	53
F.2. Procesado de muestras en el laboratorio: cultivos.....	54
F.3. Procesado de muestras en el laboratorio: extracción de ácidos nucleicos y obtención del micobioma por secuenciación de alto rendimiento.....	57

F4. Procesado de muestras en el laboratorio: estudio inmunológico.....	58
G. Análisis de datos.....	59
H. Aspectos éticos y legales.....	60
IV.RESULTADOS.....	63
A. Selección de pacientes.....	65
B. Análisis de las características basales de la muestra.....	66
C. Análisis del microbioma pulmonar en pacientes con cáncer de pulmón.....	68
D. Análisis del culturoma y relación con el microbioma molecular.....	75
E. Levaduras del microbioma pulmonar en lípidos del surfactante.....	78
F. Estudio inmunológico de macrófagos alveolares.....	80
V. DISCUSIÓN.....	83
A. Características de la cohorte.....	85
B. Composición del microbioma pulmonar.....	85
C. Correlación entre el culturoma y el microbioma molecular.....	90
D. Afinidad de <i>Malassezia</i> y otras levaduras por los lípidos pulmonares.....	90
E. Macrófagos alveolares en el cáncer de pulmón.....	93
F. Fortalezas y limitaciones del estudio.....	94
G. Aplicabilidad y desarrollos futuros de investigación.....	95
VI. CONCLUSIONES.....	97
VII. REFERENCIAS.....	101
VIII. ANEXOS.....	113
Anexo I. Hoja de recogida de datos de los pacientes incluidos en el estudio.....	115
Anexo II. Dictamen favorable del comité de ética de la Universidad Miguel Hernández para poder realizar el estudio.....	118
Anexo III. Consentimiento informado de donación de muestras biológicas al biobanco del Hospital General Universitario Dr. Balmis.....	119

Anexo IV. Tabla detallada con las características basales de los pacientes incluidos en el estudio.....	122
Anexo V. Análisis completo del microbioma pulmonar por estudio molecular.....	124
Anexo VI. Affinity of <i>Malassezia</i> and other yeasts for pulmonary lipids...	125
Anexo VII. Alveolar macrophage expression differs according to lung cancer subtype.....	145
IX. AGRADECIMIENTOS.....	153





LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
CPCNP	Carcinoma de pulmón de célula no pequeña
CPCP	Carcinoma de pulmón de célula pequeña
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
EPID	Enfermedad pulmonar intersticial difusa
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
GME	Monoestearato de glicerol
HTS	<i>High-Throughput Sequencing</i>
IL	Interleucina
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
LBA	Lavado broncoalveolar
M1	Macrófagos proinflamatorios
M2	Macrófagos inmunosupresores
MLNA	Agar modificado de Leeming y Notman
OTU	Unidad Taxonómica Operacional
PCoA	Análisis de coordenadas principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
QIIME	<i>Quantitative In-sights Into Microbial Ecology</i>
RNAr	Ácido ribonucleico ribosómico
SDA	Agar de Sabouraud con Dextrosa
SFB	Suero Fetal Bovino
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UNITE	<i>User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza</i>
VEB	Virus de Epstein Barr



RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1- Esquema del operón ribosómico fúngico.....	33
Figura 2- Representación de algunas de las múltiples interacciones que afectan al microbioma pulmonar.....	34
Figura 3- La disbiosis de la microbiota humana contribuye a la aparición de diferentes enfermedades.....	36
Figura 4- Representación del componente bacteriano del microbioma humano en sus diferentes localizaciones.....	37
Figura 5.- Fenotipos de macrófagos alveolares con sus diferentes funciones.....	43
Figura 6.- Fórmula para el cálculo del tamaño muestral.....	51
Figura 7- Esquema de la región del DNA que codifica para los genes ribosomales en hongos.....	58
Figura 8- Diagrama de selección de pacientes.....	65
Figura 9- Distribución de las muestras de pacientes con cáncer según su histología.....	67
Figura 10- Distribución de las muestras de pacientes sin cáncer de pulmón según su diagnóstico.....	68
Figura 11- Comparación de 2 métodos HTS para mostrar la prevalencia de especies fúngicas.....	69
Figura 12- Representación de la α -diversidad en las muestras de LBA de los dos grupos de pacientes.....	70
Figura 13- Representación de la α -diversidad en las muestras de LBA según los subtipos de cáncer.....	70

Figura 14- Análisis PCoA comparando diferencias en microbioma de pacientes con y sin cáncer.....	71
Figura 15- Análisis PCoA comparando diferencias en microbioma según los subtipos de cáncer de pulmón.....	71
Figura 16. Distribución de especies fúngicas detectadas en LBA en ambos grupos de pacientes (cáncer/no cáncer).....	74
Figura 17- Representación del valor de carga fúngica estimado sobre la base del número de secuencias detectadas en la secuenciación de las muestras y el número de colonias desarrolladas en los cultivos in vitro.....	76
Figura 18- Coincidencia en la detección de especies fúngicas en las muestras de LBA mediante secuenciación (amarillo) y cultivo (azul).....	77
Figura 19- Crecimiento de todos los aislamientos ensayados en el medio estándar (SDA para especies no lipodependientes y MLNA para especies de <i>Malassezia</i>) y en los medios que contienen lípidos pulmonares (DPPC y Surfactante -SURF-).....	78
Figura 20- Crecimiento de las especies de <i>Malassezia</i> tras 21 días en los medios de cultivo MLNA y NM1.....	79
Figura 21- Representación de la capacidad de crecimiento de las diferentes especies en medios de cultivo con lípidos pulmonares en comparación con su crecimiento respectivo en medios de cultivo estándar (SDA y MLNA).....	80
Figura 22- Ratio de macrófagos alveolares M2/M1 según el diagnóstico definitivo histológico.....	82
Figura 23- Poblaciones de macrófagos alveolares estudiadas mediante citometría de flujo	82

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1- Cepas de levadura utilizadas, se muestra el código de identificación y el origen del aislamiento.....	55
---	----

Tabla 2- Composición detallada de los medios de cultivo utilizados.....	56
Tabla 3- Relación de cebadores usados para la amplificación de la región <i>barcoding</i> de hongos.....	58
Tabla 4- Características basales de los pacientes incluidos en el estudio.....	66
Tabla 5- Resultado del desarrollo in vitro de las muestras inoculadas en medios específicos para el desarrollo de hongos.....	75
Tabla 6- Asilamientos obtenidos en el cultivo de las muestras de LBA.....	76
Tabla 7- Especies fúngicas detectadas por cultivo en las muestras de LBA e identificadas mediante métodos fenotípicos y moleculares.....	76
Tabla 8- Características basales de los pacientes a los que se realizó el estudio inmunológico.	80







Bibliotecas
UNIVERSITAS Miguel Hernández

RESUMEN



RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El microbioma pulmonar se ha estudiado de forma escasa, sin embargo, empieza a haber evidencia de su papel en la homeostasis y la inmunomodulación del tracto respiratorio. El microbioma pulmonar de los pacientes con cáncer de pulmón podría incluir microorganismos con capacidad oncogénica (como *Malassezia restricta* para la que empieza a haber evidencias en otros órganos) o presentar un perfil diferente al de aquellos pacientes que no lo padecen. Dentro del cáncer de pulmón existen subtipos, cuyo pronóstico y tratamiento es diferente, lo que podría estar condicionado por la existencia de perfiles de microbioma distintos y/o la expresión de factores inmunológicos diferentes como el tipo de macrófagos alveolares.

OBJETIVOS

Describir el microbioma pulmonar (géneros y especies fúngicas) en pacientes con cáncer de pulmón y con patologías benignas, a través del estudio de muestras de vía aérea inferior obtenidas por lavado broncoalveolar (LBA) mediante broncoscopia.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio observacional, prospectivo y multicéntrico, consistente en estudiar el microbioma en muestras de LBA de pacientes con cáncer de pulmón y con otra patología benigna entre febrero de 2015 y noviembre de 2022. Los sujetos se incluyeron si no padecían infección activa ni se encontraban inmunodeprimidos. Se realizaron cultivos, extracción de ácidos nucleicos, obtención del microbioma por secuenciación de alto rendimiento y análisis inmunológico para estudiar los subtipos de macrófagos alveolares.

RESULTADOS

Se reclutaron 97 pacientes de cuatro hospitales de la provincia de Alicante, de los cuales obtuvimos 78 muestras de LBA válidas para el estudio. La distribución entre los dos colectivos de pacientes (cáncer/sin cáncer) fue de 46/32. Las especies más prevalentes halladas en pacientes con cáncer de pulmón, tanto por biología molecular como por cultivo, fueron: *Malassezia restricta*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Cladosporium spp.* Pero el núcleo o “core” del microbioma estuvo únicamente constituido

por el género *Malassezia*, fundamentalmente debido a la presencia de *M. restricta*, presente en 75 de las 78 muestras (96,1%) y para la que demostramos su capacidad para crecer en medios con lípidos pulmonares. No encontramos diferencias significativas de perfil de microbioma entre ambos grupos de pacientes, ni tampoco según el subtipo tumoral. Sin embargo, encontramos que los pacientes con cáncer de pulmón tienen preponderancia de macrófagos M2 y en los pacientes con cáncer de células pequeñas (CPCP) hay más macrófagos M1 que en los otros subtipos de cáncer, haciendo que su ratio M2/M1 sea significativamente menor.

CONCLUSIONES

El núcleo del microbioma pulmonar está constituido por *Malassezia restricta*, una levadura lipodependiente que podría tener su nicho ecológico en el aparato respiratorio, dada su elevada prevalencia en esta localización y su capacidad para utilizar lípidos pulmonares para su desarrollo. La diversidad del microbioma disminuye en pacientes con cáncer, en los que hay mayor presencia de macrófagos M2, con una marcada disminución de la ratio M2/M1 exclusiva del CPCP.

PALABRAS CLAVE

Microbioma, levaduras lipofílicas, lípidos pulmonares, *Malassezia*, cáncer de pulmón, macrófagos alveolares.



Biblioteca
UNIVERSITAS Miguel Hernández

ABSTRACT



ABSTRACT

BACKGROUND

The pulmonary mycobiome has been poorly studied; however, evidence of its role in maintenance of homeostasis and immunomodulation of the respiratory tract is beginning to emerge. The pulmonary mycobiome of patients with lung cancer could include microorganisms that promotes oncogenesis (such as *Malassezia restricta*, for which evidence is beginning to emerge in other organs) or present a different profile to that of patients who do not have lung cancer. Within lung cancer there are subtypes, whose prognosis and treatment are different, which could be conditioned by the existence of different mycobiome profiles and/or the different expression of immunological factors such as the type of alveolar macrophages.

OBJECTIVES

To describe the pulmonary mycobiome (fungal genera and species) in patients with lung cancer and benign pathologies, through the study of lower airway samples obtained by bronchoalveolar lavage (BAL) taken during bronchoscopy.

MATERIAL AND METHOD

Observational, prospective, multicenter study, consisting of studying the mycobiome in BAL samples from patients with lung cancer and with other benign pathology from February 2015 to November 2022. Subjects were included if they did not have active infection and were not immunosuppressed. Cultures, nucleic acid extraction, obtaining the microbiome by high-throughput sequencing and immunological analysis were performed to study alveolar macrophage subtypes.

RESULTS

We recruited 97 patients from four hospitals in the province of Alicante, from which we obtained 78 BAL valid samples for the study. The distribution between the two groups of patients (cancer/controls) was 46/32. The most prevalent species found in lung cancer, by both culture and molecular study were: *Malassezia restricta*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa* and *Cladosporium spp.* But the core of the mycobiome was only constituted by the genus *Malassezia*, mainly due to the presence of *M. restricta*,

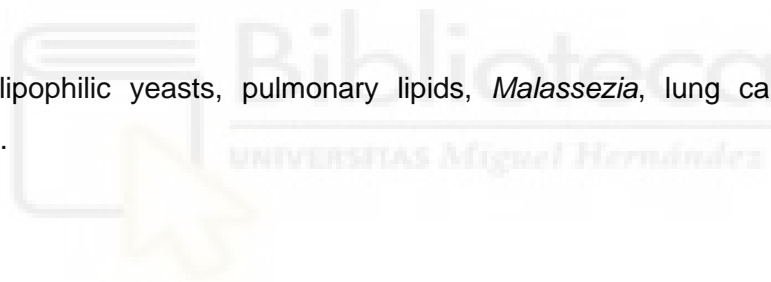
present in 75 of the 78 samples (96.1%), and for which we demonstrated its ability to grow on media containing pulmonary lipids. We found no significant differences in the mycobiome profile between the two groups of patients, nor according to tumor subtype. However, in lung cancer patients we found a preponderance of M2 macrophages and in patients with small cell lung cancer (SCLC) we detected more M1 macrophages than in the other cancer subtypes, making their M2/M1 ratio significantly lower.

CONCLUSIONS

The core of the pulmonary mycobiome consists of *Malassezia restricta*, a lipid-dependent yeast that may have its ecological niche in the respiratory tract given its high presence in this location and its ability to utilize pulmonary lipids for its development. The diversity of the mycobiome decreases in cancer patients, in whom there is a greater presence of M2 macrophages, with a marked decrease in the M2/M1 ratio exclusive of SCLC.

KEYWORDS

Mycobiome, lipophilic yeasts, pulmonary lipids, *Malassezia*, lung cancer, alveolar macrophages.





I. INTRODUCCIÓN



A. PERSPECTIVA HISTÓRICA

El origen del término "microbiota" se remonta a principios del siglo XX, cuando se descubrió que un gran número de microorganismos como: bacterias, virus y levaduras, vivían en varios lugares del cuerpo humano (intestino, piel o cavidad oral) (1).

Aunque con frecuencia se utilizan los términos "microbiota" y "microbioma" como si fuesen intercambiables, lo cierto es que hay diferencias entre ambos. La palabra microbiota describe los microorganismos vivos encontrados en un determinado ambiente, como puede ser la microbiota intestinal u oral. En cambio, la palabra microbioma define a la colección de genomas de todos los microorganismos presentes en un determinado ambiente; incluyendo también elementos estructurales microbianos, metabolitos y condiciones ambientales (1). A día de hoy se considera al microbioma humano como "el órgano oculto", ya que aporta 150 veces más información genética que todo el genoma humano. Además, se sabe que este microbioma humano tiene un papel fundamental en el funcionamiento del sistema inmune y el metabolismo, incluso se sabe que modula algunas interacciones farmacológicas (1).

La caracterización y el análisis del microbioma humano se han visto favorecidos por los avances de la biología molecular y de la bioinformática. Tradicionalmente el cultivo y aislamiento de microorganismos eran el *gold standard* para la identificación de los mismos. Tras el aislamiento de colonias, observación directa al microscopio, pruebas bioquímicas y cultivos enriquecidos se llegaba a la identificación del patógeno (2). Sin embargo, en numerosas ocasiones se observó que, cuando se miraban las muestras al microscopio, existía mayor diversidad celular que la que se conseguía en el crecimiento por cultivo, por lo que esta técnica podría introducir sesgos, seleccionando los microorganismos que se consiguen aislar bajo unas condiciones de laboratorio determinadas, mientras que una gran diversidad de microorganismos de la muestra podría permanecer sin ser explorada (2). Esto es lo que se denominó "la gran anomalía del recuento en placa" (3).

El esclarecimiento de la filogenia bacteriana basada en la subunidad pequeña del 16S del RNA ribosómico (RNAr), sentó las bases para la identificación genómica y el análisis de las comunidades microbianas. El descubrimiento que se produjo por Woese C en 1977 permitió descubrir las arqueas como un nuevo dominio y estableció la separación de éstas de las bacterias, dentro de los procariotas (4). El gen 16S RNAr, tiene aproximadamente 1.500 pares de bases, no codifica proteína, contiene regiones hipervariables, pero está lo suficientemente conservado para que sea sencilla la

amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y las secuencias obtenidas se puedan comparar con las bases de datos públicas de referencia para bacterias y así poder asignar la taxonomía (4). El gen 16S RNAr funciona a efectos prácticos como un código de barras genético para la identificación de bacterias (técnicas de *DNA barcoding*).

En 2003, tras la publicación por el biólogo Hebert P y colaboradores (5) del método de identificación basado en secuencias identificativas (*Barcoding*), se trató de estandarizar el método para la clasificación taxonómica de animales, plantas, bacterias, hongos, etc. Ellos propusieron un fragmento de 600 pares de bases del ácido desoxirribonucleico (DNA) mitocondrial, que codifica para la subunidad I de la citocromo c oxidasa como herramienta “código de barras” (6). Aunque inicialmente su uso fue una excelente herramienta, incluso para distinguir entre especies, su utilidad en estudios taxonómicos y/o filogenéticos en plantas, hongos y bacterias estuvo limitada y hubo que buscar otras secuencias de genes candidatos a usarse como estos marcadores. A día de hoy el marcador más aceptado universalmente para análisis en bacterias es el gen 16S RNAr.

En cuanto a los hongos, aunque inicialmente hubo controversia a la hora de elegir el método para la identificación genómica y el análisis de las comunidades fúngicas, fue en 2012 tras la publicación de Schoch CL y colaboradores cuando quedó establecido que globalmente la mejor herramienta era la secuenciación de las regiones ITS (*Internal Transcribed Spacer*): ITS1 e ITS2 (7). Se trata de fragmentos de DNA ribosómico que funcionan como un código de barras para identificar las especies de hongos. Estas regiones, tienen unos 450 – 750 pares de bases y no son parte de un ribosoma funcional como tal, están sujetas a cambios a través de la evolución, los cuales son característicos para cada especie. Permiten utilizar cebadores universales y facilitan la amplificación por PCR, de esta manera se pueden identificar hongos de forma, segura, rápida y confiable. Su estructura aparece representada en la figura 1. A día de hoy, la secuenciación de las regiones ITS permite la identificación de hasta el 97% de las especies de hongos conocidas, sin embargo, sí que es cierto que cuentan con algunas limitaciones a la hora de identificar especies de géneros como *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium* o *Fusarium*, donde harían falta otros marcadores adicionales (8). Esto es debido a la gran diversidad y antigüedad de los hongos, donde es complicado que un solo método de *DNA barcoding* sirva para identificar todos los géneros y especies.



Figura 1. Esquema del operón ribosómico fúngico. Se puede apreciar en la imagen dos regiones hipervariables de espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2, marcadas en rojo) y tres conservadas (18S, 5,8S y 28S rRNA, marcadas en azul). Modificada de Palomares JC, *et al.* (9).

En cuanto a la filogenia de los virus, no existe un determinado gen o fragmento genómico normalizado de forma universal como código de barras, debido a su gran biodiversidad y frecuentes mutaciones, no existe un gen compartido por todos los genomas víricos (10).

Por lo tanto, podemos ver que la filogenia ayuda a entender la biología de los microorganismos y su papel en los diferentes ecosistemas, de hecho, son precisamente los análisis metagenómicos, los que nos han permitido reconocer el microbioma humano y entender que los microorganismos presentes, más que simples comensales, participan de manera activa en la homeostasis de los órganos donde se encuentran.

En cuanto a los métodos de secuenciación genética, también se han producido grandes avances en este campo. Inicialmente se utilizó el método Sanger, desarrollado por Sanger F y Coulson A en 1975, que permitía secuenciar el DNA a través de la incorporación de dideoxinucleótidos terminales (11). Mediante esta técnica se consiguió secuenciar por primera vez un genoma, el del bacteriófago MS2. Este método es el que se utilizó para la secuenciación del genoma humano (1985-2003). Sin embargo, no estaba exento de limitaciones: era un método largo y caro, lo que hacía inviables los proyectos de secuenciación a gran escala (11). Es así como surge en el siglo XXI la tecnología de secuenciación masiva o de alto rendimiento (*High-Throughput Sequencing* o HTS) que, en lugar de basarse en la terminación en cadena, emplean un procesamiento masivamente paralelo que permite la secuenciación simultánea de múltiples fragmentos de DNA. Esto aumentó drásticamente la velocidad y la eficacia del análisis del genoma (11).

B. EL MICROBIOMA PULMONAR

Tradicionalmente existía la idea de que el aparato respiratorio se componía de órganos estériles, sin embargo, en la última década se ha descrito en el pulmón un complejo ecosistema microbiano que, en estado de salud, permanece en equilibrio con las células

propias del parénquima y del sistema inmunitario local; es lo que denominamos microbioma pulmonar (12) y está formado por bacterias, virus, protozoos y hongos. La composición del microbioma pulmonar parece estar muy relacionada con la del entorno exterior, ya que la mucosa del aparato respiratorio está expuesta y en constante interacción con el medio ambiente, pero además pueden existir modificaciones del mismo por el ejercicio físico, la dieta, fármacos, diferentes enfermedades y otras exposiciones ambientales, como se puede apreciar en la figura 2. La influencia del microbioma, su composición y función, en los estados de salud y enfermedad humana, está constituyendo un campo nuevo de estudio que aporta muy interesantes perspectivas especialmente para explicar la patogenia de procesos que hasta ahora han tenido un origen desconocido o no totalmente explicado, así como para ayudar al desarrollo de futuros biomarcadores diagnósticos o pronósticos (12).

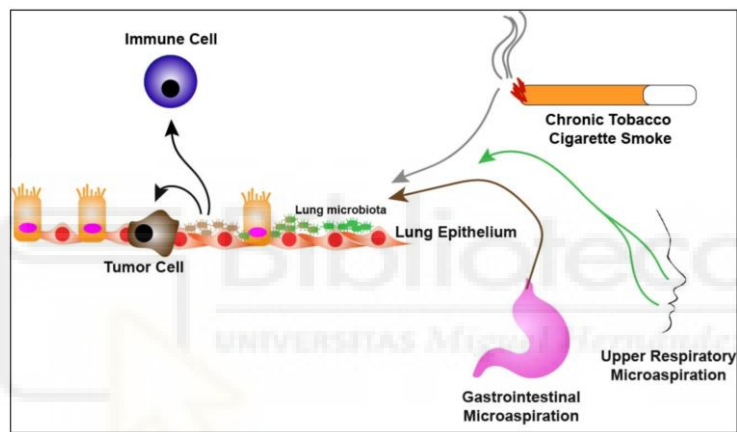


Figura 2 - Representación de algunas de las múltiples interacciones que afectan al microbioma pulmonar. Imagen de Weinberg F, *et al.* (13).

Uno de los principales indicadores de salud de la microbiota es la biodiversidad, podemos clasificar esta diversidad en alfa y beta. Se define como diversidad alfa a la riqueza de especies de una comunidad a la que consideramos como homogénea presente en un hábitat o ecosistema determinado. La α -diversidad se expresa mediante distintos parámetros: índice de Chao, índice de Shannon, índice de Simpson o alfa de Fisher. El índice de Shannon también llamado Shannon–Wiener, es el más usado en la literatura en estudios del microbioma. La diversidad beta mide las diferencias en la composición de especies de una o más comunidades locales que hay en la región, es decir, mide las unidades taxonómicas de cada especie encontradas entre dos hábitats distintos o en el mismo hábitat a diferentes tiempos. La β -diversidad se mide utilizando coeficientes de disimilitud, uno de los más utilizados en los estudios de microbioma es el análisis de Bray-Curtis (1, 2).

El surfactante pulmonar es la principal sustancia que recubre el epitelio del tracto respiratorio inferior humano, es una mezcla compleja de lípidos y proteínas que tiene como función primordial facilitar el intercambio gaseoso, reduciendo la tensión superficial en la interfase aire-líquido del alvéolo para evitar su colapso durante la espiración (14). Es producido por los neumocitos tipo II, tiene un alto contenido lipídico, siendo la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) el fosfolípido más abundante (15). El surfactante pulmonar influye en la composición del microbioma respiratorio (16-18), ya que se ha relacionado con la respuesta inmune y con la contención de patógenos. Existe una enfermedad pulmonar llamada proteinosis alveolar en la que hay una sobreproducción de surfactante disfuncional (16), documentándose un aumento del riesgo de infección por *Nocardia spp.*, micobacterias y hongos oportunistas, siendo *Aspergillus spp* y *Cryptococcus spp* los agentes causales más prevalentes (17). Además, un trabajo reciente ha demostrado una importante interacción entre las células de *Cryptococcus neoformans* y el surfactante pulmonar en un modelo de organoide 2D-*minilungs*, con aumento en la expresión de las proteínas del surfactante y aumento en la secreción de la Interleucina (IL)-8, que tiene la función de reclutar neutrófilos en el epitelio alveolar (18).

B. 1. LA DISBIOSIS Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD

Existe cada vez más evidencia de que una alteración del microbioma (disbiosis) puede promover la carcinogénesis en determinados órganos, a través de vías metabólicas, inflamatorias o inmunológicas (19, 20). También se ha relacionado la disbiosis con enfermedades cardiovasculares, respiratorias, neurodegenerativas, etc (1), como se puede apreciar en la Figura 3.

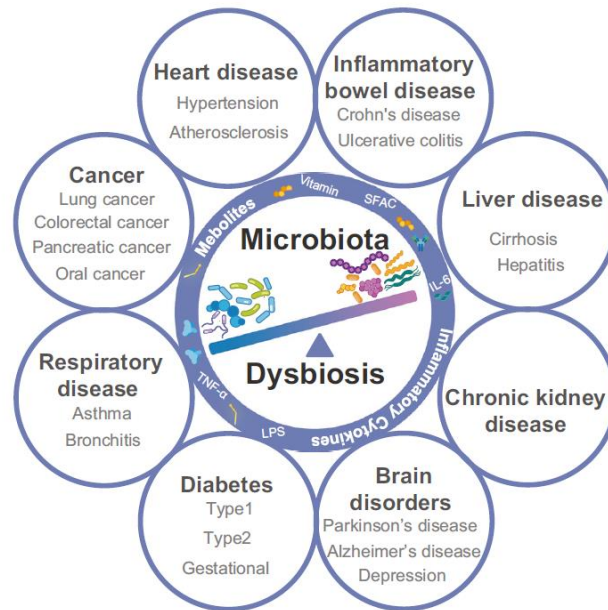


Figura 3. La disbiosis de la microbiota humana contribuye a la aparición de diferentes enfermedades. Imagen de Hou K, *et al.* (1).

El microbioma más estudiado ha sido hasta el momento el intestinal (21) y concretamente se ha estudiado mucho más el componente bacteriano, que el vírico o el fúngico. En concreto dentro del bacterioma intestinal se ha relacionado la presencia de la proteobacteria *Helicobacter pylori* con aumento del riesgo de padecer cáncer gástrico (22), o en modelo murino la presencia de *Citrobacter rodentium* ha demostrado favorecer el desarrollo de carcinoma colorrectal (23); recientemente el microbioma intestinal también se ha relacionado con la respuesta a la inmunoterapia en pacientes con melanoma de tal manera que, el microbioma fecal de los pacientes respondedores mostró una diversidad alfa y una abundancia relativa de bacterias de la familia *Ruminococcaceae* significativamente mayor (24). Los perfiles inmunológicos indicaron una mayor inmunidad sistémica y antitumoral en los pacientes respondedores con un microbioma intestinal favorable (24).

B.2. COMPONENTE BACTERIANO

El microbioma pulmonar ha sido mucho menos estudiado que el digestivo, en sujetos sanos el componente bacteriano está dominado por diferentes grupos taxonómicos como Bacteroidetes y Firmicutes con géneros prominentes como *Prevotella*, *Veillonella* y *Streptococcus* (1), como se muestra en la figura 4.

Microbiota composition in different regions

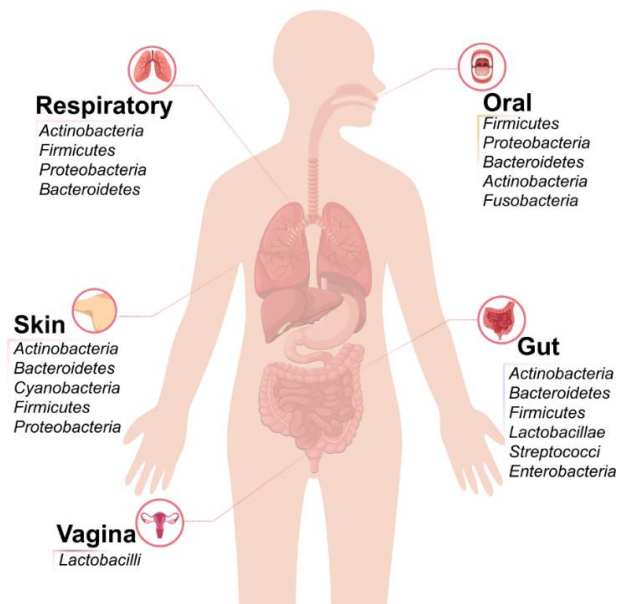


Figura 4. Representación del componente bacteriano del microbioma humano en sus diferentes localizaciones. Imagen de Hou K, *et al.* (1).

En pacientes con carcinoma broncogénico la mayoría de estudios han analizado componentes del microbioma en muestras de esputo, asumiendo una posible contaminación a nivel de la orofaringe y vía aérea superior. Los estudios de microbioma realizados con muestras de vía aérea inferior en pacientes con cáncer de pulmón son escasos. Se sabe desde hace años por diferentes estudios que la infección por *Mycobacterium tuberculosis* conlleva un aumento del riesgo de cáncer de pulmón, por la inflamación persistente que se produce con aumento de síntesis de factor de necrosis tumoral y por la fibrosis que se puede producir con aumento de síntesis de matriz extracelular (25). Un estudio realizado con 216 broncoaspirados en pacientes con cáncer de pulmón demostró colonización por bacterias Gram negativas como *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter* y *Escherichia coli* (26). No obstante, el análisis de estos microorganismos fue cultivo-dependiente, no se emplearon técnicas de secuenciación de alto rendimiento. Lee SH y colaboradores analizaron muestras de lavado broncoalveolar (LBA) de 28 pacientes que se sometieron a broncoscopia para obtener un diagnóstico de confirmación por masas pulmonares; de éstos, en 20 pacientes se confirmó el diagnóstico de carcinoma broncogénico mientras que 8 fueron diagnosticados de enfermedades benignas. Mediante técnicas cultivo-independientes los autores encontraron un aumento relativo de los géneros *Veillonella* y *Megasphaera* así como Firmicutes en pacientes con patología maligna (27). Tsay JJ y colaboradores recogieron muestras de LBA de pacientes sometidos a broncoscopia diagnóstica por

nódulos pulmonares, tanto del pulmón afectado como del contralateral. Se diagnosticó a 39 pacientes de cáncer de pulmón, 36 tuvieron otro diagnóstico de enfermedad no maligna e incluyeron 10 sujetos sanos como controles. Encontraron que en la vía respiratoria inferior de pacientes con cáncer de pulmón existía un aumento de especies que normalmente abundan en orofaringe (*Streptococcus* y *Veillonella*) cuando los compararon con pacientes con patología no maligna y sujetos sanos (28), estas bacterias se han vinculado con la *upregulation* de las vías ERK y PI3K, asociadas a proliferación celular e invasión tisular. Todos estos datos apoyan la existencia de una microbiota pulmonar alterada en pacientes con cáncer de pulmón y la presencia de microorganismos de la orofaringe como resultado posible de microaspiraciones. En un estudio realizado por Liu HX y colaboradores en el que se incluyeron 24 pacientes con cáncer de pulmón y 18 sujetos sanos, mediante estudio de muestras de LBA se obtuvo que los pacientes con cáncer de pulmón tuvieron una disminución de la diversidad microbiana respecto a los sujetos sanos (29). Un estudio reciente ha demostrado que la microbiota del tracto respiratorio inferior predice la recurrencia del carcinoma de pulmón de célula no pequeña (CPCNP) en estadios precoces tras la resección. Patnaik SK y colaboradores recogieron muestras de LBA pre-cirugía, tejido tumoral y tejido adyacente no tumoral, así como muestras de saliva en 48 pacientes y encontraron diferencias significativas entre el microbioma de los pacientes que presentaron recurrencia dentro de los 32 meses tras la cirugía respecto a los que no tuvieron recurrencia. Estos resultados se obtuvieron de forma independiente a la edad, sexo, hábito tabáquico, histología y grado del tumor (30). En los pacientes con recurrencia se obtuvo mayor presencia de *Sphingomonas*, *Psychromonas* y *Serratia*, mientras que la abundancia de *Cloacibacterium*, *Geobacillus* y *Brevibacterium* se encontraron reducidas (30).

B. 3. COMPONENTE FÚNGICO

La investigación sobre el microbioma pulmonar se ha centrado principalmente en las bacterias, mientras que el micobioma pulmonar que es la colección de genomas fúngicos que se encuentran en el tracto respiratorio inferior, se ha estudiado menos debido a su menor contenido y a la falta de métodos completamente estandarizados para su análisis (31). Dentro del campo de los hongos, actualmente existe evidencia de que el género *Malassezia* está vinculado al desarrollo de carcinomas digestivos, especialmente a cáncer pancreático y colorrectal (32, 33), además parece implicado en el carcinoma de cérvix uterino (34) y también se ha propuesto su relación con la

carcinogénesis cutánea (35). Se postula que el microbioma pudiera tener un papel en la génesis del carcinoma pulmonar, sin embargo, los estudios existentes son escasos (36-39). En el estudio realizado por Zhao Y y colaboradores con muestras de LBA y tejido tumoral, encuentran que en los pacientes con CPCNP *Alternaria arborescens* es el hongo más prevalente, seguido de cerca por *Malassezia restricta* y *Meyerozyma guilliermondii* (36). Otro estudio reciente realizado por Dohlman AB y colaboradores muestra que los pacientes con cáncer de pulmón tienen mayor abundancia de *Blastomyces dermatitidis* (37). Mientras que Liu NN y colaboradores encuentran que *Aspergillus sydowii* favorece la progresión tumoral en roedores con adenocarcinoma pulmonar (38), induciendo la expansión de células mieloides supresoras y su activación de secreción de la IL-1b, a través de una vía patogénica concreta. Se favorece la progresión tumoral favoreciendo un ambiente de inmunosupresión. El grupo de Xu X y colaboradores publicaron recientemente un estudio realizado con muestras de esputo de 65 pacientes con diferentes enfermedades y controles sanos, encontrando en los pacientes con cáncer de pulmón una alta proporción de *Malassezia* (39).

Nuestro grupo de investigación publicó en 2020, el estudio del microbioma de muestras de LBA obtenidas mediante broncoscopia, de los primeros 45 pacientes reclutados sin patología infecciosa, ni inmunodepresión. Utilizamos como diana molecular el ITS2, encontrando un alto número de secuencias del género *Malassezia restricta* (83.3% de las muestras), padeciendo el 42,2% de los pacientes incluidos cáncer de pulmón (40). No conseguimos demostrar la viabilidad de estas levaduras mediante cultivo, ya que presentan requerimientos especiales al ser la mayoría lipodependientes y todas lipofílicas (41, 42).

Por lo tanto, no existen todavía a día de hoy conclusiones firmes acerca del vínculo entre el microbioma fúngico y el cáncer de pulmón.

B. 4. COMPONENTE VÍRICO

Los virus se han relacionado con el desarrollo de carcinomas desde hace mucho tiempo, llevando a la definición de los llamados oncovirus. Dentro de los virus, los más conocidos son los de la familia *Herpesviridae* como el virus Epstein-Barr (VEB) que se ha

relacionado con la aparición de linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo y diferentes síndromes linfoproliferativos (43). El herpes virus 8 se ha vinculado con sarcoma de Kaposi en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana. También diferentes papilomavirus humanos como los serotipos 16 y 18 y otros, se han relacionado con cáncer de cuello de útero, de pene y anogenital (43). El virus de la hepatitis B y hepatitis C se ha relacionado con la aparición de hepatocarcinoma y el virus linfotrópico humano de células T tipo 1 se ha vinculado con leucemia de células T (43). En general, aquellos virus que son capaces de hacer integración en el genoma celular son los que tienen asociado un mayor riesgo de activar la carcinogénesis (43).

Si nos centramos en la relación entre el viroma y el cáncer de pulmón, la mayor evidencia se encuentra alrededor de los papilomavirus y el VEB. Actualmente se sabe que los pacientes que han tenido tumores relacionados con papilomavirus serotipos 16 y 18 (cervical, orofaríngeo, laríngeo o vulvar) tienen mayor riesgo de padecer CPCNP (44). Existen diferentes hipótesis acerca de cómo estos virus llegan al pulmón: bien a través de la circulación sanguínea, o a través de microaspiraciones desde la cavidad oral (sexo oral sin protección), cayendo a través de la tráquea desde la mucosa oronasal hacia la laringe y posteriormente al árbol traqueobronquial o bien por transmisión aérea (44). Estos serotipos pueden ser un factor de carcinogénesis independiente, pero se sabe que el tabaco puede actuar de forma sinérgica en estos casos, ya que favorece que ocurra una metaplasia escamosa en el epitelio pulmonar que favorece la entrada del virus, como ocurre con el cáncer de cuello de útero. La mayoría de los casos son carcinomas epidermoides de pulmón, seguidos de adenocarcinomas y la mayoría de los casos se dan en población asiática (44).

En el caso de infección por VEB, el riesgo de cáncer de pulmón se encuentra aumentado por cuatro, y se vincula específicamente a un tipo de cáncer donde la infiltración linfática es muy importante, como el linfoepitelioma pulmonar que pertenece al grupo de CPCNP (45). También se ha vinculado la infección por VEB con otros tipos más frecuentes de CPCNP como el carcinoma epidermoide o el adenocarcinoma. El tracto respiratorio puede actuar como reservorio para el VEB. La población asiática de nuevo es la que muestra mayor susceptibilidad con esta asociación.

C. EL CÁNCER DE PULMÓN

El cáncer de pulmón es un grave problema de salud pública, siendo la primera causa de muerte por cáncer en el mundo, suponiendo más del 15% del total de muertes en pacientes con cáncer (46). Es el segundo cáncer más comúnmente diagnosticado, se calcula que en 2020 se produjeron 2,2 millones de nuevos casos de cáncer de pulmón y 1,8 millones de fallecimientos en el mundo atribuibles a éste (46).

Es una enfermedad que afecta predominantemente a pacientes con edad entre los 60-79 años. Se calcula que más del 70% de los casos se diagnostica en estadios avanzados con enfermedad metastásica, siendo de entrada estos tumores no resecables (47). El promedio de supervivencia a 5 años es inferior al 20%. Aunque el tratamiento de estos pacientes ha experimentado grandes avances en los últimos años, fundamentalmente con la llegada de la inmunoterapia, desafortunadamente la mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón no desarrollan respuestas duraderas con estos tratamientos, además de que el realizar el diagnóstico en etapas tan avanzadas condiciona su mal pronóstico (47-50). Actualmente se sabe que diferentes factores ambientales están implicados en la carcinogénesis pulmonar como pueden ser: tabaquismo, exposición a humo de biomasa, radón y contaminación ambiental. De hecho, se sabe que el 80% de los casos de cáncer de pulmón están asociados a la exposición al tabaco (47-50). Sin embargo, en hasta el 15% de los pacientes no se encuentra ninguna exposición de riesgo conocida, indicando que existen otros factores que favorecen la génesis del tumor, como pueden ser factores genéticos o agentes infecciosos todavía no suficientemente bien identificados, como podrían ser los componentes del microbioma pulmonar. De acuerdo con las características histológicas, esta patología se divide principalmente en: tumores epiteliales (donde destaca el carcinoma epidermoide), adenocarcinomas, carcinomas neuroendocrinos y carcinomas mesenquimales (51). Dentro del grupo de los carcinomas neuroendocrinos de pulmón caracterizados por la expresión positiva de marcadores neuroendocrinos por inmunohistoquímica (cromogranina, sinaptofisina y CD56), hasta el 80% de los casos son carcinomas de células pequeñas (CPCP) o microcíticos, el 12% son carcinomas neuroendocrinos de células grandes y el 8% restante, tumores carcinoides típicos y atípicos. El CPCP puede diferenciarse del resto de tumores neuroendocrinos por su alto índice de mitosis (al menos 10 mitosis/2 mm²) con un índice de proliferación Ki-67 entre 50-100% (50). El CPCP supone el 15% globalmente de los casos de cáncer de pulmón, se caracteriza a diferencia del resto de tumores no neuroendocrinos, tradicionalmente

llamados carcinomas de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), por tener un comportamiento más agresivo ya que hasta un 10-20% de los casos presentan metástasis cerebrales al diagnóstico y hasta el 40-50% de los mismos las desarrollan durante su curso evolutivo (50). Su aparición guarda mayor relación con la exposición a tabaco que el CPCNP, tienen peor pronóstico, siendo operables en mínimas ocasiones, siendo también poco frecuente la posibilidad de ofrecer un tratamiento dirigido, tratándose la mayoría de los casos con quimioterapia y radioterapia. Además, con frecuencia es de localización central en la vía aérea y dan lugar a síndromes paraneoplásicos de diversa naturaleza (endocrinos, neuromusculares, hematológicos, etc.) (50).

Como podemos observar el pronóstico y tratamiento de los diferentes tipos de cáncer de pulmón es distinto, posiblemente influenciados además de por el microbioma, por el papel diferente que pueda jugar el sistema inmunitario en estos procesos (47-50).

D. EL SISTEMA INMUNITARIO EN EL CÁNCER DE PULMÓN

Cada vez se aprecia más el papel del sistema inmunitario en la carcinogénesis, hasta el punto de que la evasión inmunitaria se considera actualmente uno de los rasgos distintivos del cáncer (52-54). Los macrófagos constituyen la mayor parte del infiltrado inmunitario en los tumores y son el tipo celular clave que vincula la inflamación y el cáncer (55, 56). Son células extremadamente plásticas capaces de desempeñar diversas funciones, con sus distintos fenotipos o subpoblaciones: M1 o macrófagos activados clásicamente y M2 o macrófagos activados alternativamente (57, 58). La diferenciación de los macrófagos M1 se produce en respuesta a la estimulación por parte de citocinas proinflamatorias Th1 y a la activación del receptor *Toll-like* y está implicada en la respuesta Th1 frente a patógenos. Son excelentes células presentadoras de antígenos que dan lugar a inmuno-estimulación y aceleran la activación de respuestas inmunitarias adaptativas. Por el contrario, se ha demostrado que las citocinas Th2 inducen la polarización de los macrófagos M2 y participan en la respuesta inmunitaria Th2. Los macrófagos M2 se caracterizan por una menor capacidad para presentar antígenos y por su función de eliminación de desechos y promoción de la angiogénesis, la remodelación tisular y la reparación. En el cáncer en concreto, se cree que los M1 favorecen el inicio de la carcinogénesis, mientras que los M2 suelen estar

asociados a la progresión tumoral (57, 58). En la figura 5 aparecen representados los diferentes fenotipos de macrófagos alveolares con sus diferentes funciones.

A su vez, en los últimos años se ha evidenciado que el microbioma tiene la capacidad de modular el sistema inmunitario (59). Estas interacciones con el sistema inmunitario se producen a través de las acciones de diversas estructuras y metabolitos microbianos, con resultados que pueden ser beneficiosos o perjudiciales para el huésped.

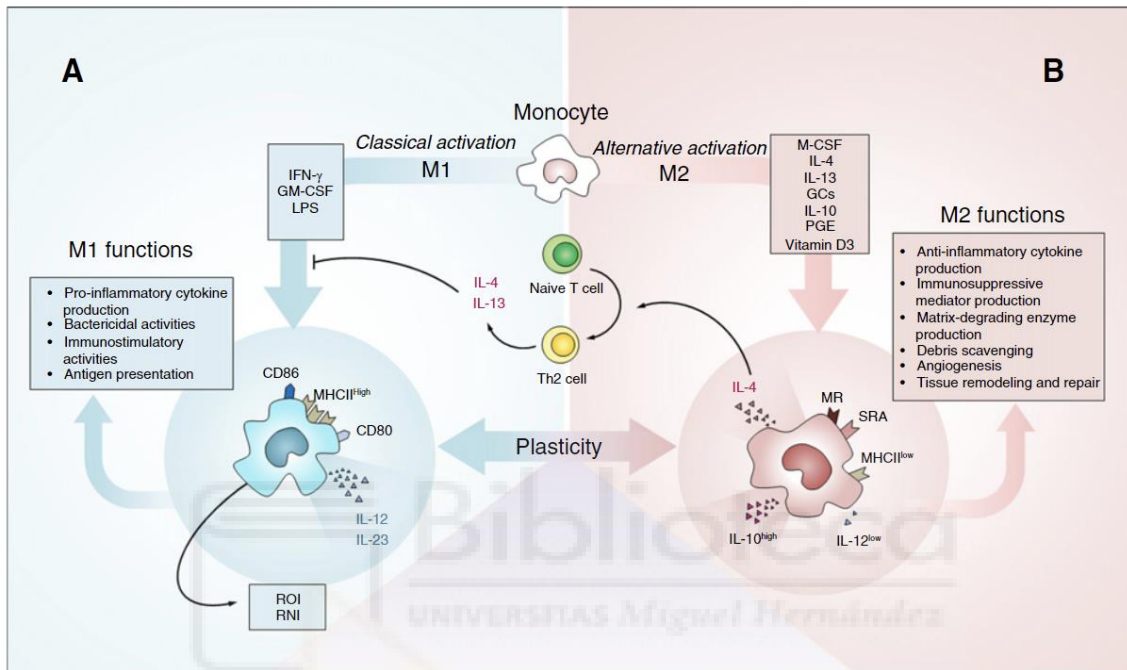


Figura 5 – Fenotipos de macrófagos alveolares con sus diferentes funciones. Imagen de Conway EM, *et al.* (55).





II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



A. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La hipótesis del estudio es que el microbioma pulmonar puede incluir microorganismos con capacidad oncogénica o facilitadores de la oncogénesis, de forma que determinados perfiles de microbioma pulmonar puedan relacionarse con el desarrollo de cáncer de pulmón. Además, esta posible modificación del microbioma puede acompañarse de diferencias en la expresión de macrófagos alveolares que lleven a estados pro o anti-inflamatorios, explicando el distinto comportamiento de algunos de estos carcinomas.

B. OBJETIVOS PRINCIPALES

Describir el microbioma pulmonar en pacientes con cáncer de pulmón frente al de un grupo control sin cáncer, a través del estudio de muestras de vía aérea inferior obtenidas mediante LBA.

C. OBJETIVOS SECUNDARIOS

Los objetivos secundarios del presente estudio son:

- 1- Describir y comparar el microbioma pulmonar, mediante estudio de muestras de vía aérea inferior obtenidas mediante LBA, en pacientes con cáncer de pulmón y sin cáncer (controles), mediante técnicas de secuenciación de alto rendimiento (secuenciación masiva).
- 2- Relacionar la presencia de microorganismos o perfiles de microbioma pulmonar concretos, con los casos de cáncer de pulmón y con los diferentes subtipos de cáncer.
- 3- Valorar la viabilidad de los microorganismos detectados en los análisis de secuenciación masiva, mediante cultivo de las mismas muestras en medios para el desarrollo de microorganismos cultivables.
- 4- Estudiar la relación de lipofilia de las levaduras más representativas del microbioma respiratorio, con los lípidos del surfactante pulmonar.
- 5- Estudiar las poblaciones de macrófagos alveolares en muestras de LBA de los pacientes con cáncer de pulmón, analizando su relación con los distintos tipos de cáncer y perfiles de microbioma.





III. MATERIALES Y MÉTODOS



A. DISEÑO DEL ESTUDIO


Estudio observacional, prospectivo y multicéntrico.

B. POBLACIÓN A ESTUDIO Y PERÍODO ANALIZADO

Pacientes adultos a los que se les fuera a realizar una broncoscopia diagnóstica por sospecha de cáncer de pulmón u otra patología benigna no infecciosa, según la práctica clínica habitual y que no presentaran criterios de disbiosis. La recogida de muestras se ha realizado entre febrero de 2015 y noviembre de 2022, en varios hospitales de la provincia de Alicante: Hospital Universitario San Juan de Alicante, Hospital Universitario del Vinalopó, Hospital General Universitario Dr. Balmis y Hospital General Universitario de Elda.

C. CÁLCULO DEL TAMAÑO MUESTRAL

Calculamos que una muestra de 103 individuos sería suficiente para estimar, con una confianza del 95% y una precisión de ± 3 unidades porcentuales, diferencias en los perfiles de microbioma pulmonar, si las hubiera. El porcentaje de pérdidas previsto se estimó en torno al 10%.


$$n = \frac{Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2}$$

- N = Total de la población
- $Z_{\alpha}^2 = 1.96^2$ (seguridad del 95%)
- p = proporción esperada
- q = 1 - p
- d = precisión

Figura 6. Fórmula para el cálculo del tamaño muestral. Extraído de Althubaiti A (60).

D. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Los criterios de inclusión del presente estudio son:

- Pacientes adultos (edad \geq 18 años).
- Pacientes capaces de firmar el consentimiento.
- Deben cumplir la indicación de realizar una broncoscopia, según criterios de práctica clínica habitual.
- Estabilidad clínica en las últimas 4 semanas (sin sintomatología infecciosa, ni exacerbaciones que hayan requerido uso de antibioterapia).

Por otro lado, se consideraron como criterios de exclusión:

- Infección activa en tratamiento antibiótico.
- Estado de inmunodepresión por neutropenia ($<500/\text{mm}^3$ neutrófilos) durante más de 10 días en el último mes, tratamiento esteroideo prolongado (>20 mg/día durante >3 semanas ó >700 mg de prednisona en total en los últimos 2 meses), tratamiento inmunosupresor en los últimos 3 meses, trasplante de órgano sólido / hematopoyético realizado, neoplasia hematológica en el último año, tratamiento con quimioterapia en los últimos 6 meses, tratamiento crónico con macrólidos o antibióticos inhalados, hipogammaglobulinemia.
- Colonización crónica del aparato respiratorio por cualquier microorganismo.

E. VARIABLES

En una base de datos anonimizada, se han recogido diferentes datos demográficos, clínicos y de exposición de los pacientes incluidos en el estudio:

- a) Variable principal: composición del microbioma pulmonar de pacientes con cáncer, determinado mediante secuenciación de alto rendimiento.
- b) Otras variables microbiológicas e inmunológicas:
 - Diversidad del microbioma individual (α) y del microbioma del grupo en estudio (β).
 - Viabilidad de la microbiota valorada mediante cultivo *in vitro*.

- Distribución de las poblaciones de macrófagos alveolares (M1 y M2) en la vía respiratoria baja.
- c) Variables sociodemográficas (Hoja de datos de paciente. Anexo I)
- Género: cualitativa dicotómica (masculino/femenino)
 - Edad: cuantitativa discreta
 - Fecha de la prueba
 - Hábito tabáquico con exposición acumulada: cuantitativa discreta
 - Profesión: cualitativa nominal.
 - Indicación de la broncoscopia: cualitativa nominal
 - En caso de cáncer de pulmón, tipo de cáncer: cualitativa nominal y estadio tumoral (cualitativa nominal).
- d) Variables relacionadas con la broncoscopia: bronquio en que se realiza el LBA, cantidad instilada, cantidad recogida, cantidad procesada para el estudio...

No se han obtenido datos genéticos humanos de las muestras.

F. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

F.1. LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

Se ha llevado a cabo mediante la realización de una broncoscopia convencional, mediante sedación consciente de cada paciente, premedicando por vía intravenosa con midazolam y fentanilo a criterio del clínico que realice la técnica. Tras la sedación se utilizó lidocaína al 2% o spray al 4 o 10% como anestésico en la nariz y vía aérea superior. Se evitó siempre la aspiración en vía aérea superior. Estas muestras son consideradas altamente representativas de la vía aérea inferior humana. En los pacientes con cáncer de pulmón, el lavado se realizó en el bronquio más cercano a la lesión tumoral. El LBA en los casos que no había tumor broncogénico, se realizó preferiblemente en lóbulo medio, y si no era posible en llingula, siguiendo las guías para el diagnóstico mediante broncoscopia flexible en adultos (61). Se instilaron alícuotas de 50 mL de suero fisiológico estéril (entre 100-150 mL), descartándose la primera alícuota, y procesando la segunda para el estudio del microbioma, con un mínimo de material requerido de 20 mL. Las muestras se refrigeraron y se transportaron a 4°C antes de 24

horas desde la obtención de las mismas. Una alícuota de 8-10 mL se utilizó para procesado inmediato en la UMH y el resto se transportó al Biobanco del Hospital General Universitario Dr. Balmis. Una vez en Biobanco, se le adicionó N-acetil-cisteína (10%) y se repartió en alícuotas de 1,5 mL que se congelaron a -80°C hasta su procesado para extracción de ácidos nucleicos.

Se realizaron controles aleatorios de esterilidad del broncoscopio de todos los centros participantes, que consistió en la obtención de una muestra por lavado del equipo en el momento en que estaba listo para uso, tras esterilizarse. Se sometió a lavado por arrastre con 100 mL de solución salina fisiológica, recogiendo el líquido en un recipiente estéril convencional de recogida de muestras. Este material se etiquetó como una muestra más y se sometió al mismo tratamiento y análisis que las muestras obtenidas de pacientes.

Las muestras obtenidas de pacientes se etiquetaron con un código alfanumérico, para garantizar la anonimización de las mismas.

F.2. PROCESADO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO: CULTIVOS

De la alícuota de 8-10 mL de LBA recién extraída, se separaron 2-4 mL para cultivo y se sembraron por duplicado inoculando 100 µL en placas con Agar Modificado de Leeman y Notman (MLNA) para las especies de *Malassezia* (62) y Agar de Sabouraud con Dextrosa (SDA) para el resto de hongos. Los cultivos se incubaron a 37°C y a temperatura ambiente. Tras el desarrollo de colonias, se sometieron a observación microscópica y test de estudio del biotipo (perfiles bioquímicos y pruebas fisiológicas convencionales) y se extrajo DNA para estudio, identificación y tipado molecular mediante *DNA-barcoding*.

La muestra sobrante se mantuvo refrigerada para posteriores determinaciones o confirmación de resultados. Este material se empleó para cultivo en medios con diferente composición lipídica, para el estudio de levaduras lipofílicas.

Por otra parte, se valoró mediante cultivos la influencia de los lípidos pulmonares en el desarrollo de especies del género *Malassezia* y otros miembros del microbioma pulmonar. Las especies del género *Malassezia* no pueden aislarse en cultivos con

medios convencionales debido principalmente a su lipodependencia. Se utilizaron medios que contenían DPPC, surfactante pulmonar porcino y otros lípidos, y se comparó su crecimiento en estos medios con el del cultivo estándar: MLNA para las especies de *Malassezia* y SDA para las demás.

Se realizaron los experimentos de cultivo con 10 especies diferentes de levaduras que se detallan en la tabla 1), descritas previamente como componentes del tracto respiratorio inferior y cuyos aislamientos provienen de la colección de hongos de la UMH (CLA y CCA) y de la Colección del *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute*, en Utrecht, Países Bajos.

El número utilizado corresponde al código correspondiente de la cepa en la colección utilizado para identificar los aislamientos en los experimentos realizados. Colección de levaduras de Alicante (CLA), Colección de Criptococos de Alicante (CCA) y colección de CBS-KNAW.

Tabla 1. Cepas de levadura utilizadas, se muestra el código de identificación y el origen del aislamiento.

Abreviatura	ESPECIES	ID CÓDIGO	AISLAMIENTO
<i>N. g.</i>	<i>Candida glabrata (Nakaseomyces glabrata)*</i>	CLA44	Prótesis dental humana
<i>C. a.</i>	<i>Candida albicans</i>	CLA45	Cavidad oral humana
<i>C. p.</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	CLA46	Lavado broncoalveolar (LBA) humana
<i>M. g.</i>	<i>Candida guilliermondii (Meyerozyma guilliermondii)*</i>	CLA47	Lavado broncoalveolar (LBA) humana
<i>C. n.</i>	<i>Cryptococcus neoformans s.s.*</i>	CCA494	Líquido cefalorraquídeo humano
<i>C. dn.</i>	<i>Cryptococcus deneoformans*</i>	CCA420	Hemocultivo humano
<i>C. deu</i>	<i>Cryptococcus deuterogattii*</i>	CCA512	Líquido cefalorraquídeo humano
<i>M.r.(1,2)</i>	<i>Malassezia restricta**</i>	CBS7877	Colección CBS
<i>M. a.</i>	<i>Malassezia anuralokei</i>	CLA42	Canal auditivo humano
<i>M.p.</i>	<i>Malassezia pachydermatis</i>	CLA43	Canal auditivo canino

*Nombre de las especies según Hagen F, *et al* y Kidd SE, *et al* (63, 64).

**Se analizaron dos aislamientos de la misma cepa de *Malassezia restricta*.

Se ensayaron diez medios de cultivo, nueve de ellos con diferente contenido lipídico, incluido el MLNA. Se creó un nuevo medio (NM1) sustituyendo el monoestearato de glicerol (GME) por DPPC, y se diseñaron otros 7 medios más, consistentes en una base nutriente común (Medio Base más Glicerol) a la que se añadieron 7 lípidos diferentes por separado: GME, 4 componentes de Tween (T20, T40, T60 y T80), DPPC purificado (Sigma-Aldrich®) y extracto de surfactante porcino (Curosurf®, Laboratorios Chiesi). La tabla 2 muestra la composición detallada de estos medios de cultivo. El SDA se utilizó

también como medio de cultivo, como ya se ha mencionado, como medio estándar para levaduras no lipofílicas.

Tabla 2- Composición detallada de los medios de cultivo utilizados.

COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS										
Componentes	MLNA	NM1	Tw20	Tw40	Tw60	Tw80	GME	DPPC	SURF	SDA
Peptona	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr
Sales biliares	0.8 gr	0.8 gr	0.8 gr	0.8 gr	0.8 gr	0.8 gr	0.8 gr	0.8 gr	0.8 gr	
Glicerol	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	
Glucosa	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr
Extracto de levadura	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg
Aceite de oliva	2 mL	2 mL								
Monoestearato de glicerol	50 mg						50 mg			
Tween 20			1 mL							
Tween 40				1 mL						
Tween 60					500 µL					
Tween 80						500 µL				
DPPC		16,7 mg						16,7 mg		
Surfactante*									627 µL	
Agua destilada	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
Agar-agar	1,5 gr	1,5 gr	1,5 gr	1,5 gr	1,5 gr	1,5 gr	1,5 gr	1,5 gr	1,5 gr	1,5 gr

*Surfactante comercial (Curosurf). Concentración de surfactante en el vial 80mg/mL

Se realizaron los experimentos con 3 métodos diferentes de cultivo: en superficie de medio sólido, en profundidad de medio sólido y en medio líquido con placas multipocillo.

Cada placa de cultivo en medio sólido fue dividida por secciones numeradas. Se preparó un inóculo del orden de 10^6 células/mL de todas las cepas para los ensayos. Los cultivos en superficie inocularon con 5 µL. En los cultivos en profundidad, se realizó un orificio de 3-5 mm de profundidad con punta de pipeta estéril de 5 mm de diámetro para colocar cada inóculo, que fue de 50 µL. En todos los casos se pusieron las placas a incubar a 30°C y se realizó su lectura a las 24 horas, a los 5 días y cada 3 días hasta el día 28. En cuanto a la placa multipocillo, se prepararon los medios líquidos con los componentes descritos en la tabla 2, excluyendo el agar-agar de todos ellos. Cada medio de cultivo se dispuso por columna, rellenando cada pocillo con 150 µL del medio correspondiente. Cada cepa se inoculó añadiendo 50 µL en una fila. Se realizó su lectura a las 24 horas, cada 3 días y hasta el día 21 en la placa que contenía las levaduras del género *Malassezia*. La lectura de la placa multipocillo se facilitó añadiendo 2,5 µL de solución de azul alamar 5 µg/mL (Resazurina. Sigma-Aldrich®) a cada pocillo. El crecimiento aparecía indicado si se producía un cambio de color de azul a rosa (65).

F. 3. PROCESADO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO: EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y OBTENCIÓN DEL MICROBIOMA POR SECUENCIACIÓN DE ALTO RENDIMIENTO

Las muestras de LBA mantenidas en biobanco se sometieron a extracción de ácidos nucleicos, con un sistema comercial para extracción de sangre y tejidos (DNeasy Blood & Tissue. Qiagen®, Germany). La concentración de DNA fue medida con un sistema fluorométrico Qubit® (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) estableciendo una mínima cantidad de DNA de calidad de 0,5 ng/μL.

Tras la extracción, el procedimiento de obtención del microbioma se realizó mediante dos protocolos distintos.

La primera tanda de secuenciación de alto rendimiento se realizó con 45 muestras de LBA y 5 controles de lavado de broncoscopios, en los que se secuenció la región ITS2 tras una amplificación previa de la región ITS1-5.8S-ITS2 (9) (Figura 7). En la segunda parte del estudio, la secuenciación se realizó directamente sobre la región ITS2. En este caso se incluyeron 53 nuevas muestras de LBA y 29 de las previamente obtenidas conservadas en biobanco, además de 4 nuevos controles (total 86 muestras). De estas últimas hubo 4 con baja carga de DNA que no se pudieron secuenciar. Dicha secuenciación de alto rendimiento se realizó en una institución externa (FISABIO), contratando este servicio. Para el procesamiento de los datos se utilizó el programa QIIME2 (*Quantitative In-sights Into Microbial Ecology*) (66). Las secuencias se testaron para detectar quimeras con el comando *identify_chimeric_seqs.py* de la base de datos de UNITE (*User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza Database*) (<https://unite.ut.ee/community.php>) utilizando UCHIME (67). A continuación, un control negativo de PCR y otro de cada carrera de secuenciación se utilizaron para filtrar contaminantes. Las muestras se agruparon en diferentes Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs) fúngicas con una identidad del 99% y las OTUs presentes en los controles se eliminaron antes del análisis (68). Las secuencias limpias se agruparon en OTUs con un 97% de homología y se identificaron usando el comando *pick_open_reference_otus.py*. Debido a las amplias diferencias de tamaño de librerías entre las muestras, se enrasó la muestra a 6000 lecturas para los resultados del primer estudio, y 500 en el segundo con un comando *single_rarefaction.py* para comparación entre muestras (69).

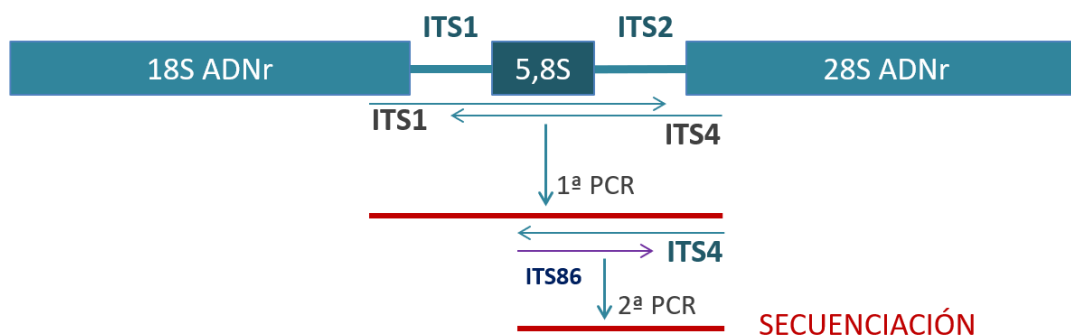


Figura 7. Esquema de la región del DNA que codifica para los genes ribosomales en hongos. Se marcan los espaciadores (ITS) y la amplificación de la región diana ITS2 en forma anidada, tras una previa amplificación de toda la región del ITS. Modificada de Palomares JC, *et al.* (9).

Tabla 3- Relación de cebadores usados para la amplificación de la región *barcoding* de hongos. Los cebadores ITS1^P e ITS4^P amplifican la región ITS1-5,8S-ITS2. Los cebadores ITS86^P e ITS4^P amplifican la región ITS2. Extraído de Ferrer C, *et al.* (70).

Cebador	Región hibridación	Secuencia	Fragmento
ITS1 ^P	18S RNA gen	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	500-850 pb
ITS4 ^P	28S RNA gen	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
ITS86 ^P	5,8S RNA gen	GTGAATCATCGAATCTTTGAAC	200-450 pb
ITS4 ^P	28S RNA gen	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

F. 4. PROCESADO DE MUESTRAS EN EL LABORATORIO: ESTUDIO INMUNOLÓGICO

Entre noviembre de 2021 y hasta octubre de 2022, las muestras de LBA obtenidas se procesaron para estudio de poblaciones de macrófagos. El procesado exigía el trabajo inmediato con la muestra recién extraída, lo que dificultó mucho su ejecución con un mayor número de pacientes. El procedimiento que se realizó fue el del laboratorio de Inmunología de la UMH y consistió en lo siguiente: una alícuota recién extraída de al menos 6 mL de cada LBA se centrifugó a 1500 revoluciones por minuto durante 5 minutos, desechamos el sobrenadante y resuspendimos todos los precipitados en un 1 mL de tampón con Suero Fetal Bovino (SFB) que contiene un marcador cuyo nombre

comercial es tampón de marcado. A continuación, volvimos a centrifugar a 1500 rpm (Microspeen 12, Biosan®) durante 5 minutos y resuspendimos el precipitado en 200 mL de SFB con 10 mL del anticuerpo CD16/CD32 (Molecular probes. Life technologies®. USA) para el bloqueo de los receptores de la fracción constante de las inmunoglobulinas y así evitar uniones inespecíficas de los subsiguientes anticuerpos. Homogeneizamos con el vórtex y al cabo de 10 minutos se añade 1 mL de SFB y centrifugamos a 1500 rpm durante 5 minutos. Finalmente, desechamos el sobrenadante y añadimos 200 µl de SFB con 5 µl de cada uno de los anticuerpos anti-receptores específicos para macrófagos M1 (αCD14-APC y αCD86-FITC), (Molecular probes. Life technologies®. USA), y M2 (αCD206-PE y αCD163-PE-Cy7), (Molecular probes. Life technologies®. USA) para diferenciar los macrófagos proinflamatorios (M1) de los antiinflamatorios (M2). Por último, desechamos el sobrenadante y al precipitado celular obtenido tras la centrifugación anterior le añadimos 100 µL de paraformaldehído al 2% para fijar la muestra. Dejamos esto en la nevera a 4°C, protegido de la luz, hasta la lectura de poblaciones en el citómetro de flujo FlowJo® (BD Bioscience®), preferiblemente en las primeras 24 horas desde el procesado de la muestra. Esta lectura se realizó en el Hospital General Universitario Dr. Balmis. La estadificación tumoral se llevó a cabo según la edición vigente, la 8.^a edición de la Clasificación TNM del cáncer de pulmón (47).

G. ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados obtenidos en la identificación de microorganismos del LBA mediante secuenciación se incluyeron en una base de datos tipo Excel. Se incorporaron los perfiles de microbioma de las muestras analizadas en la segunda tanda, más los de la primera que no pudieron repetirse por amplificación directa. Estos se ajustaron proporcionalmente a la carga microbiana con la que se hizo la rarefacción de la segunda muestra. En esa misma base de datos se contó con las variables clínicas contempladas, así como las demográficas. Para el análisis descriptivo; las variables cualitativas se expresaron en número absoluto y porcentaje, mientras que las cuantitativas se expresaron como media ± desviación estándar, siempre que siguiesen una distribución normal. La comparación de proporciones se realizó mediante la prueba de chi-cuadrado para frecuencias esperadas mayores de 5, y de medias independientes mediante la prueba t de Student, cuando la distribución era normal. La comparación de proporciones

se realizó mediante el test exacto de Fisher para frecuencias esperadas menores de 5, y de medias independientes mediante la U de Mann-Whitney cuando la distribución no seguía la normalidad. Para comparar las medias de más de 2 grupos se realizó análisis de la varianza (ANOVA) si la distribución era normal y se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis cuando la distribución no seguía la normalidad. Se sometieron los datos a análisis marginal y multivariante. Fundamentalmente se realizó ANOVA como sistema para contrastar la hipótesis y comparar poblaciones en cuanto a la diversidad del microbioma. Para la obtención de la diversidad individual de cada muestra o diversidad α , se valoró el número de secuencias diferentes y el índice de Shannon-Wiener y para la valoración de la diversidad intermuestras, se empleó el análisis de coordenadas principales (PCoA).

Para estudiar las diferencias entre el microbioma de pacientes con cáncer y sin cáncer, se realizó un nMDS (escalamiento multidimensional no métrico), seguido de un PERMANOVA donde el tipo de paciente (cáncer o control) fue considerado como factor fijo, sobre una matriz de disimilitud realizada con una distancia de Bray-Curtis. La homogeneidad multivariante de la dispersión de los grupos se comprobó con un análisis betadisper. Se emplearon los paquetes estadísticos SPSS 24 (SPSS, IBM Corp.) y R.

H. ASPECTOS ÉTICOS Y LEGALES

El proyecto ha sido aprobado por los diferentes comités de ética de los hospitales que participan en este proyecto multicéntrico, como son: Hospital Universitario San Juan de Alicante, Hospital Universitario del Vinalopó, Hospital General Universitario Dr. Balmis, Hospital General Universitario de Elda. También se ha aprobado por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández (Anexo II).

Las muestras de LBA se obtuvieron durante una broncoscopia realizada por indicación médica en las condiciones clínicas habituales. No se produjo ninguna complicación grave durante la toma de muestras.

Se han entregado consentimientos informados de información previa al paciente, consentimiento informado para análisis de lavado broncoalveolar, así como de donación de muestras biológicas al biobanco del Hospital General Universitario Dr. Balmis (Anexo III).

En todo momento el trabajo con muestras obtenidas de pacientes, se ha ajustado escrupulosamente a lo establecido en la ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica, sobre la participación de seres humanos y/o la utilización de sus tejidos o similares (BOE núm. 159. Miércoles 4 julio 2007) y en la declaración de Helsinki (Asociación Médica Mundial. Tokio 2004).







IV. RESULTADOS



A. SELECCIÓN DE PACIENTES

Se reclutaron 97 pacientes de los cuatro hospitales de la provincia de Alicante:

-Hospital Universitario San Juan de Alicante, n=35 (36,1%)

-Hospital Universitario del Vinalopó, n= 17 (17,5%)

-Hospital General Universitario Dr. Balmis, n= 18 (18,6%)

-Hospital General Universitario de Elda, n= 27 (27,8%)

Se excluyeron del global del estudio 2 pacientes, uno al ser diagnosticado de tuberculosis ganglionar mediastínica y otro al presentar infección respiratoria polimicrobiana detectada por cultivos. Se recogieron además 9 muestras de bronoscopios, de los diferentes centros participantes, correspondientes al lavado del dispositivo con solución salina estéril y se utilizaron como controles microbiológicos negativos.

Se excluyeron 21 muestras del estudio molecular (17 de pacientes y 4 controles de bronoscopia) por un contenido insuficiente de DNA para enviar a secuenciación masiva (<0,5 ng/ μ L). Se excluyeron 4 muestras del estudio de cultivos por contenido insuficiente, priorizándose la secuenciación.

En la figura 8 se muestra el diagrama de selección con el conjunto de los pacientes.

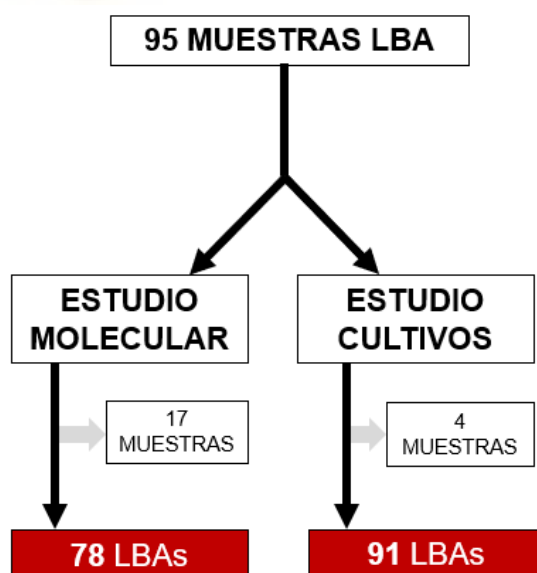


Figura 8. Diagrama de selección de pacientes.

B. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA MUESTRA

En la tabla 4 se detallan los resultados de aquellas variables que caracterizan nuestra muestra de población. La media de edad estuvo en torno a los 65 años, con un predominio masculino, siendo la mayoría de los pacientes incluidos fumadores activos. En el grupo de pacientes con cáncer la mayoría presentaron un estadio tumoral IV (n=26, 56,5%), compatible con un cáncer broncogénico avanzado. No existieron diferencias significativas en las variables sociodemográficas entre el grupo de pacientes con cáncer y sin cáncer. En el grupo de pacientes con cáncer la profesión más frecuente fue la construcción y trabajos administrativos, mientras que en los pacientes sin cáncer la profesión más frecuente fue la agricultura. Para mayor detalle de las características basales de los pacientes incluidos en el estudio se puede consultar la tabla Anexo IV.

Tabla 4. Características basales de los pacientes incluidos en el estudio.

	Pacientes con cáncer (n=46)	Pacientes sin cáncer (n=32)
Edad (años), media (DE)	65 ± 10	63 ± 11
Sexo		
·Hombres, n (%)	29 (63%)	15 (46,9%)
·Mujeres, n (%)	17 (37%)	17 (53,1%)
Tabaquismo, n (%)		
·Fumadores activos	26 (56,5%)	13 (40,6%)
·Exfumadores	11 (23,9%)	7 (21,9%)
·No fumadores	9 (19,6%)	12 (37,5%)

Respecto al grupo de pacientes con cáncer y su histología, entre el total de 46 pacientes lo más frecuente fue el adenocarcinoma de pulmón (n=20, 43,5%), posteriormente el CPCP (n=11, 23,9%), seguido del carcinoma epidermoide de pulmón (n=10, 21,7%), posteriormente las metástasis en pulmón (n=3, 6,5%) y por último carcinoma broncogénico sin poder precisar más detalles del subtipo por muestra insuficiente y éxitus de los pacientes (n=2, 4,3%). Esta distribución de las muestras de pacientes con cáncer por histología aparece representada en la figura 9.

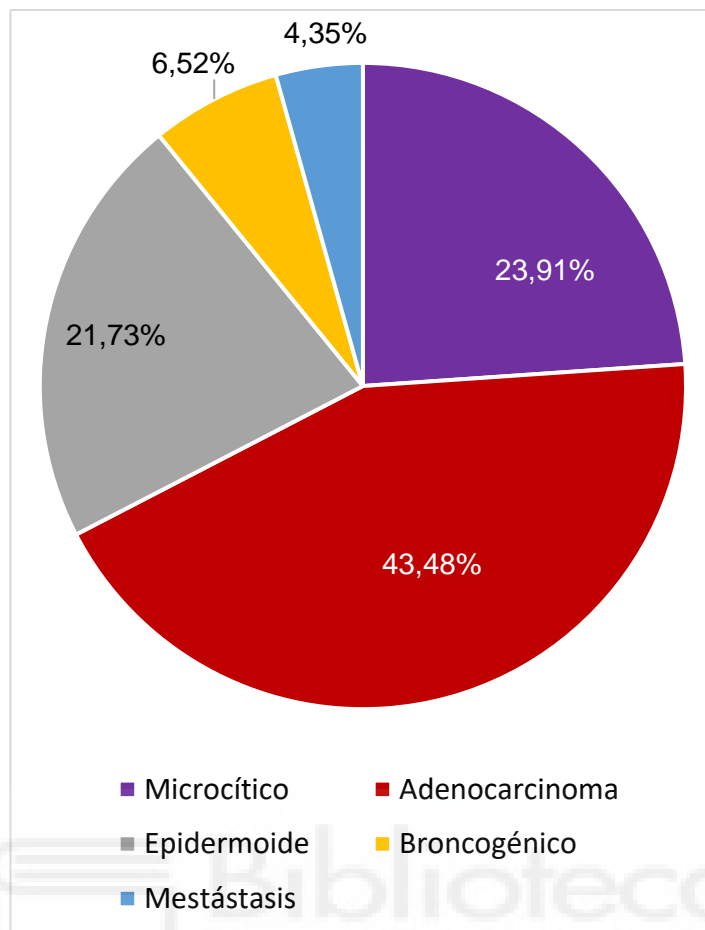


Figura 9. Distribución de las muestras de pacientes con cáncer según su histología.

Respecto al grupo de pacientes sin cáncer, el motivo más frecuente para la realización de la broncoscopia fue el padecer una enfermedad pulmonar intersticial difusa (EPID), (n=17, 53,1%) seguido de tos crónica (n=6, 18,7%), hemoptisis (n=3, 9,4%), nódulo pulmonar (n=3, 9,4%), estenosis traqueal (n=2, 6,2%) y por último, cuerpo extraño (n=1, 3,1%). Esta distribución de las muestras de pacientes sin cáncer aparece representada en la figura 10.

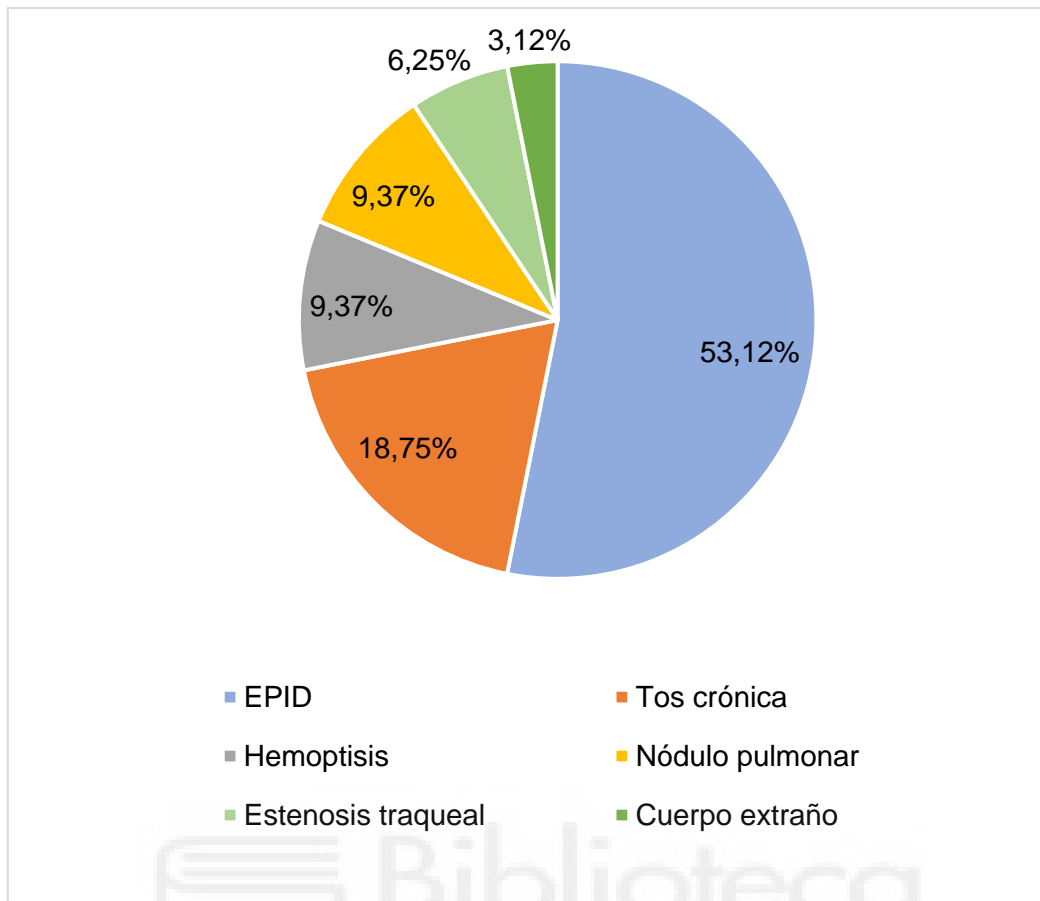


Figura 10. Distribución de las muestras de pacientes sin cáncer de pulmón según su diagnóstico.

C. ANÁLISIS DEL MICROBIOMA PULMONAR EN PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN

La distribución entre los dos colectivos de pacientes (cáncer/sin cáncer) fue de 46/32. Los dos métodos de análisis mediante secuenciación de alto rendimiento, con y sin amplificación previa de la secuencia diana, ofrecieron resultados similares en cuanto a microbioma nuclear, diversidad y perfil de microbioma, aunque varió significativamente la estimación de la riqueza y abundancia de algunas especies, ya que en el procedimiento sin amplificación previa se reducen los sesgos y contaminantes. En la figura 11 se comparan las especies más prevalentes detectadas en el LBA mediante los dos métodos de amplificación (anidada y directa). El porcentaje de muestras en las que se detectan *Malassezia restricta* y *Cladosporium* es muy similar, y son en ambos casos las especies más prevalentes.

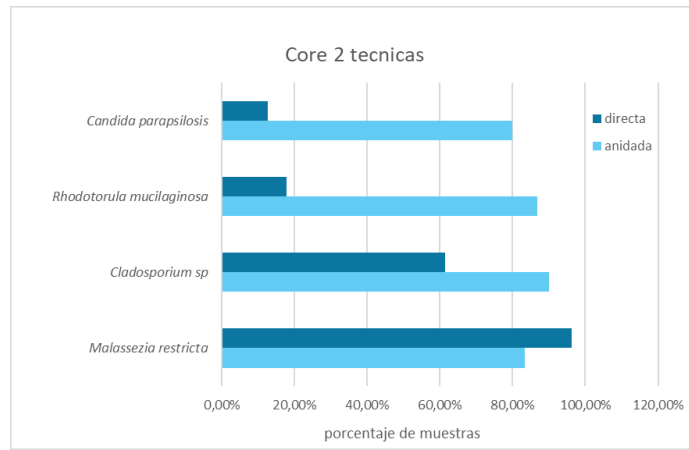


Figura 11. Comparación de 2 métodos HTS para mostrar la prevalencia de especies fúngicas.

Dentro de los resultados generales, nos gustaría destacar que las especies más frecuentemente halladas fueron: *Malassezia restricta*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Cladosporium sp*. Pero el núcleo o “core” del microbioma estuvo únicamente constituido por el género *Malassezia* que detectamos en el 97,4% (76) de las muestras, fundamentalmente debido a la presencia de *M. restricta*, presente en 75 de las 78 muestras (96,1%), (Figura 11).

Tras el tratamiento y el análisis bioinformático de los datos, se obtuvieron 188 especies o taxones, considerando una similitud igual o superior a un 97% con las secuencias de la base de datos UNITE. La diversidad individual (α -diversidad) calculada con el índice de Shannon-Wiener, fue significativamente mayor en los pacientes sin cáncer con una biodiversidad de $1,52 \pm 0,42 H'$ respecto a $1,17 \pm 0,46 H'$ encontrada en los pacientes con cáncer (ANOVA, $F_{1,76}=11,54$, p valor=0,01), resultados representados en la Figura 12.

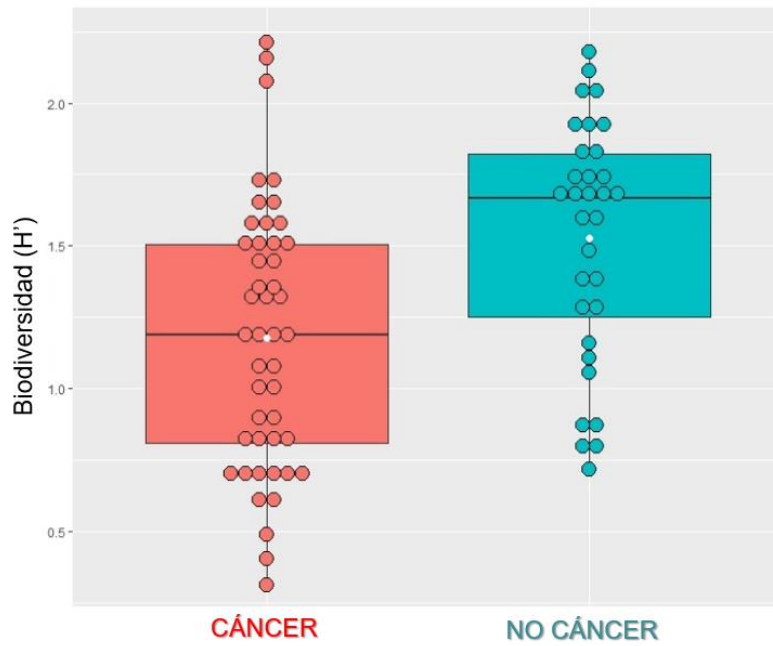


Figura 12. Representación de la α -diversidad en las muestras de LBA de los dos grupos de pacientes.

Por otro lado, se encontró una tendencia en los pacientes que padecían CPCP a presentar una mayor biodiversidad ($1,31 \pm 0,55$) respecto a los pacientes que padecían CPCNP ($1,16 \pm 0,42$, H'). A pesar de esta tendencia, las diferencias no fueron significativas (ANOVA, $F_{2,43}=1,41$, p valor= $0,255$) (Figura 13).

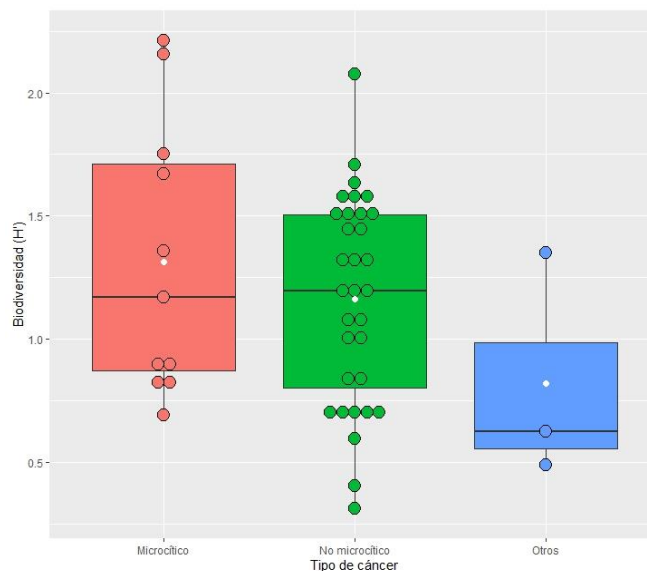


Figura 13. Representación de la α -diversidad en las muestras de LBA según los subtipos de cáncer.

En cuanto a la diversidad entre grupos (o beta-diversidad), las diferencias entre el microbioma de pacientes con cáncer y los pacientes sin cáncer, no mostraron diferencias significativas en el análisis PCoA (p valor = 0,494), como se puede apreciar en la Figura 14.

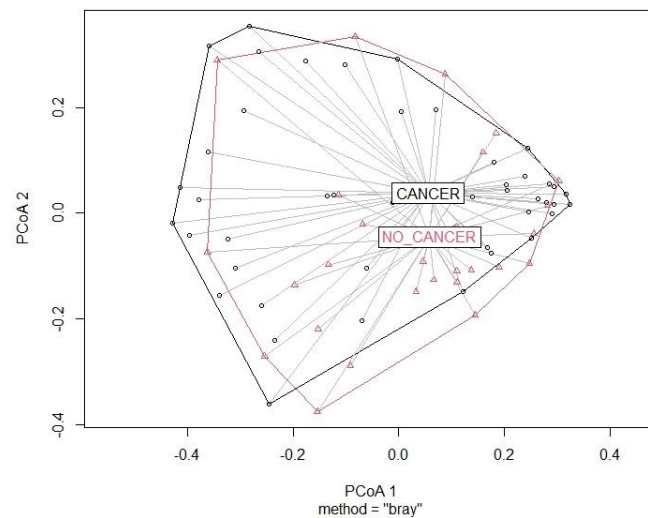


Figura 14. Análisis PCoA comparando diferencias en microbioma de pacientes con y sin cáncer.

En cuanto al perfil de microbioma por subtipo de cáncer de pulmón tampoco encontramos diferencias significativas (p valor = 0,417), sin embargo, se observa una tendencia en el cáncer microcítico a tener una distribución más agrupada, como se puede apreciar en la figura 15.

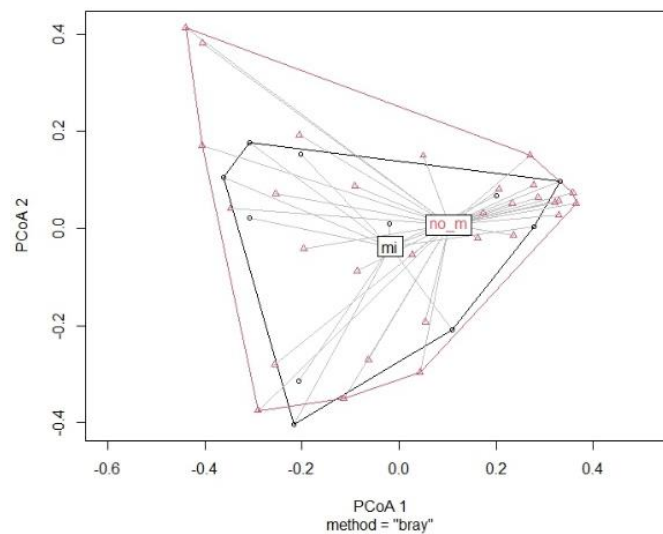


Figura 15. Análisis PCoA comparando diferencias en microbioma según los subtipos de cáncer de pulmón.

El estudio taxonómico global mostró una elevada presencia de *M. restricta* que, como ya se ha comentado, es la principal constituyente del núcleo del microbioma pulmonar. Además, se detectan otras especies de este género como *M. globosa*, *M. arunalokei* y *M. sympodialis*, pero con mucha menor riqueza. También aparecen en un alto porcentaje de muestras otras especies fúngicas, fundamentalmente de levaduras, como *Rhodotorula mucilaginosa*, *Naganishia spp*, *Candida parapsilosis*, así como el género filamentoso *Cladosporium*. Estos resultados son en gran medida coincidentes en las dos etapas del estudio como ya se ha comentado y se muestra en las figuras 11 y 16.

Existen 43 secuencias (OTUs) que no llegan a identificarse en UNITE y quedan únicamente como "Reino Fungi" y otras 10 que únicamente se identifican a nivel de filo como Ascomycota. Estas se han tratado de identificar en otra base de datos *National Library of Medicine* (NIH), encontrando cierta coincidencia en la identificación de algunas secuencias de baja o muy baja prevalencia, pero el 13,3% permanecen como secuencias no identificables.

En la figura 15 aparecen representados como un mapa de calor los resultados globales de la taxonomía del análisis de todas las muestras. La intensidad del color se corresponde con el número de secuencias que se identifican como una especie determinada en la base de datos UNITE, estableciendo un límite de similitud del 97% (escala logarítmica).

Además, se ordenan según la frecuencia de detección en las muestras. Se han representado solo las especies detectadas en al menos 8 muestras (>10%). Los resultados completos se encuentran en el anexo V.



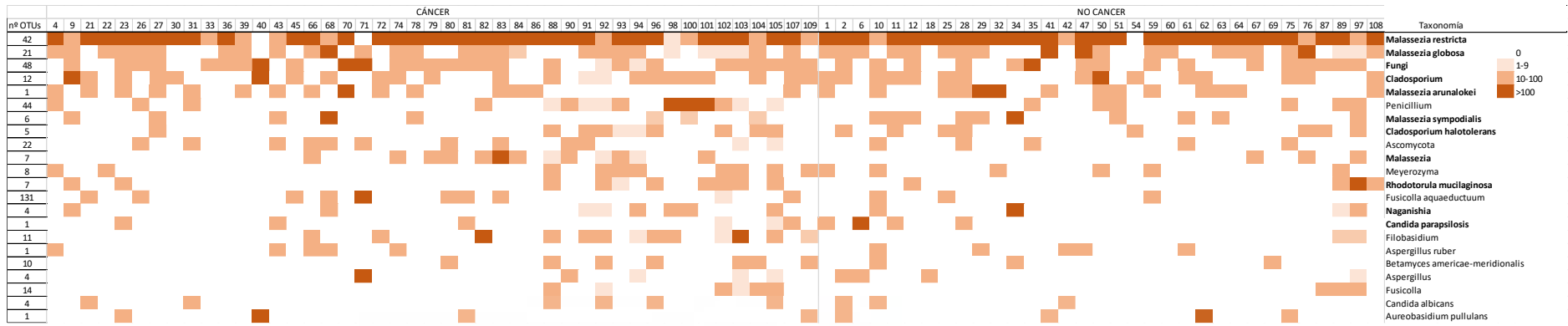


Figura 16. Distribución de especies fúngicas detectadas en LBA en ambos grupos de pacientes (cáncer/no cáncer). El código de colores está en relación con el número de secuencias detectadas en cada muestra para cada especie fúngica de la columna de la derecha. El orden de arriba-abajo está en relación a la prevalencia (porcentaje de presencia en las muestras de mayor a menor). Las especies resaltadas en negrita son las coincidentes como más prevalentes en ambos estudios (con PCR anidada y amplificación directa). Únicamente se representan las especies detectadas en al menos el 10% de las muestras.

D. ANÁLISIS DEL CULTUROMA Y RELACIÓN CON EL MICOBIOMA MOLECULAR

La viabilidad del microbioma detectado por secuenciación de alto rendimiento se evaluó mediante el cultivo de las muestras de LBA en medios adecuados para el desarrollo de hongos. Como se ha comentado en material y métodos, el empleo de medio para desarrollo de levaduras lipofílicas no se incluyó hasta más de la mitad del estudio, por lo que fue retrospectivo para las muestras de pacientes desde el número 1 al 64.

El crecimiento *in vitro* de elementos fúngicos a partir de las muestras de LBA fue en general escaso, siendo totalmente negativo en 21 (22,6%) de ellas (Tabla 5). De aquellas en las que se detectó crecimiento (67; 72,04%), la carga fúngica expresada como número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) desarrolladas por placa de medio de cultivo (UFC/100 μ L), presentó una media de 7 UFC/100 μ L, con una moda y una mediana de 1UFC/100 μ L (Tabla 4).

Tabla 5- Resultado del desarrollo *in vitro* de las muestras inoculadas en medios específicos para el desarrollo de hongos (Agar dextrosa de Sabouraud -SDA- y Medio modificado de Leeeming-Notman -MLNA). Valores de tendencia en los cultivos con crecimiento positivo.

MUESTRAS	Frecuencia	Porcentaje	UFC/100 μ L		
			Media	Moda	Mediana
SIN CRECIMIENTO	21	22,6			
CON CRECIMIENTO	67	72,04	7,04	1	1
Descartadas*	5	5,38			

*Descartadas del estudio después de procesados los cultivos

Comparamos carga fúngica detectada por cultivo (UFC/100 μ L) con la detectada por secuenciación masiva (número de secuencias) en cada muestra representando juntos estos valores (Figura 17).

Seq vs UFCs

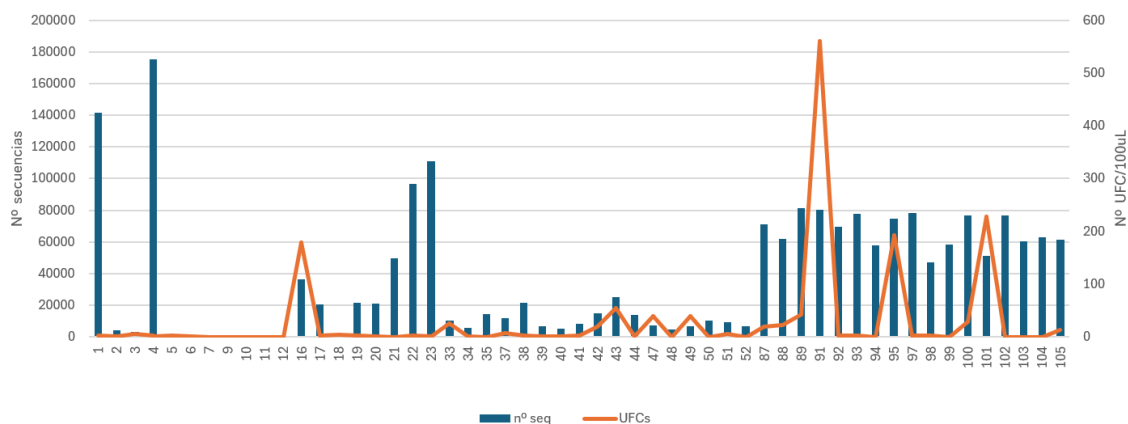


Figura 17. Representación del valor de carga fúngica estimado sobre la base del número de secuencias detectadas en la secuenciación de las muestras y el número de colonias desarrolladas en los cultivos in vitro.

Las colonias desarrolladas en cultivo se identificaron por métodos fenotípicos y por secuenciación. Se obtuvieron 145 aislamientos diferentes de los que el 86.21% correspondieron a levaduras con solo un 13.79% de hongos filamentosos (Tabla 6).

Tabla 6. Aislamientos obtenidos en el cultivo de las muestras de LBA. NO ID/ID: No identificados/ Identificados.

145 aislamientos	NO ID	ID	Frecuencia	Porcentaje
LEVADURAS	77	48	125	86,21%
HONGOS FILAMENTOSOS	8	12	20	13,79%
Frecuencia	85	60		
Porcentaje	58,60%	41,40%		

Se seleccionaron 60 (41.4%) aislamientos para identificación, entre las colonias más abundantes y prevalentes en las muestras, considerando las que fueron capaces de crecer en medios con lípidos. Un total de 48 aislamientos de levaduras y 12 de hongos filamentosos se han estudiado obteniendo las especies representadas en la tabla 7.

Tabla 7. Especies fúngicas detectadas por cultivo en las muestras de LBA e identificadas mediante métodos fenotípicos y moleculares. En las columnas de la derecha se representan los valores de frecuencia de detección de cada especie. HF: hongos filamentosos.

HF identificados	12	Levaduras identificadas	48
<i>Aspergillus sp</i>	3	<i>Candida parapsilosis</i>	15

<i>Penicillium sp</i>	3	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	9
<i>Cladosporium</i>	1	<i>Rhodotorula sp</i>	9
<i>Penicillium glabrum</i>	1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	3
<i>Penicillium polonicum</i>	1	<i>Naganishia diffluens</i>	4
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1	<i>Naganishia sp</i>	2
<i>Aureobasidium melanogenum</i>	1	<i>Candida sp</i>	1
<i>Trichoderma sp</i>	1	<i>Candida albicans</i>	1
		<i>Candida orthopsilosis</i>	1
		<i>Cryptococcus neoformans</i>	1
		<i>Cystobasidium sp</i>	1
		<i>Trichosporon jiroveci</i>	1

También comparamos los perfiles del microbioma encontrado mediante las dos técnicas analizando la coincidencia entre especies cultivadas y detectadas en secuenciación (Figura 18).

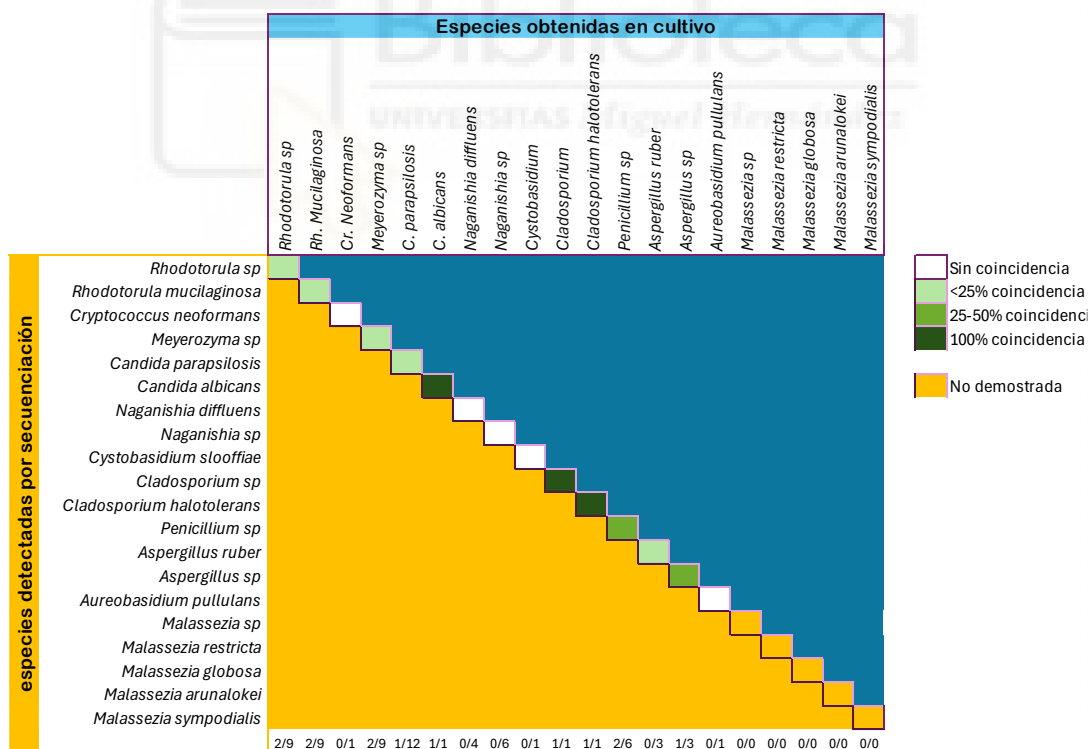


Figura 18. Coincidencia en la detección de especies fúngicas en las muestras de LBA mediante secuenciación (amarillo) y cultivo (azul). En la zona de intersección, los cuadros blancos representan especies detectadas por ambos métodos, pero no en las mismas muestras (sin coincidencia). Las coloreadas en verde se han cultivado de muestras en las que también se han detectado en secuenciación. La intensidad del color se relaciona con el

porcentaje de las muestras cultivadas que se detectan también por secuenciación (ver leyenda). Las especies de *Malassezia* no se puede descartar que fueran cultivables, aunque no se detectaron en las muestras estudiadas.

Estos resultados se encuentran pendientes de ser publicados como Original en la revista European Respiratory Journal.

E. LEVADURAS DEL MICROBIOMA PULMONAR EN LÍPIDOS DEL SURFACTANTE

En los medios sólidos enriquecidos con lípidos pulmonares (DPPC y surfactante), las especies de *Malassezia*, *C. deneoformans* y *C. parapsilosis* mostraron un mejor crecimiento que en el medio estándar. Otras especies mostraron un crecimiento escaso o no se desarrollaron en estos medios, como *C. albicans*, *N. glabrata*, *C. neoformans* y *C. deuterogattii*. *M. guilliermondii* y *C. deneoformans* no crecieron en DPPC, pero en medio con surfactante pulmonar mostraron respectivamente un crecimiento similar o mejor que en el estándar. Estos resultados aparecen representados en la figura 19.

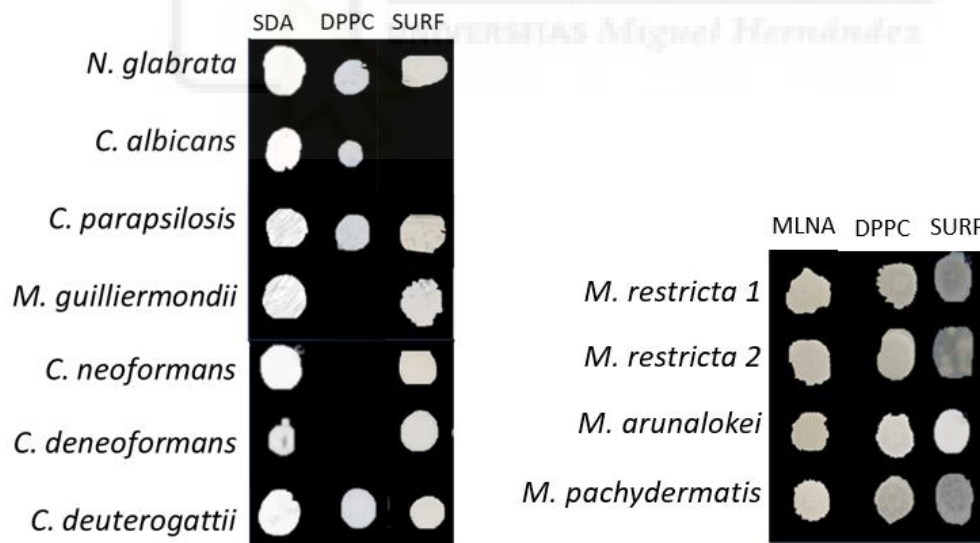


Figura 19. Crecimiento de todos los aislamientos ensayados en el medio estándar (SDA para especies no lipodependientes y MLNA para especies de *Malassezia*) y en los medios que contienen lípidos pulmonares (DPPC y Surfactante -SURF-).

El mejor desarrollo de las especies de *Malassezia* en medios con lípidos pulmonares también se comprobó en el medio NM1, en el que se cambió el GME del MLNA por DPPC, como se puede apreciar en la Figura 20.

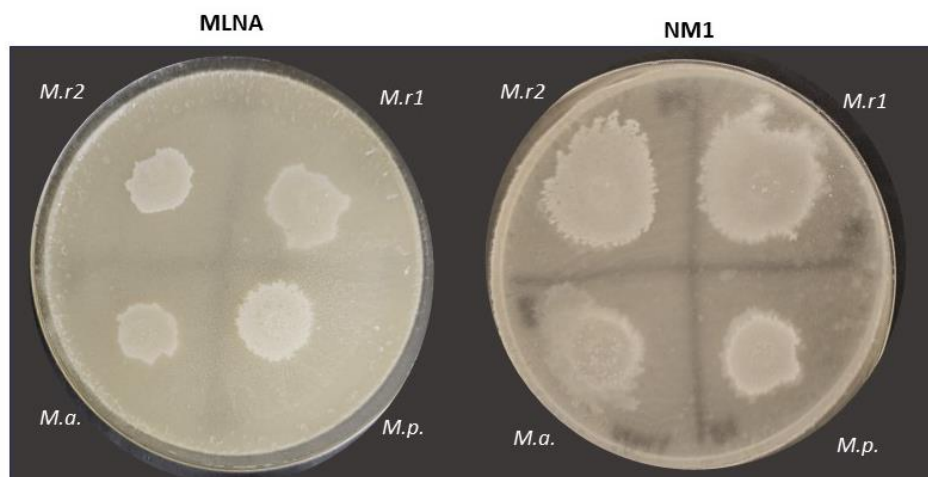


Figura 20. Crecimiento de las especies de *Malassezia* tras 21 días en los medios de cultivo MLNA y NM1. *M.r.*: *M. restricta*, *M.a.*: *M. arunalokei* y *M.p.*: *M. pachydermatis*.

En cuanto al ensayo en medio líquido en placas multipocillo, se apreció un crecimiento relativamente bueno de *C. parapsilosis* en todos los medios probados, mientras que *C. albicans* y *M. guilliermondii* tuvieron un crecimiento limitado especialmente en los lípidos pulmonares en comparación con SDB. En cuanto a las cepas de *Malassezia*, su crecimiento en medio líquido sólo pudo leerse en una de las réplicas y fue muy bueno para *M. restricta* en los dos medios con lípidos pulmonares, y en todos los medios con Tween para *M. pachydermatis*. Los experimentos realizados con los medios líquidos en las placas multipocillo arrojaron resultados no siempre reproducibles debido a la desecación del medio, especialmente cuando los periodos de incubación eran muy largos como en el caso de las placas con especies de *Malassezia*. Además, en algunos casos, tras una incubación prolongada, el color obtenido por la reducción de la resazurina no se encontraba en la escala normal (del azul-violeta al rosa claro), lo que hacía que la lectura fuera inexacta. Por lo tanto, hemos considerado únicamente los resultados que mantuvieron la reproducibilidad en los tres ensayos realizados.

En la figura 21 se muestran los resultados globales de los experimentos en medios con lípidos pulmonares, comparándolo con el desarrollo en los medios estándar (SDA y MLNA), representados con la línea con valor 0. Globalmente podemos decir que, sólo *C. deneoformans*

se desarrolló mejor sobre surfactante, al igual que *M. restricta* y *M. pachydermatis*. Las tres especies de *Malassezia* se desarrollaron bien sobre el DPPC (Figura 21).



Figura 21. Representación de la capacidad de crecimiento de las diferentes especies en medios de cultivo con lípidos pulmonares en comparación con su crecimiento respectivo en medios de cultivo estándar (SDA y MLNA).

Estos resultados se encuentran publicados como Original pre-print en la revista Mycopathologia (DOI: 10.21203/rs.3.rs-4187603/v1), (71).

F. ESTUDIO INMUNOLÓGICO DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES

Esta parte del estudio incluye 16 pacientes con cáncer de pulmón con una mediana de edad de 65 años y 4 pacientes con patología benigna no infecciosa (3 con EPID y 1 con estenosis traqueal) como grupo control, con una mediana de edad de 66 años. En el grupo de pacientes con cáncer de pulmón, el subtipo histológico más frecuente fue el adenocarcinoma (53,3%) y la mayoría de los casos se encontraron en estadio IV. Las principales características de los pacientes incluidos se pueden ver en la tabla 8. Para el análisis final, el paciente 10 fue excluido del estudio porque cambió su lugar de residencia y se perdió en el seguimiento.

Tabla 8. Características basales de los pacientes a los que se realizó el estudio inmunológico.

	Cáncer de pulmón (15)	Controles (4)	P valor
Edad (años), med (IQR)	65 (60-71)	66 (63-73)	0,802
Sexo masculino, n (%)	7 (46,7%)	2 (50%)	0,990
Hábito tabáquico, n (%)			0,798

-Fumadores			
-Ex-fumadores	7 (46,7%)	1 (25%)	
-Nunca fumadores	5 (33,3%)	2 (50%)	
	3 (20%)	1 (25%)	
Índice años-paquete, med (IQR)	35 (14-50)	30 (5-52)	0,960
M1 macrófagos, med (IQR)	0,09 (0,04-0,47)	0,63 (0,12-1,42)	0,802
M2 macrófagos, med (IQR)	1,61 (0,64-5,63)	0,32 (0,30-0,68)	0,009
Subtipo histológico de cáncer de pulmón		-	-
-CPCP	4 (26,7%)		
-Adenocarcinoma	8 (53,3%)		
-Carcinoma epidermoide	3 (20%)		
Tratamiento, n (%)		-	-
-Cirugía	1 (6,7%)		
-Inmunoterapia	9 (60%)		
-Quimioterapia	10 (66,7%)		
-Radioterapia	5 (33,3%)		
-Cuidados paliativos exclusivos	3 (20%)		
-Otros	1 (6,7%)		
	Osimertinib		
Supervivencia a los 6 meses, n (%)	9 (60%)	4 (100%)	0,255

Se observó un mayor porcentaje de población de macrófagos M2 en pacientes con cáncer de pulmón: 1,61 (0,64-5,63) en comparación con pacientes con enfermedad pulmonar benigna: 0,32 (0,30-0,68), p valor = 0,009. Cuando se realizó un subanálisis por tipo de cáncer de pulmón, se obtuvo una relación M2/M1 mucho mayor en los pacientes con adenocarcinoma: 36,11 (18,43-94,60), que en epidermoide: 10,89 y en el subtipo de células pequeñas: 2,41 (1,42-4,25), p valor = 0,005. Estos resultados se muestran en la Figura 22 y se deben a diferencias significativas en los macrófagos M1 entre los distintos tipos de cáncer de pulmón, mucho más abundantes en el carcinoma de células pequeñas 0,66 (0,27-4,40) y en el epidermoide 0,47 (0,21-0,47), respecto a adenocarcinoma 0,35 (0,11-0,72), p valor = 0,007. En la Figura 23 se muestran las lecturas de citometría de flujo correspondientes a dos pacientes y se puede apreciar como existen diferencias en los macrófagos alveolares según el subtipo de cáncer de pulmón.

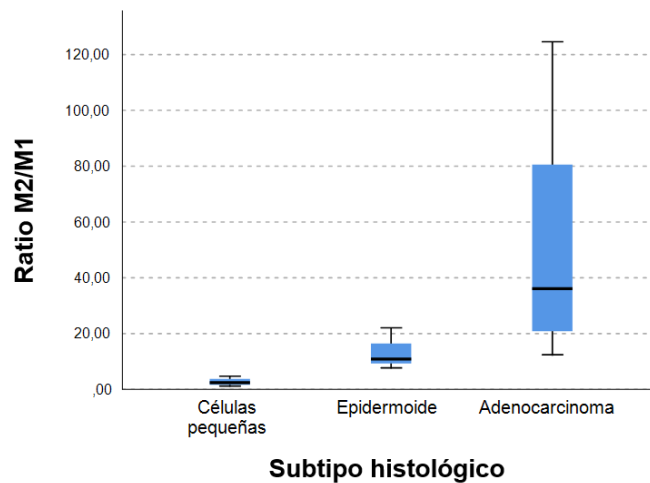
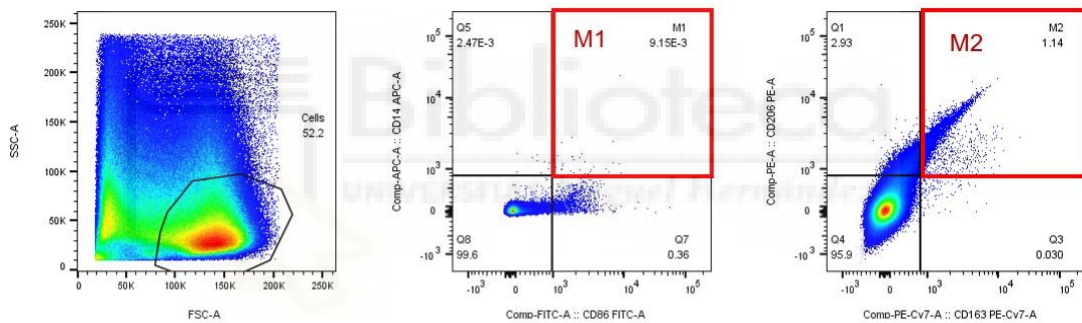


Figura 22. Ratio de macrófagos alveolares M2/M1 ratio según el diagnóstico definitivo histológico de cáncer de pulmón.

1. Paciente número 17, diagnóstico de CPCNP, adenocarcinoma.



2. Paciente número 18, diagnóstico de CPCP.

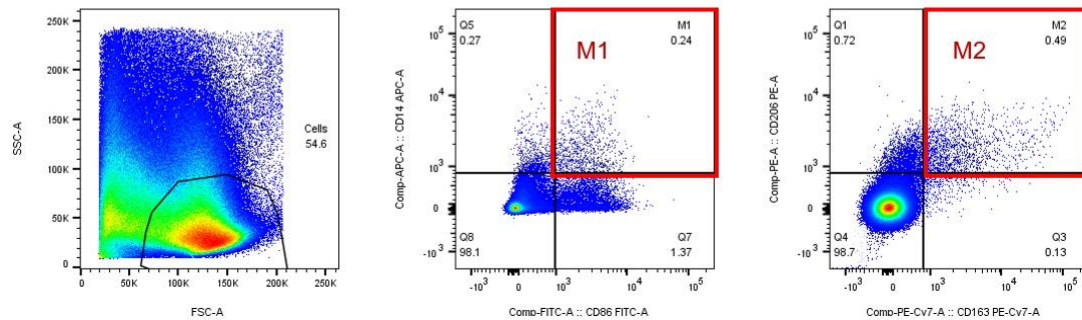


Figura 23. Poblaciones de macrófagos alveolares estudiadas mediante citometría de flujo. SSC: side scatter channel, FSC: forward scatter channel.

Estos resultados se encuentran publicados como Carta científica en la revista Archivos de bronconeumología (DOI: 10.21203/rs.3.rs-4187603/v1), (72).



Biblioteca
UNIVERSIDAD DE

V. DISCUSIÓN



A. CARÁCTERÍSTICAS DE LA COHORTE

Nuestra cohorte se compone, en el grupo de cáncer de pulmón, principalmente de pacientes en torno a los 65 años, con un predominio masculino, siendo la mayoría de ellos fumadores activos con una carga alta de tabaquismo acumulada. La mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón se encuentran en estadio tumoral IV. Es una población similar a la de otros estudios publicados sobre cáncer de pulmón, ya que afecta predominantemente a pacientes con edad entre los 60-79 años, con una alta mortalidad, porque hasta el 70% de los casos se diagnostica en estadios avanzados cuando ya existen metástasis (47). También es conocido que el 80% de los casos de cáncer de pulmón están asociados a la exposición al tabaco.

Respecto al grupo de pacientes sin cáncer, también llamados controles, vemos que no se trata de individuos completamente sanos (sería éticamente incorrecto someter a un sujeto sano a una prueba invasiva), la mayoría padecen una EPID, pero aparecen también otras dolencias menos frecuentes: tos crónica, hemoptisis, nódulo pulmonar, estenosis traqueal y cuerpo extraño.

No llegamos al tamaño muestral inicial calculado, ya que tuvimos que eliminar 2 pacientes (tuberculosis ganglionar mediastínica e infección respiratoria polimicrobiana detectada por cultivos), además de tener que excluir 17 muestras de pacientes del estudio molecular por un contenido insuficiente de DNA para enviar a secuenciación masiva.

B. COMPOSICIÓN DEL MICOBIOMA PULMONAR

Un importante hallazgo del estudio es que *Malassezia restricta* es el hongo más prevalente en la vía respiratoria inferior tanto de pacientes con cáncer, como con otras patologías de base (controles). Su elevada presencia en la vía aérea inferior y su capacidad para utilizar los lípidos pulmonares en su desarrollo nos lleva a plantear en esta tesis que la vía respiratoria inferior humana sea el nicho ecológico de esta levadura lipofílica y lipodependiente (71). Otras especies del género tienen nichos ecológicos definidos en relación a la secreción lipídica presente en órganos o tejidos concretos como la piel humana y de otros mamíferos (*M. furfur*, *M. globosa* y otras) o la de animales como los cánidos y gatos (*M. pachydermatis*) y otras más específicas como *M. cuniculi* en la piel del conejo (42, 73).

En cuanto a la estimación de la riqueza y diversidad del microbioma, en general las muestras estudiadas tienen una baja riqueza microbiana, lo que no sorprende al venir de una localización tradicionalmente considerada estéril. De hecho, la baja carga traducida en baja concentración de DNA en las muestras nos llevó a la eliminación de un buen número de pacientes reclutados para el estudio, como se ha comentado en el apartado de resultados. A esta escasa carga hay que añadir que dentro del microbioma, está descrito que la biota bacteriana es más abundante que la fúngica en esta y otras localizaciones del cuerpo humano.

Respecto al objetivo principal del estudio, los perfiles de microbioma detectados en pacientes con y sin cáncer no mostraron diferencias significativas, como tampoco se encontraron hongos o levaduras que fueran claramente más o menos prevalentes en los diferentes tipos de cáncer, aunque hay una tendencia a mayor presencia de especies de *Malassezia* (consideradas en conjunto) en el grupo de cáncer, al que corresponden el 58% de las secuencias de *Malassezia* spp detectadas, frente al 42% de los pacientes sin cáncer. No obstante, si encontramos diferencias en la α -diversidad que fue significativamente mayor en los pacientes sin cáncer que en los pacientes con cáncer. Esto refleja de nuevo diferencias en la actividad del sistema inmune, que inciden en el control del microbioma. Esta disminución en la diversidad es característico que acompañe a fenómenos inflamatorios pulmonares como la EPOC, la fibrosis quística o el asma, cuando no cursan con infecciones bacterianas frecuentes (74-77). Aunque es difícil comparar resultados sobre microbioma respiratorio entre distintos trabajos, por la diversidad de muestras y métodos empleados, podemos mencionar la publicación de Delhaes L y colaboradores (76), que incluyeron 8 pacientes con fibrosis quística en fase estable a los que se recoge una muestra de esputo a tiempo cero y otra cuando transcurre un año. En la secuenciación de la región ITS2 hallaron que la diversidad y riqueza de las especies fúngicas fue significativamente menor en los pacientes con función pulmonar disminuida y mal estado clínico, con un menor índice de masa corporal.

En cuanto a la composición del microbioma, la presencia de *Malassezia* en la vía respiratoria es muy frecuente en los estudios de microbioma pulmonar en pacientes con diversos procesos patológicos, pero a diferencia de nuestro estudio, en algunos de estos se resalta la predominancia de ciertas especies en las muestras de pacientes con una situación inflamatoria exacerbada. En el estudio realizado por Martinsen EMH y colaboradores (74) se comparó la composición del microbioma oral y pulmonar en pacientes con y sin EPOC. Se analizaron muestras de lavado oral y LBA en 93 pacientes con EPOC y 100 controles. Se utilizó como diana molecular la región ITS1. Los autores encontraron que el microbioma pulmonar y oral estuvo dominado, tanto en los pacientes EPOC como en los controles, por *Candida* spp,

Malassezia spp y *Sarocladium spp*. Hallaron que no existían diferencias en términos de distribución o abundancia entre ambos grupos, si bien es cierto que el grupo control no está bien definido en este estudio. En los estudios realizados en pacientes con fibrosis quística, la mayoría han trabajado muestras de esputo con un tamaño muestral discreto. En el estudio de Soret P y colaboradores (75), se incluyen 17 pacientes exacerbadores y 16 no exacerbadores, utilizando como diana molecular la región ITS2. Ellos encontraron en los pacientes exacerbadores mayor cantidad de *Aspergillus fumigatus* y *Malassezia spp*, así como menor proporción de *Cladosporium*. Por otra parte, encontraron una asociación entre la presencia de *Scedosporium* y la pérdida de función pulmonar. De nuevo en la mencionada publicación de Delhaes L (76), en el esputo de 8 pacientes con fibrosis quística encontraron una alta proporción de *Candida albicans* en asociación con *Pseudomonas aeruginosa*, lo que sugiere que puedan compartir vías de señalización de forma bidireccional y que el crecimiento de ambas se ve favorecido por la reducción de la tensión de oxígeno. También encontraron *Malassezia restricta* en todos los pacientes, mientras que *Malassezia globosa* y *Malassezia sympodialis* únicamente fue hallada en un paciente. En cuanto al asma bronquial, en el estudio realizado por Van Woerden HC y colaboradores (77) incluyeron 30 pacientes con asma y 13 controles, trabajando con muestras de esputo inducido. Encontraron como especies más frecuentes en los pacientes con asma: *Psatyrella condolleana*, *Malassezia pachydermatis*, *Termitomyces clypeatus* y *Grifola sordulenta*. Es interesante resaltar que *Malassezia pachydermatis* es frecuente que se aíse en pacientes con dermatitis atópica, entidad con frecuencia vinculada al asma (77).

En cuanto al perfil de microbioma en pacientes con cáncer de pulmón, hemos encontrado que nuestros resultados coinciden con el de otros trabajos publicados en los que se han estudiado muestras de biopsias bronquiales, LBA e incluso muestras de vía aérea superior.

Los estudios existentes en este campo son escasos (36-39), y como se ha comentado, utilizan muestras de distintas zonas del árbol respiratorio y diferentes dianas genómicas, lo que dificulta la comparación de resultados. En el trabajo realizado por Zhao Y y colaboradores con 38 muestras de LBA y 28 de tejido tumoral bronquial, utilizando como diana molecular 18S rRNA encuentran que en los pacientes con CPCNP *Alternaria arborescens* es el hongo más prevalente, seguido de cerca por *Malassezia restricta* y *Meyerozyma guilliermondii* (36). Sin embargo, es cierto que las esporas de *Alternaria* miden más de 5 µm, por lo que se depositarían en vía aérea superior, además de que se trata de un hongo esencialmente fitopatógeno y solo anecdóticamente vinculado con enfermedad humana, por lo que pensamos que su detección no tiene ningún papel relevante. Otro estudio reciente realizado por Dohlman AB y

colaboradores, analizando 100 muestras de tejido pulmonar muestra que los pacientes con cáncer de pulmón tienen mayor abundancia de *Blastomyces dermatitidis* (37). Sin embargo, los autores reconocen que la cohorte es étnica y geográficamente diversa y que no pueden determinar causalidad. Mientras que Liu NN y colaboradores encuentran que *Aspergillus sydowii* favorece la progresión tumoral en 52 roedores con adenocarcinoma pulmonar (38), induciendo la expansión de células mieloides supresoras y su activación de secreción de la interleucina (IL) -1b a través de una vía patogénica concreta, favoreciendo la progresión tumoral mediante un ambiente de inmunosupresión. En nuestros resultados no encontramos a penas *Aspergillus*, pero esto puede deberse al método, ya que la amplificación del ITS no es una herramienta muy eficiente en la detección de estos hongos a nivel de especie. Por otro lado, el grupo de Xu X y colaboradores publicaron recientemente un estudio (39) realizado con muestras de esputo de 65 pacientes con diferentes enfermedades: 20 con EPID, 14 con neumonía bacteriana, 11 con neumonía fúngica, 8 con asma, 12 pacientes con cáncer de pulmón y 10 controles sanos, encontrando que el género más abundante fue *Malassezia* tanto en el grupo de enfermedades pulmonares, como en los controles (36). Estos autores utilizaron como diana molecular la región ITS2. En los pacientes con cáncer de pulmón encontraron que la alfa diversidad medida mediante el índice de Shannon fue más baja y encontraron diferencias en beta diversidad entre el grupo de cáncer de pulmón y el grupo control. *Malassezia* fue el género más frecuente, con especies como *M. restricta*, *M. globosa* y *M. slooffiae* apareciendo en 70.8% de los pacientes con cáncer de pulmón, mientras que solamente la detectaron en el 23.5% de los controles sanos. En cambio, el género *Candida* fue más frecuente en los controles (13.9%) con especies como *C. glabrata* y *C. railenensis*, aislándose, sin embargo, solamente en el 2.2% de los pacientes con cáncer de pulmón. Estos resultados, a pesar de estar realizados en una muestra como el esputo, tienen importantes similitudes con los nuestros, aunque en nuestro caso no hemos podido demostrar diferencias significativas en la presencia de *Malassezia* en los pacientes con cáncer respecto de los controles. No obstante, hay que tener en cuenta que nuestros controles no son individuos sanos. La baja presencia de *Candida* en nuestros resultados se explica fácilmente por el tipo de muestra ya que estas especies son muy prevalentes en la vía aérea superior y cavidad oral, excepto *C. parapsilosis* que en nuestros resultados se detecta con frecuencia en las muestras de LBA.

En el estudio realizado por Bello S y colaboradores (78) en el que se analiza bacterioma y microbioma de pacientes con cáncer de pulmón de localización central, analizan muestras de biopsias bronquiales y saliva. Para el estudio del microbioma analizan 6 casos y 16 controles (9 estenosis traqueales benignas, 3 hemoptisis, 2 tos crónica, 1 control tras resección de hamartoma endobronquial y 1 disnea a estudio), excluyendo pacientes con infección activa e

inmunodeprimidos. Los autores encuentran que los pacientes con cáncer de pulmón tienen de manera estadísticamente significativa mayor proporción del género *Malassezia*, mientras que los controles tenían más *Candida* y *Saccharomyces*. Los autores no encuentran diferencias en la composición del microbioma en función del tipo histológico de cáncer de pulmón, cuando analizan los 25 pacientes en los que estudian el bacterioma. Vemos que muchos de estos resultados se asemejan a los nuestros ya que también *Malassezia* es el género más frecuente en nuestra cohorte.

En todos los estudios realizados con muestras de esputo los autores no pueden descartar que las muestras se hayan podido contaminar con esporas del aire y que la extrapolación de resultados de vía aérea superior a inferior, puede incurrir en ciertos errores como que las especies de *Candida*, especialmente *C. albicans* y *C. glabrata* (actualmente *Nakaseomyces glabrata*), son muy predominantes en vía aérea superior. Por otra parte, en los estudios en los que se realiza secuenciación masiva pueden existir sesgos de selección en función de los cebadores que se utilicen. La mayoría de los autores coinciden en que, además, puede existir una interacción dinámica entre hongos y bacterias en el microbioma pulmonar y para ahondar en profundidad acerca de esto serían necesarios análisis de metatranscriptómica, cultivos celulares (*in vitro*) o modelos animales (*in vivo*). Por ejemplo, se sabe que *Malassezia* produce lipasas que pueden ayudar a reciclar los lípidos producidos por bacterias fermentadoras (75).

Lo más importante de nuestros resultados es destacar que en el cáncer de pulmón a penas se modifica el perfil de microbioma, como sí sucede en otras patologías, sino que disminuye su diversidad manteniendo la composición fundamental. Afirmamos, como otros autores, la predominancia de *Malassezia* en la vía aérea inferior, pero en nuestro estudio no encontramos diferencia significativa en la presencia de este género entre los pacientes con cáncer y el grupo control. Aunque es posible que en individuos totalmente sanos esta situación pueda ser significativa como apuntan los trabajos realizados con muestras de esputo. En lo que parece haber coincidencia total es en la falta de diferencias significativas en el microbioma entre los distintos tipos de cáncer.

C. CORRELACIÓN ENTRE EL CULTUROMA Y EL MICOBIOMA MOLECULAR

El cultivo de las muestras de LBA permitió el crecimiento de las especies más frecuentemente detectadas mediante métodos moleculares. Esto indica que los hallazgos de secuenciación corresponden con elementos viables de la microbiota fúngica de la vía respiratoria.

Por otra parte, la baja tasa de crecimiento, con un 22,6% de las muestras negativas en cultivo, también confirma que el micobioma de la vía respiratoria inferior es relativamente escaso. Esto concuerda con las medidas de concentración de DNA de las muestras y el número de secuencias del ITS detectadas tras amplificación. En cuanto a la identificación de especies desarrolladas en los medios de cultivo, en muchas especies de levaduras y hongos filamentosos coinciden con las detectadas como más prevalentes en el estudio molecular (*Cladosporium*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa* y otras). No obstante, no hemos conseguido cultivar *Malassezia restricta* de ninguna de las muestras a pesar de que utilizamos medios específicos para su desarrollo a partir de la muestra 64, cuando disponíamos de resultados previos que declaraban la alta prevalencia de esta especie. Si bien es cierto que esta especie en concreto de *Malassezia* crece mejor *in vitro* a temperaturas moderadas (32°C) y su desarrollo puede tardar hasta más de 20 días de incubación, por lo que es complicado detectarla en cultivo. En este sentido, coincidimos con los escasos trabajos que también han realizado cultivos para confirmar la viabilidad del micobioma, como el ya mencionado por Delhaes L y colaboradores (76), que estudiaron el esputo de pacientes con fibrosis quística. Estos autores realizaron cultivos y secuenciación de las muestras utilizando como diana molecular la región ITS2 y encontraron que más del 60% de las especies detectadas por secuenciación no pudieron detectarse por cultivo.

D. AFINIDAD DE MALASSEZIA Y OTRAS LEVADURAS POR LOS LÍPIDOS PULMONARES

El hallazgo más importante de esta parte de nuestro trabajo es la demostración de la capacidad de crecimiento sobre lípidos pulmonares de especies de levaduras descritas como miembros importantes de la vía inferior, como *Malassezia restricta* y otras especies de este género, además de *Candida parapsilosis* y otras.

Las especies del género *Malassezia* suelen encontrarse como comensales en la microbiota cutánea de los mamíferos (41, 79). *Malassezia furfur*, *M. restricta*, *M. globosa*, *M. pachydermatis* y *M. sympodialis* destacan por su presencia en humanos. *M. pachydermatis* suele estar presente en animales y es transitoria en humanos (42). El genoma de este género de levaduras presenta una pérdida de genes que codifican el complejo de la sintasa de ácidos grasos, mientras que tienen un aumento de genes relacionados con la degradación de lípidos y el metabolismo de los carbohidratos (80, 81). Esta reorganización genómica les impide sintetizar sus propios lípidos, limitándoles a depender de fuentes externas. *Malassezia pachydermatis*, que es la única especie que no se considera lipodependiente ya que puede desarrollarse utilizando la pequeña porción lipídica de la peptona de los medios de cultivo convencionales como el agar de Sabouraud (42). Por ello, su presencia en distintas localizaciones del organismo humano y animal está siempre relacionada con abundantes fuentes de lípidos (secreción sebácea en la piel y cerumen en el conducto auditivo externo especialmente).

La presencia de *M. restricta* se ha relacionado recientemente con el desarrollo de carcinomas del aparato digestivo, con especial mención del cáncer de páncreas (33). Este hongo también parece estar implicado en el desarrollo del carcinoma del cuello uterino, y se ha relacionado con la carcinogénesis cutánea (34, 35). Nuestros resultados no permiten establecer una relación clara entre la presencia de esta especie y el desarrollo de cáncer, aunque tampoco lo descartan.

En cuanto a las especies de *Candida (spp)* son, con diferencia, los hongos patógenos más comunes en humanos, también son colonizadores conocidos de la piel, el tracto gastrointestinal, la cavidad oral, las vías respiratorias superiores y el tracto genitourinario de las mujeres (82). Si las fuentes de carbohidratos son limitadas, las especies de *Candida* pueden utilizar aminoácidos y lípidos para su adaptación metabólica (83). En los últimos años, un número considerable de estudios han puesto de relieve la contribución de los lípidos a la patogenicidad fúngica y a otros mecanismos de virulencia, como la resistencia a los fármacos, la formación de biopelículas y la liberación de vesículas extracelulares (83).

En nuestro estudio obtuvimos que *Candida parapsilosis* crece igual o mejor en medios con lípidos que en SDA. Esta levadura se ha descrito como parte del microbioma nuclear de muestras de LBA (40). Por el contrario, especies como *Candida albicans*, *Meyerozyma guilliermondii* y *Nakaseomyces glabrata*, que son miembros importantes de la microbiota oral, mostraron menos capacidad para desarrollarse en los lípidos pulmonares, en los que algunas de ellas mostraron siempre un crecimiento escaso o ausente. Es importante señalar que estas

levaduras no se consideran como miembros permanentes del microbioma pulmonar y se han detectado ocasionalmente en el tracto respiratorio inferior (40, 74, 84, 85).

Otro género de interés como patógeno humano, cuya vía de entrada es el pulmón, es *Cryptococcus*. En nuestro estudio, las especies del género *Cryptococcus*, en general mostraron un escaso desarrollo sobre lípidos en comparación con su crecimiento sobre SDA. No obstante, *C. deneoformans* mostró cierta capacidad para desarrollarse en surfactante, así como *C. deuterogattii*, que creció en lípidos pulmonares en experimentos realizados mediante inoculación en profundidad. Desde 2015, los análisis filogenéticos, combinados con una heterogeneidad reconocida con respecto a la virulencia, la preferencia del huésped y la susceptibilidad antifúngica proporcionan evidencia para apoyar clasificación taxonómica en 7 especies incluidas en los complejos de especies *C. neoformans* y *C. gattii*. *C. neoformans sensu stricto* y *C. deneoformans* en el primero, y *C. gattii sensu stricto*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii*, *C. bacillisporus* y *C. decagattii*, en el segundo (57). Los miembros del complejo de especies *C. gattii* parecen ser más propensos a permanecer en los pulmones de pacientes inmunocompetentes, mientras que el complejo de especies *C. neoformans* está menos relacionado con problemas respiratorios, pero es un importante invasor del sistema nervioso central y produce patología con mayor frecuencia en hospedadores inmunodeprimidos (86). Aunque *C. neoformans* se ha descrito como miembro del microbioma pulmonar en varios trabajos, no es posible saber qué miembros específicos del complejo de especies de *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* están relacionados con estos hallazgos. Los estudios del microbioma se realizan principalmente por la secuencia de la región ITS fúngica que no permiten diferenciar entre los miembros de estos complejos de especies. Por lo tanto, cuando los estudios del microbioma reportan la presencia de *C. neoformans*, quiere decir que corresponde a uno de los miembros de estos dos complejos.

En un estudio reciente realizado por Rossi SA y colaboradores, en un modelo *in vitro* de organoide pulmonar 2D (*minilung*), demuestran que *C. neoformans* s.s. induce la secreción de surfactante por los neumocitos y lo "utiliza" como una forma de opsonización que permite a la levadura penetrar en las células (18). Este comportamiento estaría mejor relacionado con la lipotolerancia de estas levaduras por el surfactante que a la capacidad de utilizarlo como nutriente, lo que concuerda con los resultados que hemos obtenido en los ensayos de crecimiento *in vitro* con lípidos pulmonares.

Sería necesario continuar investigando para averiguar si el diferente comportamiento detectado en nuestros experimentos con lípidos para las diferentes especies del género *Cryptococcus* guarda alguna relación con la patogenicidad de estas levaduras.

La mayoría de las levaduras estudiadas mostraron lipotolerancia o incluso lipofilia, especialmente para los lípidos pulmonares. Sin embargo, aparte del género *Malassezia*, ninguna de ellas se considera actualmente lipofílica. Hasta donde sabemos, no existen estudios sobre lipofilia con lípidos humanos con ninguna de estas levaduras en las principales bases de datos. Este nuevo hallazgo podría tener importantes implicaciones para futuros estudios sobre el microbioma, así como ahondar en la patogenia de procesos respiratorios y entender cómo algunas de ellas utilizan el pulmón como puerta de entrada para producir infecciones a distancia. El hecho de que *Malassezia restricta* pueda crecer con lípidos pulmonares y su alta prevalencia en los estudios del micobioma pulmonar, nos lleva a pensar que pulmón podría ser el hábitat natural de esta levadura.

E. MACRÓFAGOS ALVEOLARES EN EL CÁNCER DE PULMÓN

En el estudio de macrófagos alveolares, todas las muestras de pacientes con cáncer de pulmón tenían un mayor porcentaje de macrófagos M2. Esto es esperable, ya que este subtipo de macrófagos favorece la progresión tumoral. Sin embargo, la proporción de M2/M1 no es igual en todos los pacientes y existe una diferencia notable en el caso de los pacientes con carcinoma de células pequeñas. Hay muy poca información en este sentido con la que contrastar nuestros resultados. En un reciente estudio realizado con 67 pacientes se observó que los macrófagos M2 aumentaban significativamente en los pacientes con carcinoma de células pequeñas, con un aumento simultáneo de la IL-10, en comparación con los pacientes con carcinoma de células no pequeñas (87). Además, la mayor frecuencia de M2 y el nivel elevado de IL-10 en el LBA de pacientes con carcinoma de células pequeñas se correlacionó positivamente con el estadio avanzado del tumor, pero negativamente con la supervivencia (87). Creemos que las diferencias encontradas con nuestros resultados pueden deberse a que en el estudio mencionado sólo se utiliza un marcador específico para identificar a los macrófagos M2 (CD206), mientras que nosotros hemos utilizado dos (C206 y CD163) y en el estudio citado no han utilizado marcadores específicos de M1 (87). Nuestra muestra en esta parte del estudio es pequeña, pero los pacientes han sido seleccionados de forma muy rigurosa y tampoco encontramos evidencias en la literatura que descarten nuestros hallazgos.

El análisis del LBA es un enfoque prometedor para evaluar el microambiente tumoral. Las poblaciones de macrófagos asociadas al tumor pueden estar a la vanguardia de la investigación del cáncer de pulmón y podrían ser en el futuro una nueva estrategia de tratamiento (88). De

hecho, un artículo publicado en 2018 demostró que la inyección de M1NV-R848 puede repolarizar los M2 a M1 y potenciar la eficacia antitumoral de la terapia con inhibidores del punto de control PD-1 en el cáncer de vejiga (89). En nuestros hallazgos, podemos ver que los pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas además de tener un alto número de macrófagos M2, también tienen un alto número de macrófagos M1, haciendo que su ratio M2/M1 sea significativamente menor que en otros tipos de cáncer de pulmón. No sabemos si esto podría estar relacionado con su diferente origen celular neuroendocrino y agresividad, o si podría influir su localización central parahiliar o paramediastínica (90%), causando atelectasia y retención de secreciones distalmente.

F. FORTALEZAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Las fortalezas principales del presente estudio son su carácter multicéntrico, con un número amplio de pacientes y la recogida de muestras realizada de manera prospectiva con unos criterios de inclusión y exclusión bien establecidos. Así como la utilización de varios controles aleatorios de esterilidad de los broncoscopios. Además, las muestras con las que se ha trabajado en el estudio son de LBA obtenidas por broncoscopia, consideradas altamente representativas de la vía aérea inferior humana y no sujetas a contaminación de vía aérea superior, como pueden ser otras muestras tipo lavado oral, hisopo orofaríngeo o esputo. Otra fortaleza de nuestro estudio es que se han seguido unos criterios de selección de pacientes muy estrictos, para no incluir pacientes con disbiosis pulmonar. Otras de las fortalezas del presente estudio es que se ha estudiado el microbioma pulmonar, tanto a nivel de secuenciación, como mediante cultivos empleando diferentes medios.

Por otro lado, nuestro estudio adolece de ciertas limitaciones. En primer lugar, parte de la recogida de muestras tuvo lugar durante el periodo de pandemia por la COVID-19. De manera que los periodos de brotes u “olas” de infecciones por SARS-CoV-2 obligaban, prácticamente, a detener la recogida de muestras. Otra posible limitación es que la población control no son sujetos completamente sanos, sino con otro tipo de patología respiratoria no neoplásica maligna, que además no tuvieran procesos infecciosos ni estado de inmunodepresión. Por ejemplo, se incluyen como controles pacientes con EPID, con tos crónica o con estenosis traqueal.

Por otra parte, trabajar con especies de *Malassezia* mediante cultivo ha sido complicado y laborioso, ya que precisan medios lipídicos muy específicos y periodos de incubación

extendidos. Esto puede haber supuesto un sesgo en la obtención de resultados en los ensayos de lipofilia con lípidos pulmonares, para especies distintas de *M. restricta*. Otra limitación es el reducido número de muestras que fueron válidas para el estudio de poblaciones de macrófagos alveolares, ya que únicamente pudo realizarse en 19 pacientes: 15 pacientes con cáncer de pulmón y 4 controles. La necesidad de procesar las muestras para el marcado de macrófagos, inmediatamente después de ser obtenidas por broncoscopia, limitó mucho el tamaño muestral de esta parte del estudio.

G. APLICABILIDAD Y DESARROLLOS FUTUROS DE INVESTIGACIÓN

Como ya hemos apuntado a lo largo de esta memoria, a día de hoy se conoce poco sobre la posible relación del microbioma pulmonar con el cáncer de pulmón.

Las muestras obtenidas de LBA para realizar el presente estudio tienen un altísimo valor, ya que se han obtenido en pacientes recién diagnosticados de cáncer de pulmón, con lo cual podría estudiarse en el futuro su relación con la respuesta que han tenido los pacientes a los diferentes tratamientos oncológicos, siendo de especial interés, si la respuesta a la inmunoterapia podría estar influenciada por el microbioma pulmonar. Estudios publicados previamente han relacionado el microbioma intestinal con la respuesta a la inmunoterapia en pacientes con melanoma (24).

Por otro lado, podría ser de interés valorar si el padecer EPOC además de cáncer de pulmón, modifica la composición del microbioma. Ambas enfermedades tienen en común como factor de riesgo para ser desarrolladas la exposición al tabaco. El diagnóstico de EPOC se establece en un escenario compatible y con una exposición de riesgo, por presentar obstrucción bronquial irreversible en la espirometría. Prácticamente todos los pacientes con cáncer de pulmón tendrán hechas pruebas de función pulmonar. Se podría recuperar retrospectivamente los resultados de función pulmonar y tratar de ver si existen diferencias o no en la composición del microbioma.

Por último, tenemos mucho interés en estudiar más a fondo el comportamiento del género *Cryptococcus* y los lípidos pulmonares, para valorar si este hecho guarda relación con la patogenicidad fúngica en este órgano o como puerta de entrada del patógeno.





VI. CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. La carga fúngica que constituye el microbioma de la vía respiratoria inferior se puede considerar baja, tanto determinada por métodos moleculares como por cultivo.
2. Las levaduras son los hongos más prevalentes en el microbioma de la vía respiratoria inferior, siendo el género *Malassezia* el más abundante y prevalente.
3. La especie *Malassezia restricta* constituye el núcleo del microbioma, con presencia detectable por secuenciación de alto rendimiento en el 98% de las muestras estudiadas de la vía aérea inferior de pacientes con cáncer de pulmón como con otras patologías de base (controles).
4. No hay diferencias significativas en la composición del microbioma de los pacientes con cáncer de pulmón respecto a aquellos que no lo padecen.
5. Los pacientes que sufren cáncer de pulmón tienen menor diversidad en el microbioma que aquellos que no lo padecen.
6. La mayoría de las especies detectadas como muy prevalentes en el microbioma pulmonar mediante secuenciación masiva, corresponden con elementos viables del microbioma respiratorio detectados por cultivo.
7. Las especies de levaduras presentes en el microbioma pulmonar *Candida parapsilosis*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Malassezia restricta*, *Malassezia pachydermatis* y *Malassezia arunalokei* se desarrollan *in vitro* utilizando como fuente de lípidos el surfactante pulmonar o su componente más importante (DPPC).
8. Las levaduras de los complejos de especies *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* se comportan de diferente manera en el crecimiento *in vitro* con lípidos pulmonares, lo que evidencia diferencias metabólicas dentro del complejo de especies no descritas hasta el momento.
9. El estudio de macrófagos alveolares ha corroborado la preponderancia de los macrófagos M2 en pacientes con cáncer de pulmón.

10. La expresión de macrófagos alveolares difiere según el subtipo de cáncer de pulmón, antes de recibir cualquier tratamiento oncológico, siendo los macrófagos M1 más abundantes en el carcinoma de células pequeñas que en el resto de tumores.

11. La elevada presencia de *Malassezia restricta* en la vía aérea inferior y su capacidad para utilizar los lípidos pulmonares en su desarrollo nos han llevado a plantear en esta tesis que la vía respiratoria inferior humana sea el nicho ecológico de esta levadura lipofílica y lipodependiente.





VII. REFERENCIAS



1. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, et al. Microbiota in health and diseases. *Sign Transduct Target Ther.* 2022;7(1):135. DOI: 10.1038/s41392-022-00974-4.
2. Grice EA, Segre JA. The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2012;13:151-70. DOI: 10.1146/annurev-genom-090711-163814.
3. Staley JT, Konopa A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol.* 1985;39:321-46. DOI: 10.1146/annurev.mi.39.100185.001541.
4. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 1987;51(2):221-271. DOI: 10.1128/mr.51.2.221-271.1987.
5. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Pro Biol Sci.* 2003;270(2512): 313-321. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218.
6. Hebert PDN, Ratnasingham, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc Biol Sci.* 2003;270(Suppl 1): S96-S99. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0025.
7. Schoch CL, Seifert KA, Hubndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(16):6241-6. DOI: 10.1073/pnas.1117018109.
8. Blaaliid R, Kumar S, Nilsson RH, Abarenkov K, Kirk PM, Kauserud H. ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Mol Ecol Resour.* 2013;13(2):218-24. DOI: 10.1111/1755-0998.12065.
9. Palomares JC, Cuenca Estrella M, Ferrer Rodríguez C, Colom Valiente MF. Diagnóstico micológico mediante técnicas de biología molecular. En: *Guia Práctica de identificación y Diagnóstico en Micología Clínica.* J. Pemán; E. Martín Mazuelos y MC Rubio (Eds) Revista Iberoamericana de Micología Bilbao, 2006.
10. Ahmed S, Ibrahim M, Nantasenamat C, Nisar MD, Malik AA, Waheed R, et al. Pragmatic applications and universality of DNA Barcoding for substantial organisms at species level: A review to explore a way forward. *Biomed Res Int.* 2022;2022:1846485. DOI: 10.1155/2022/1846485.

11. Hernández M, Quijada NM, Rodríguez-Lázaro D, Eiros JM. Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis. *Rev Argent Microbiol.* 2020;52(2):150-161. DOI: 10.1016/j.ram.2019.06.003.
12. Gosens R, Hiemstra PS, Adock IM, Bracke KR, Dickson RP, Hansbro PM, et al. Host-microbe cross-talk in the lung microenvironment: implications for understanding and treating chronic lung disease. *Eur Respir J.* 2020;56(2):1902320. DOI: 10.1183/13993003.02320-2019
13. Weinberg F, Dickson RP, Nagrath D, Ramnath N. The lung microbiome: a central mediator of host inflammation and metabolism in lung cancer patients? *Cancers.* 2020; 13 (1): 13. DOI: 10.3390/cancers13010013.
14. Bernhard W. Lung surfactant: function and composition in the context of development and respiratory physiology. *Ann Anat.* 2016;208:146-150. DOI: 10.1016/j.aanat.2016.08.003
15. Han S, Mallampalli RK. The role of surfactant in lung disease and host defense against pulmonary infections. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12(5):765-774. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201411-507FR.
16. Kumar A, Abdelmalak B, Inoue Y, Culver DA. Pulmonary alveolar proteinosis in adults: pathophysiology and clinical approach. *Lancet Respir Med.* 2018, 6(7):554-565. DOI: 10.1016/S2213-2600(18)30043-2.
17. Punatar AD, Kusne S, Blair JE, Seville MT, Vikram HR. Opportunistic infections in patients with pulmonary alveolar proteinosis. *J Infect.* 2012; 65(2):173-179. DOI: 10.1016/j.jinf.2012.03.020.
18. Rossi SA, García-Barbazan I, Chamorro-Herrero I, Taborda CP, Zaragoza O, Zambrano A. Use of 2D minilungs from human embryonic stem cells to study the interaction of *Cryptococcus neoformans* with the respiratory tract. *Microbes Infect.* 2023: 105260. DOI: 10.1016/j.micinf.2023.
19. García-Castillo V, Sanhueza E, McNERNEY E, Onate SA, García A. Microbiota dysbiosis: a new piece in the understanding of the carcinogenesis puzzle. *J Med Microbiol.* 2016; 65(12): 1347-1362. DOI: 10.1099/jmm.0.000371.

20. Chen J, Domingue JC, Sears CL. Microbiota dysbiosis in select human cancers: evidence of association and causality. *Semin Immunol.* 2017; 32: 25-34. DOI: 10.1016/j.smim.2017.08.001.
21. Tojo R, Suárez A, Clemente MG, De los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Gueimonde M, et al. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(42): 15163-76. DOI: 10.3748/wjg.v20.i41.15163.
22. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23(4): 713-739. DOI: 10.1128/CMR.00011-10.
23. Newman JV, Kosaka T, Spheppard BJ, Fox JG, Schauer BD. Bacterial infection promotes colon tumorigenesis in *Apc* (Min/+) mice. *J Infect Dis.* 2011; 184(2): 227-30. DOI: 10.1086/321998.
24. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets TV, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science.* 2018; 359: 97-103. DOI: 10.1126/science.aan4236.
25. Hwang SY, Kim JY, Lee HS, Lee S, Kim D, Kim S, et al. Pulmonary tuberculosis and risk of lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Med.* 2022;11(3):765. DOI:10.3390/jcm11030765.
26. Laroumagne S, Lepage B, Hermant C, Plat G, Phellipeau M, Bigay-Game L, et al. Bronchial colonisation in patients with lung cancer: A prospective study. *Eur Respir J.* 2013; 43: 220-229. DOI: 10.1183/09031936.00062212.
27. Lee SH, Sung JY, Yong D, Chun J, Kim SY, Song JH, et al. Characterization of microbiome in bronchoalveolar lavage fluid of patients with lung cancer comparing with benign mass like lesion. *Lung Cancer.* 2016;102: 89-95. DOI: 10.1016/j.lungcan.2016.10.016.
28. Tsay JJ, Wu BG, Badri MH, Clemente JC, Shen N, Meyn P, et al. Airway microbiota is associated with upregulation of the PI3K pathway in lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018; 198: 1188-1198. DOI: 10.1164/rccm.201710-2118OC.
29. Liu HX, Tao LL, Zhang J, Zhu YG, Zheng Y, Liu D, et al. Difference of lower airway microbiome in bilateral protected specimen brush between lung cancer patients with unilateral lobar masses and control subjects. *Int J Cancer.* 2018; 142(4): 769-78. DOI: 10.1002/ijc.31098.

30. Patnaik SK, Cortes EG, Kannisto ED, Punnanitnont A, Dhillon SS, Liu S, et al. Lower airway bacterial microbiome may influence recurrence after resection of early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2021;161(2): 419-429. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2020.01.104.
31. Huseyin CE, Rubio RC, O'Sullivan O, Cotter PD, Scanlan PD. The fungal frontier: a comparative analysis of methods used in the study of the human gut mycobiome. *Front Microbiol.* 2017;8:1432. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01432.
32. Spatz M, Richard ML. Overview of the potential role of *Malassezia* in gut health and disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10: 201. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00201.
33. Aykut B, Pushalkar S, Chen R, Li Q, Abengoza R, Kim Ji, et al. The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL. *Nature.* 2019; 574(7777): 264-267. DOI: 10.1038/s41586-019-1608-2.
34. Godoy-Vitorino F, Romaguera J, Zhao C, Vargas-Robles D, Ortiz-Morales G, Vázquez-Sánchez F, et al. Cervicovaginal fungi and bacteria associated with cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infections in a Hispanic population. *Front Microbiol.* 2018;9:2533. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02533.
35. Gaitanis G, Velegraki A, Magiatis P, Pappas P, Bassukas ID. Could *Malassezia* yeasts be implicated in skin carcinogenesis through the production of aryl-hydrocarbon receptor ligands? *Med Hypotheses.* 2011;77(1):47-51. DOI: 10.1016/j.mehy.2011.03.020.
36. Zhao Y, Yi J, Xiang J, Jia W, Chen A, Chen L, et al. Exploration of lung mycobiome in the patients with non-small-cell lung cancer. *BMC Microbiol.* 2023;23:81. DOI: 10.1186/s12866-023-02790-4.
37. Dohlman AB, Klug J, Mesko M, Gao IH, Lipkin SM, Shen X, et al. A pan-cancer mycobiome analysis reveals fungal involvement in gastrointestinal and lung tumors. *Cell.* 2022;185(20):3807-3822. DOI: 10.1016/j.cell.2022.09.015.
38. Liu NN, Yi CX, Wei LO, Zhou JA, Jiang T, Hu CC, et al. The intratumor mycobiome promotes lung cancer progression via myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Cell.* 2023;41(11):1927-1944.e9. DOI: 10.1016/j.ccell.2023.08.012.

39. Xu X, Ding F, Hu X, Yang F, Zharg T, Dong J, et al. Upper respiratory tract mycobiome alterations in different kinds of pulmonary disease. *Front Microbiol.* 2023;14:1117779. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1117779.
40. Rubio-Portillo E, Orts D, Llorca E, Fernández C, Antón J, Ferrer C, et al. The domestic environment and the lung mycobiome. *Microorganisms.* 2020;8(11): 1717. DOI: 10.3390/microorganisms8111717.
41. Midgley G. The lipophilic yeasts: state of the art and prospects. *Med Mycol.* 2000; 38(1): 9-16. DOI: 10.1080/744118733.
42. Cabañes, FJ. *Malassezia pachydermatis*: to be, or not to be lipid-dependent. *Rev Iberoam Micol.* 2020; 37(1): 3-4. DOI: 10.1016/j.riam.2019.10.003 22.
43. Moore PS, Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(12):878-89. DOI: 10.1038/nrc2961.
44. Nachira D, Congedo MT, D'Argento E, Meacci E, Evangelista J, Sassarossi C, et al. The role of Human Papilloma Virus (HPV) in primary lung cancer development: state of the art and future perspectives. *Life (Basel).* 2024;14(1):110. DOI: 10.3390/life14010110.
45. Chen Y, Liu T, Xu Z, Dong M. Association of Epstein-Barr virus (EBV) with lung cancer: meta-analysis. *Front Oncol.* 2023;13:1177521. DOI: 10.3389/fonc.2023.1177521.
46. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: an overview. *Int J Cancer.* 2021. DOI: 10.1002/ijc.33588.
47. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11:39–51. DOI: 10.1016/j.jtho.2015.09.009.
48. Majem M, Juan O, Insa A, Reguart B, Trigo JM, Carcereny E. SEOM clinical guidelines for the treatment of non-small cell lung cancer (2018). *Clin Transl Oncol.* 2019; 21(1):3-17. DOI: 10.1007/s12094-018-1978-1.

49. Villar F, Muguruza I, Belda J, Molins L, Rodríguez PM, Sánchez de Cos J, et al. Recomendaciones SEPAR de diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas. Arch Bronconeumol. 2016; 52(1): 2-62. DOI: 10.1016/S0300-2896(16)30198-3 .
50. García-Campelo R, Sullivan I, Arriola E, Insa A, Vidal OJ, Cruz-Castellanos P. SEOM-GECP Clinical guidelines for diagnosis, treatment and follow-up of small-cell lung cancer (SCLC) (2022). Clin Transl Oncol. 2023;25(9):2679-2691. DOI: 10.1007/s12094-023-03216-3.
51. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, et al. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. J Thorac Oncol. 2022; 17 (3): 362-387. DOI: 10.1016/j.jtho.2021.11.003.
53. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144:646–74, DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.4.
53. Muenst S, Läubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. J Intern Med. 2016;279(6): 541-562. DOI:10.1111/joim.12470.
54. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol. 2022;3:991–8. DOI: 10.1038/ni1102-991.
55. Conway EM, Pikor LA, Kung SHY, Hamilton MJ, Lam S, Lam WL, et al. Macrophages, inflammation and lung cancer. Am J Respir Crit Care Med. 2016;193:116–30, DOI: 10.1164/rccm.201508-1545CI.
56. Xu F, Wei Y, Tang Z, Liu B, Dong J. Tumor-associated macrophages in lung cancer: friend or foe? (review). Mol Med Rep. 2020;22:4107-4115. DOI: 10.3892/mmr.2020.11518.
57. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol. 2002;23:549–55. DOI: 10.1016/s1471-4906(02)02302-5.
58. Almatroodi SA, McDonald CF, Pouniotis DS. Alveolar macrophage polarisation in lung cancer. Lung Cancer Int. 2014;2014:721087. DOI: 10.1155/2014/721087.

59. Tomkovich A, Jobin C. Microbiota and host immune responses: a love–hate relationship. *Immunology*. 2016; 147(1):1-10. DOI: 10.1111/imm.12538.
60. Althubaiti A. Sample size determination: A practical guide for health researches. *J Gen Fam Med*. 2023;24(2): 72-78. DOI: 10.1002/jgf2.600
61. Du Rand IA, Blaikley J, Booton R, Chaudhuri N, Gupta V, Khalid S, et al. British Thoracic Society guideline for diagnostic flexible bronchoscopy in adults: accredited by NICE. *Thorax* 2013, 68 Suppl 1: i1–i44. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2013-203618.
62. Far FE, Al-Obaidi MMJ, Desa MNM. Efficacy of modified Leeming-Notman media in a resazurin microtiter assay in the evaluation of in-vitro activity of fluconazole against *Malassezia furfur* ATCC 14521. *J Mycol Med*. 2018;28(3):486–491. DOI: 10.1016/j.mycmed.2018.04.007.
63. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex, *Fungal Genet Biol*. 2015;78:16–48. DOI: 10.1016/j.fgb.2015.02.009.
64. Kidd SE, Abdolrasouli A, Hagen F. Fungal nomenclature: managing change is the name of the game. *Open Forum Infect Dis*. 2023; 10(1): ofac559. DOI: 10.1093/ofid/ofac559.
65. Njoku DI, Guo Q, Dai W, Chen JL, Mao G, Sun Q, Sun H, Peng YK. The multipurpose application of resazurin in micro-analytical techniques: Trends from the microbial, catalysis and single molecule detection assays. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2023;167: 117288. DOI: 10.1016/j.trac.2023.117288.
66. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abner CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*. 2019; 37(8): 852–857. DOI: 10.1038/s41587-019-0209-9.
67. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011, 27 (16): 2194–2200. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr381.
68. Aho VTE, Pereira PAB, Haahtela T, Pawankar R, Auvinen P, Koskinen K. The microbiome of the human lower airways: A next generation sequencing perspective. *World Allergy Organ J*. 2015; 8(1):23. DOI:10.1186/s40413-015-0074-z.

69. Weiss SJ, Xu Z, Amir A, Peddada S, Bittinger K, Gonzalez A, et al. Effects of library size variance, sparsity, and compositionality on the analysis of microbiome data. *Peer J PrePrints*. 2015; 3: e1157v1. DOI:10.7287/peerj.preprints.1157v1.
70. Ferrer C, Colom F, Frasés S, Mulet E, Abad JL, Alió JL. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol*. 2001;39(8):2873-9. DOI: 10.1128/JCM.39.8.2873-2879.2001.
71. [Submitted to *Mycopathologia* 02/02/2024, MYCO-D-24-00107, under review] Esteban V, Gilabert P, Ferrer C, Gálvez B, Chiner E, Colom MF. Affinity of *Malassezia* and other yeasts for pulmonary lipids. DOI: 10.21203/rs.3.rs-4187603/v1.
72. Esteban V, Javaloyes J, Martínez-López S, Sancho-Chust JN, Gálvez B, Chiner E, et al. Alveolar macrophage expression differs according to lung cancer subtype. *Arch Bronconeumol*. 2024;60(1):59-61. DOI: 10.1016/j.arbres.2023.10.010.
73. Cabañes FJ, Vega S, Castellá G. *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Med Mycol*. 2011 ;49(1):40-8. DOI: 10.3109/13693786.2010.493562.
74. Martinsen EMH, Eagan TML, Leiten EO, Haaland I, Husebø GR, Knudsen KS, et al. The pulmonary mycobiome—A study of subjects with and without chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One*. 2021; 16(4): e0248967. DOI: 10.1371/journal.pone.0248967.
75. Soret, P, Vandenberght LE, Francis F, Coron N, Enaud R, Avalos M, et al. Respiratory mycobiome and suggestion of inter-kingdom network during acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *Sci. Rep*. 2020; 10(1): 3589. DOI: 10.1038/s41598-020-60015-4.
76. Delhaes L, Monchy S, Frealle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, et al. The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community—implications for therapeutic anagement. *PLoS One*. 2012; 7(4):e36313. DOI: 10.1371/journal.pone.0036313.
77. Van Woerden HC, Gregory C, Brown R, Marchesi JR, Hoogendoorn B, Matthews IP. Differences in fungi present in induced sputum samples from asthma patients and non-atopic controls: a community based case control study. *BMC Infect Dis*. 2013;13:69. DOI: 10.1186/1471-2334-13-69.

78. Bello S, Vengoechea JJ, Ponce-Alonso M, Figueredo AL, Mincholé E, Rezusta A, et al. Core microbiota in central lung cancer with Streptococcal enrichment as a possible diagnostic marker. *Arch Bronconeumol*. 2020; S0300-2896(20)30192-7. DOI: 10.1016/j.arbres.2020.05.034.
79. Gholami M, Mokhtari F, Mohammadi R. Identification of *Malassezia* species using direct PCR- sequencing on clinical samples from patients with pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis. *Curr Med Mycol*. 2020;6(3):21-26. DOI: 10.18502/cmm.6.3.3984.
80. Tenagy, Tejima K, Chen X, Iwatani S, Kajiwara S. Long-chain acyl-CoA synthetase is associated with the growth of *Malassezia* spp. *J Fungi (Basel)*. 2019; 5(4): 88. DOI: 10.3390/jof5040088.
81. Agrawal V, Bhagwat AM, Sawant C. Sesame oil incorporated medium for isolation and enumeration of lipophilic yeasts. *IJPSR*. 2014; 5(7): 2972-79. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.5(7).2972-79.
82. Begum N, Lee S, Portlock TJ, Pellon A, Nasab SDS, Nielsen J, et al. Integrative functional analysis uncovers metabolic differences between *Candida* species. *Commun Biol*. 2022;5(1):1013. DOI: 10.1038/s42003-022- 03955-z.
83. Brown AJP, Brown GD, Netea MG, Gow NAR. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends Microbiol*. 2014;22(11):614-22. DOI: 10.1016/j.tim.2014.07.001.
84. Bittinger K, Charlson ES, Loy E, Shirley DJ, Haas AR, Laughlin A, et al. Improved characterization of medically relevant fungi in the human respiratory tract using next-generation sequencing. *Genome Biol*. 2014;15(10):487. DOI: 10.1186/s13059-014-0487-y.
85. Cui L, Morris A, Huang L, Beck JM, Twigg HL, Von Mutius E, et al. The microbiome and the lung. *Ann Am Thorac Soc*. 2014;11(Suppl 4):S227-32. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201402-052PL.
86. Wang SY, Lo YF, Shih HP, Ho MW, Yeh CF, Peng JJ, et al. *Cryptococcus gattii* infection as the major clinical manifestation in patients with autoantibodies against granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Immunol*. 2022 ;42(8):1730-1741. DOI: 10.1007/s10875-022-01341-2.
87. Xu X, Gu Y, Zhao S, Hua S, Jiang Y. Increased IL-10+CD206+CD14+M2-like macrophages in alveolar lavage fluid of patients with small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2020 Dec;69(12):2547-2560. DOI: 10.1007/s00262-020-02639-z.

88. Hu Q, Wu G, Wang R, Ma H, Zhang Z, Xue Q. Cutting edges and therapeutic opportunities on tumor-associated macrophages in lung cancer. *Front Immunol.* 2022;13:1007812. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1007812.

89. Choo YW, Kang M, Kim HY, Han J, Kang S, Lee JR, et al. M1 macrophage-derived nanovesicles potentiate the anticancer efficacy of immune checkpoint inhibitor. *ACS Nano.* 2018;12:8977–93. DOI: 10.1021/acsnano.8b02446.





VIII. ANEXOS



ANEXO I

Hoja de recogida de datos de los pacientes incluidos en el estudio. Estudio MICROBERESP. Laboratorio de Micología médica, UMH.



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN MICROBERESP

UMH-HOSPITALES DE ELDA. ALICANTE. VINALOPÓ. SANT JOAN

Investigador Principal: M^a FRANCISCA COLOM

Investigadores responsables en cada Hospital:

HOSPITAL DE ELDA: Dr. David Orts; HOSPITAL DE ALICANTE: Dra. Cleofé Fernández; HOSPITAL DEL VINALOPÓ: Dra. Beatriz Amat; HOSPITAL DE SANT JOAN D'ALACANT: Dr. Eusebi Chiner

MICROBIOMA DE APARATO RESPIRATORIO: RELACIÓN CON EL MEDIOAMBIENTE

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

INSTRUCCIONES

Una vez firmado el consentimiento informado, se le asignará al paciente un número que será el resultado de añadir al código postal del hospital, tres dígitos de forma correlativa y ascendente, empezando por el 001. Así, por ejemplo, el primer paciente del hospital de Elda será el paciente número: 03600-001

En la unidad de broncoscopias de cada servicio de neumología implicado se guardará un listado con la identificación de cada uno de los pacientes por si fuera necesario, pero solo se mostrará en la hoja de recogida de datos el número del paciente como único identificador.

Colaboran en el estudio las siguientes entidades e investigadores:

1. Universidad Miguel Hernández:

Laboratorio de Mic. Médica: MF. Colom y C. Ferrer.
Laboratorio de Inmunología: E. Caparrós

2. Universidad de Alicante:

Laboratorio de Microbiología: J. Antón y E. Rubio

3. Hospital Universitario del Vinalopó

Servicio de Neumología: B. Amat; B. Gálvez

4. Hospital General Universitario de Alicante

Servicio de Neumología: C. Fernández

5. Hospital General Universitario de Elda:

Servicio de Neumología: D. Orts y E. Llorca

6. Hospital Universitario de Sant Joan d'Alacant:

Servicio de Neumología: E. Chiner y V. Esteban

Investigadores responsables en cada Hospital:

HOSPITAL DE ELDA: Dr. David Orts; HOSPITAL DE ALICANTE: Dra. Cleofé Fernández; HOSPITAL DEL VINALOPÓ: Dra. Beatriz Amat; HOSPITAL DE SANT JOAN D'ALACANT: Dr. Eusebi Chiner

ESTUDIO MICROBIOTA FÚNGICA PULMONAR

HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

Nº DE PACIENTE

SEXO: H M

					-			
--	--	--	--	--	---	--	--	--

EDAD (años)

FECHA DE LA PRUEBA (dd/mm/aaaa)

--	--	--

		-			-				
--	--	---	--	--	---	--	--	--	--

LUGAR DE NACIMIENTO (localidad/provincia/país):

LUGAR DE RESIDENCIA (localidad/provincia/país):

DESDE AÑO:

PROFESIÓN/ACTIVIDADES DE ESPECIAL RIESGO (exposición a aves y/o detritus vegetales):

¿HA VIAJADO FUERA DE ESPAÑA?

SI

NO

- LUGAR:

AÑO:

- LUGAR:

AÑO:

- LUGAR:

AÑO:

HÁBITO TABÁQUICO: SI

NO

EX FUMADOR

EXPOSICIÓN ACUMULADA:

DIAGNÓSTICO NEUMOLÓGICO (marcar todos los que correspondan):

<input type="checkbox"/>	EPOC	<input type="checkbox"/>	METASTASIS PULMONARES
<input type="checkbox"/>	BRONQUIECTASIAS	<input type="checkbox"/>	CUERPO EXTRAÑO ENDOBRONQUIAL
<input type="checkbox"/>	EPID	<input type="checkbox"/>	CARCINOMA BRONCOGÉNICO
<input type="checkbox"/>	SI CARCINOMA DE PULMÓN, ESPECIFICAR AP:		
<input type="checkbox"/>	OTROS (especificar):		

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN **MICROBERESP**
UMH-HOSPITALES DE ELDA. ALICANTE. VINALOPÓ. SANT JOAN

Investigador Principal: M^a FRANCISCA COLOM

Investigadores responsables en cada Hospital:

HOSPITAL DE ELDA: Dr. David Orts; HOSPITAL DE ALICANTE: Dra. Cleofé Fernández; HOSPITAL DEL VINALOPÓ: Dra. Beatriz Amat; HOSPITAL DE SANT JOAN D'ALACANT: Dr. Eusebi Chiner

TRATAMIENTO CON CORTICOIDES INHALADOS: SI NO

Si afirmativo, especificar:

INMUNODEPRESIÓN: SI NO

CÓDIGO DIAGNÓSTICO ID (ver al final)

--	--

SI OTROS ESPECIFICAR:

FARMACOS ANTIMICROBIANOS CONSUMIDOS EN EL ULTIMO MES (DOSIS Y TIEMPO)

BRONQUIO EN EL QUE SE REALIZA

BAL: CANTIDAD INSTILADA:

CANTIDAD RECOGIDA:

CANTIDAD PROCESADA PARA ESTUDIO:

CODIGOS DE INMUNODEPRESIÓN	
01	Neutropenia (< 500/mm ³) durante > 10 días en último mes.
02	Tratamiento esteroideo prolongado (> 20 mg /día durante > 3 semanas o > 700 mg prednisona en total en últimos 2 meses)
03	Tratamiento inmunosupresor durante los últimos 3 meses
04	Portador de trasplante de órgano sólido.
05	Portador de trasplante hematopoyético.
06	Neoplasia hematológica último año.
07	Neoplasia no hematológica último año.
08	Tratamiento quimioterápico últimos 6 meses
09	OTROS (especificar)

ANEXO II

Dictamen favorable del comité de ética de la Universidad Miguel Hernández para poder realizar el estudio.



Dr. Dña. María Francisca Colom Valiente
Departamento de Producción Vegetal y Microbiología

178/2015

Elche, a 25 de Junio de 2015

Investigador Principal	María Francisca Colom Valiente	
Tipo de actividad	Proyecto Regional	
Título del proyecto	El MICROBIOMA FÚNGICO DE APARATO RESPIRATORIO: ¿Reservorio de patógenos oportunistas?	
Códigos GIS estancias donde se desarrolla la actividad	Laboratorio de Micología Médica. Edificio Muhammad Al Shafra 1ª planta • Estancias S02P1071; S02P1072; S02P1073	
Evaluación Riesgos Laborales	Conforme condicionado	
Evaluación Ética	Aprobado	
Registro	2014.230.E.OEP	
Referencia	DVM.MCV.01.14	
Caducidad	6 meses	

La evaluación ética del presente proyecto/contrato/prestación de servicios es **favorable**.

Una vez atendidas las observaciones/condiciones mencionadas en el informe adjunto del Servicio de Prevención de Riesgos Laborales, **se autoriza** la realización de la investigación.

Atentamente,

ALBERTO|
PASTOR|
CAMPOS

Firmado digitalmente por ALBERTO|
PASTOR|CAMPOS
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=ALBERTO|PASTOR|CAMPOS,
serialNumber=48361163M,
givenName=ALBERTO, sn=PASTOR
CAMPOS, ou=Ciudadanos, o=ACCV, c=ES
Fecha: 2015.06.25 14:31:50 +0200

Alberto Pastor Campos
Secretario del Órgano Evaluador de Proyectos
Vicerrectorado de Investigación e Innovación

MANUEL
MIGUEL|
JORDAN|VIDAL

Firmado digitalmente por MANUEL MIGUEL|
JORDAN|VIDAL
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=MANUEL MIGUEL|JORDAN|VIDAL,
serialNumber=18965995B,
givenName=MANUEL MIGUEL, sn=JORDAN
VIDAL, ou=Ciudadanos, o=ACCV, c=ES
Fecha: 2015.06.29 12:38:13 +0200

Manuel Miguel Jordán Vidal
Presidente del Órgano Evaluador de Proyectos
Vicerrectorado de Investigación e Innovación

Página 1 de 1



Órgano Evaluador de Proyectos
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

ANEXO III

(1 de 6)

Consentimiento informado de donación de muestras biológicas al biobanco del Hospital General Universitario Dr. Balmis

1. Identificación y descripción del procedimiento

Durante la intervención quirúrgica o la prueba diagnóstica a la que va a ser sometido se podrán tomar muestras de sus tejidos, sangre, así como fluidos (orina, esputo, saliva, etc) o microorganismos. El procedimiento que se le propone consiste en donar voluntariamente cualquier muestra biológica sobrante de la intervención o prueba a la que va a ser sometido a un biobanco de muestras biológicas, sin que ello suponga ningún riesgo añadido para su salud ni comprometa el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad. Dichas muestras biológicas excedentes podrán ser utilizados en proyectos de investigación biomédica que previamente sean aprobados por los comités externos, ético y científico, a los que está adscrito el biobanco.

Las muestras seguirán almacenadas en el biobanco hasta el fin de las existencias si no existe una revocación del presente consentimiento.

2. Objetivo

La finalidad del biobanco es recoger y almacenar muestras biológicas humanas para realizar proyectos de investigación biomédica o diagnósticos. Los resultados de dichos proyectos de investigación pueden derivar en el descubrimiento de nuevos métodos para el mejor diagnóstico de las enfermedades y de nuevas medicinas para tratarlas.

3. Condiciones de la donación

Usted no recibirá ninguna compensación económica ni otros beneficios materiales por donar sus muestras. Sin embargo, si las investigaciones que se realicen tuvieran éxito, podrán ayudar en el futuro a pacientes que tienen su misma enfermedad o padecen otras enfermedades similares.

Las muestras que usted dona no serán vendidas o distribuidas a terceros con fines comerciales, pero los costes de obtención, conservación y envío de las muestras se repercutirán, sin ánimo de lucro, a quienes las utilicen.

La donación de muestras no impedirá que usted o su familia puedan hacer uso de ellas siempre que estén disponibles, cuando así lo requieran. Debe saber que será prioritario el uso diagnóstico de la muestra que dona y que se garantizará un remanente de las muestras para este fin.

En caso de producirse un eventual cierre del biobanco o revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de las muestras estará a disposición en el registro nacional de biobancos para investigación biomédica, con el fin de que pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto de las muestras.

4. Consecuencias previsibles de su realización

Se podría dar la circunstancia de ser contactado/a con el fin de recabar nueva información sobre su situación o de tomar una nueva muestra que pudiera ser interesante en el desarrollo de la investigación biomédica, en cuyo caso volverá a ser informado/a de la situación y tendrá la libertad de participar o rechazar dicha participación. Por tal motivo, es importante que comunique al Servicio de Admisión del centro FUTUROS CAMBIOS DE DIRECCIÓN y números de TELÉFONO, ya que es la única vía para poder contactar con usted.

Es posible que se obtenga información relativa a su salud derivada del desarrollo de los proyectos de investigación y, en particular, datos genéticos con relevancia clínica. En este sentido, puede solicitar la información relativa a su salud derivada del estudio de las muestras donadas. Para ejercer este derecho, tiene a su disposición en el biobanco el correspondiente formulario de solicitud.

La información que se obtenga puede ser relevante también para sus familiares biológicos. Es decisión suya informarles – algo que nosotros le aconsejamos - con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y valorar así cual es el riesgo personal y sus opciones de salud en un futuro.

Cuando esta información, según criterio médico, sea necesaria para evitar un grave perjuicio a la salud de sus familiares biológicos, previa consulta del comité asistencial, se les informará de ello.

5. Derecho de revocación del consentimiento

La decisión de donar sus muestras es totalmente voluntaria. Usted puede negarse a donarlas e incluso puede revocar su consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar ninguna explicación y sin que ello tenga ninguna repercusión en la atención médica que recibe en el Centro.

Si revoca el consentimiento que ahora presta, la parte de las muestras que no se hayan utilizado en la investigación, podrá decidir que sean destruidas o anonimizadas. Tales efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo antes de la revocación de su consentimiento.

6. Riesgos

El procedimiento que se le propone no supone ningún riesgo añadido para su salud ni compromete el correcto diagnóstico y tratamiento de su enfermedad, puesto que se trata de muestra sobrante de la intervención.

La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en las zonas de punción que desaparecen transcurridos 1 ó 2 días.

7. Protección de datos personales y confidencialidad

Los datos personales y de salud obtenidos de su historia clínica o equivalente serán incorporados y tratados en una base de datos que cumple con las garantías que establece la legislación sanitaria y sobre protección de datos de carácter personal.

La cesión a otros centros de investigación, públicos o privados, de sus muestras o de sus derivados, así como de la información contenida en las bases de datos vinculada a las mismas y a su estado de salud, se realizará mediante un procedimiento de disociación, esto es, suprimiendo la información personal que la identifica y sustituyéndola por un código.

Es posible que en el desarrollo de un proyecto de investigación se genere mucha información genética de sus muestras. Si los resultados fueran relevantes desde el punto de vista científico, la información obtenida, desligada de cualquier dato que pueda permitir su identificación por medios razonables, podría ser remitida para su inclusión en bases científicas y demás medios de difusión de contenido científico a los que tendrán acceso, con carácter restringido, investigadores científicos.

El biobanco en el que se custodiarán sus muestras forma parte de la Red Valenciana de Biobancos cuya coordinación es llevada a cabo por el Centro Superior de Investigación de Salud Pública de la Comunitat Valenciana.

Como consecuencia de lo anterior, el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos, esto es, el Centro Superior de Investigación en Salud Pública de la Comunitat Valenciana, tendrá acceso a sus datos personales y a la información clínica asociada a la muestra donada voluntariamente, con el único fin de cumplir con las labores atribuidas a la Red Valenciana de Biobancos en virtud de la legislación vigente. En particular, el eventual acceso a sus datos personales por parte de la Red Valenciana de Biobancos tendrá como finalidad poder coordinar de la manera más eficiente posible desde el punto de vista científico la información obtenida por los biobancos adscritos a la Red Valenciana de Biobancos, mediante la gestión y coordinación del Sistema de Gestión de la Información de la Red Valenciana de Biobancos, así como la coordinación de las actividades desarrolladas por los biobancos, todo ello de acuerdo con la normativa aplicable.

Podrá ejercitar sus derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, para lo cual tiene en el biobanco el correspondiente formulario de solicitud. En dicho escrito, deberá adjuntar copia de su DNI para que el Centro responsable de sus datos pueda comprobar su identidad.



Declaración de consentimiento

EJEMPLAR PARA EL BIOBANCO

D./D^a de años de edad, con domicilio en.....

DNI y nº de SIP

D./D^a de años de edad, con domicilio en.....

DNI en calidad de representante (en caso de minoría legal o incapacidad)

del paciente con DNI y nº de SIP

DECLARO

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He sido informado por el profesional de salud abajo mencionado sobre la donación de muestras a un biobanco.

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo.

He podido realizar observaciones y me han sido aclaradas todas las dudas que he planteado.

He comprendido que la donación de muestras a un biobanco es voluntaria y puedo revocar mi consentimiento en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Que libre y voluntariamente acepto la realización de la donación voluntaria de:

Una/s muestra/s de

Que puedo incluir restricciones sobre el uso de las mismas:

CONSIENTO

Que el Hospital u otros centros de investigación, públicos o privados, utilicen mis datos y las muestras donadas en las condiciones establecidas en la hoja de información.

Que el ente coordinador de la Red Valenciana de Biobancos pueda acceder a mis datos, en la medida en que sea necesario y manteniendo siempre su confidencialidad.

A completar por el donante:

Fdo.: D./D^a

DNI:

A completar por el profesional de salud:

Fdo.: D./D^a

DNI:

Colegiado N^o:

En condición de:

En a de de 20.....



ANEXO IV

Tabla detallada con las características basales de los pacientes incluidos en el estudio.

	Pacientes con cáncer (n=46)	Pacientes sin cáncer (n=32)
Edad (años), media (DE)	65 ± 10	63 ± 11
Sexo		
·Hombres, n (%)	29 (63%)	15 (46,9%)
·Mujeres, n (%)	17 (37%)	17 (53,1%)
Tabaquismo, n (%)		
·Fumadores activos	26 (56,5%)	13 (40,6%)
·Exfumadores	11 (23,9%)	7 (21,9%)
·No fumadores	9 (19,6%)	12 (37,5%)
Exposición acumulada	50 (5-120)	37 (3-80)
Ocupación, n (%)	-Construcción, 9 (19,5%) -Trabajos administrativos, 9 (19,5%) -Agricultura, 3 (6,5%) -Calzado, 3 (6,5%) -Transportes 3 (6,5%) -Electrónica, 3 (6,5%) -Sanidad, 3 (6,5%) -Otros, 13 (28,6%)	-Agricultura, 5 (15,6%) -Trabajos administrativos, 4 (12,5%) -Calzado, 4 (12,5%) -Construcción, 3 (9,4%) -Electrónica, 3 (9,4%) -Transportes, 2 (6,25%) -Otros (34,3%)
Diagnóstico, n (%)	-Adenocarcinoma de pulmón, 20 (43,5%) -CPCP, 11 (23,9%) -Carcinoma epidermoide de pulmón, 10 (21,7%) -Metástasis en pulmón, 3 (6,5%) -Carcinoma broncogénico, 2 (4,3%)	-EPID, 17 (53,1%) -Tos crónica, 6 (18,7%) -Hemoptisis, 3 (9,4%) -Nódulo pulmonar, 3 (9,4%) -Estenosis traqueal, 2 (6,2%) -Cuerpo extraño, 1 (3,1%)

Estadio tumoral, n (%)		-
I	1 (2,2%)	
II	8 (17,4%)	
III	11 (23,9%)	
IV	26 (56,5%)	



ANEXO VI.

Affinity of *Malassezia* and other yeasts for pulmonary lipids

Violeta Esteban MD^{1*}, Pablo Gilabert MD², Consuelo Ferrer BS Ph.D.², Beatriz Gálvez MD³, Eusebi Chiner MD. Ph.D¹, María Francisca Colom MD. Ph.D^{2*}

1. Department of Respiratory Medicine, San Juan de Alicante University Hospital, 03550 Alicante, Spain.
2. Medical Mycology Laboratory, Department of Plant Production and Microbiology, Institute for Healthcare and Biomedical Research of Alicante (ISABIAL), Campus of San Juan de Alicante, University Miguel Hernández, 03550 Alicante, Spain.
3. Department of Respiratory Medicine, Vinalopó University Hospital, 03293 Elche, Alicante, Spain.

Corresponding authors:

*Violeta Esteban, +34 677253979, esteban_vio@gva.es;

*María Francisca Colom; +34 650629196, colom@umh.es

Declarations

The research presented here has been performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

Funding

This study was supported by the *Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery* (Reference project 1134/2020) and by the *Valencian Society of Pulmonology* (*Young researcher grant 2021*).

Acknowledgments

The authors want to give special thanks to Javier Puentes, laboratory technician in the medical mycology laboratory of the university Miguel Hernández.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Abstract

Pulmonary surfactant is the main substance that lines the epithelium of the human Lower Respiratory Tract (LRT). It has a high lipidic content, being dipalmitoyl-phosphatidylcholine (DPPC) the most abundant one. Although surfactants have a well-known antifungal activity for some yeast species, the important presence of species like *Malassezia restricta* in the lung mycobiome, leads to the idea that these yeasts may have some lipo-tolerance or even lipoaffinity for pulmonary lipids.

A culture-based study of affinity and tolerance to pulmonary lipids by yeasts described as important members of the lung microbiome has been carried out.

Ten species belonging to the genera *Malassezia*, *Candida* (including the new genera *Nakaseomyces* and *Meyerozyma*) and *Cryptococcus*, were tested for their ability to grow on media containing pulmonary lipids such as DPPC and commercial porcine surfactant. Lipoaffinity or lipo-tolerance was considered on the basis of their growth on standard media, considered as such the Modified Leeman Notman Agar (MLNA) for *Malassezia* species, and the Sabouraud Dextrose Agar (SDA) for the other genera.

The addition of DPPC or surfactant to the media assayed resulted in increased growth of *Malassezia* yeasts and one of the *Cryptococcus* species. *C. parapsilosis* showed similar growth to the one obtained in the standard media and the other tested yeasts mainly showed lipo-tolerance but not lipoaffinity for these compounds.

To our knowledge, this is the first report on the influence of pulmonary lipids in the *in vitro* development of *Malassezia* spp and other yeasts members of the lung mycobiome.

Keywords

Pulmonary lipids, lipophilic yeasts, mycobiome, *Malassezia*, lower respiratory tract.

1. Introduction

Research on lung microbiome has mainly focused on bacteria, while fungi are often neglected due to their lower abundance and the lack of standards widely adapted by the community, both experimental and analytical [1,2]. However, fungi (mycobiome) also play a role in the maintenance of homeostasis and immunomodulation of the respiratory tract [1,3]. Compared to the gut microbiome studies, the pulmonary microbiome has remained in the background due to its technical complexity, as its constant interaction with the environment [2].

During the last six years, our group has been performing a study of the mycobiome of the Lower Respiratory Tract (LRT) of patients with non-infectious lung pathologies [4]. Our findings, as well as others reported in the literature [5-10], show that the core mycobiome correspond mainly to yeasts species. Core or nuclear microbiome has been defined as those taxa with an abundance higher than 0.1% in most of the samples (85-95% depending on the authors) [4,11,12]. Among the most prevalent species are *Malassezia restricta*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans s.l.*, *Naganishia albida* and *Rhodotorula mucilaginosa*. *Malassezia restricta* is by far the most frequently detected and the one with the highest number of sequences in human Broncho-Alveolar Lavage (BAL) samples [4,13,14]. Considering the reported antifungal effect of surfactant and to assess the role of the pulmonary mycobiome, we considered of great importance to demonstrate the viability of the species detected by molecular methods. In this regard, we performed BAL cultures on Sabouraud media in parallel to the molecular study and obtained the growth of some of the species detected as nuclear mycobiome [4]. Nevertheless, *Malassezia* species couldn't be isolated in culture mainly because of its lipodependence.

The genus *Malassezia* belongs to the class Malasseziomycetes, which also belongs to the subphylum Ustilaginomycotina (phylum Basidiomycota). It is composed of 18 species of

lipophilic yeasts, commonly found as commensals in the cutaneous microbiota of mammals [15,16]. *Malassezia furfur*, *M. restricta*, *M. globosa*, *M. pachydermatis* and *M. sympodialis* stand out for their presence in humans. *M. pachydermatis* is usually present in animals and is transient in humans [17]. A study of the genome of this genus of yeasts showed that they present a loss of genes coding for the fatty acid synthase complex, while they present an increase in genes related to lipid degradation and carbohydrate metabolism. That has been explained as an adaptation to living on the skin [18,19]. This genomic reorganization prevents them from synthesizing their own lipids, limiting them to depend on external sources. The culture medium designed by Sabouraud (SDA) is a general medium for fungi in which the lipo-dependent species of *Malassezia* are not able to grow, since it only contains glucose and peptone [20]. The exception is *M. pachydermatis* which is the only one that can develop by using the small lipid portion of the peptone [17]. In addition to the characteristic lipid dependence, yeasts of the genus *Malassezia* can consume L-DOPA and produce melanin from it, which is considered an important virulence mechanism for some fungi such as *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* species complexes [21].

The genus *Candida* belongs to phylum Ascomycota. *Candida* species (spp.) are, by far, the most common fungal pathogens in humans, also a known colonizer of the human skin, gastrointestinal tract, oral cavity, upper airways and genitourinary tract of women [22]. There are over 200 *Candida* species currently identified, but only a handful of these are present in the human microbiota with the ability to cause infection and pathology. If carbohydrate sources are limited, *Candida* species can use amino acids and lipids as supplementation for metabolic adaptation [23]. In recent years, a considerable number of studies have emphasized the contribution of lipids to fungal pathogenicity and other virulence mechanisms such as drug resistance, biofilm formation, and release of extracellular vesicles [23].

Most of the lung surface is composed of alveoli, whose wall is lined by pulmonary surfactant. Pulmonary surfactant is a liquid whose function is to decrease the surface tension at the liquid-air interface inside the alveoli, preventing their collapse. It is produced by the type-II-pneumocytes of the alveolar epithelium from the 24th week of gestation [24]. Surfactant comprises about 80% of phospholipids, 10% cholesterol and

2-5% surfactant proteins (SP-A, SP-B, SP-C and SP-D). The most abundant phospholipid is dipalmitoyl-phosphatidylcholine (DPPC), which is a phospholipid exclusive to pulmonary surfactant [24,25]. The more hydrophilic surfactant components, SP-A and SP-D participate in pulmonary host defence and modify immune responses. That lipid-rich environment of the lung influence, not only the composition of the LRT microbiota, but also the kind of opportunistic mycoses whose entry point route is through the lung.

This study aims to investigate the tolerance and affinity of yeasts species described as common members of the pulmonary mycobiome for lipids such as the components of pulmonary surfactant. This may lead to a better understanding of the lung physiology related to its mycobiome, and the pathogenesis of some opportunistic fungal infections.

2. Materials and Methods

2.1 Design

This is an experimental semi-quantitative study that has been carried out entirely at the Medical Mycology Laboratory of the University Miguel Hernández (UMH. Alicante. Spain).

2.2 Yeast isolates

A set of 10 species of yeast previously described as members of the Low Respiratory Tract [4] were used in the study. *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Nakaseomyces glabrata* (formerly *Candida glabrata*), *Meyerozyma guilliermondii* (formerly *Candida guilliermondii*), *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus deneoformans*, *Cryptococcus deuterogattii* and three *Malassezia* strains: *Malassezia arunalokei*, *Malassezia pachydermatis* and *Malassezia restricta*. *M. restricta* was acquired from the type-culture collection of CBS-KNAW (*Westerdijk Fungal Biodiversity Institute*, Utrecht. The Netherlands). The others were obtained from our own culture collection and were isolated from clinical strains consisting of human BAL samples (*C. parapsilosis* and *M. guilliermondii*), human oral cavity (*Nakaseomyces glabrata*, and *C. albicans*), human blood (*C. deneoformans*), human cerebrospinal fluid (*C. neoformans* and *C.*

deuterogattii), human ear canal (*M. arunalokei*) and dog ear (*M. pachydermatis*). The origin of the isolates is listed in Table 1.

Table 1. Yeast strains used in the study: Abbreviation, name of the species, identification code and origin of the isolates. CLA: Collection of yeasts of Alicante (Spain); CCA: Collection of Cryptococcus of Alicante (Spain); CBS-KNAW: VI-KNAW Culture Collection. Utrecht (The Netherlands). *Name of species according to Hagen F, et al²⁶, and Kidd SE, et al²⁷. **Two isolates of the same strain of *Malassezia restricta* were assayed.

Abbreviation	SPECIES	ID CODE	SOURCE
N. g.	<i>Candida glabrata</i> (<i>Nakaseomyces glabrata</i>)*	CLA44	Dental prosthesis
C. a.	<i>Candida albicans</i>	CLA45	Oral cavity
C. p.	<i>Candida parapsilosis</i>	CLA46	Human Bronchoalveolar lavage (BAL)
M. g.	<i>Candida guilliermondii</i> (<i>Meyerozyma guilliermondii</i>) *	CLA47	Human Bronchoalveolar lavage (BAL)
C. n.	<i>Cryptococcus neoformans</i> s.s.*	CCA494	Human cerebrospinal fluid
C. dn.	<i>Cryptococcus deneoformans</i> *	CCA420	Human blood culture
C. deu	<i>Cryptococcus deuterogattii</i> *	CCA512	Human cerebrospinal fluid
M.r.(1,2)	<i>Malassezia restricta</i> **	CBS7877	CBS collection
M. a.	<i>Malassezia anuralokei</i>	CLA42	Human ear canal
M.p.	<i>Malassezia pachydermatis</i>	CLA43	Dog ear canal

The strains were kept in skimmed milk at -80°C. To obtain fresh cultures, all strains were first grown on SDA (for *Candida*, *Nakaseomyces*, *Meyerozyma* and *Cryptococcus*) and MLNA (for the three *Malassezia* species). These two were considered as “standard media”. All isolates were incubated at 30°C (optimal temperature for *M. restricta*) for periods of 24 or 48 hours, until 28 days for *M. restricta*. Once growth was obtained, the macroscopic and microscopic morphology was checked and verified as the typical morphology of each microorganism. Additionally, the catalase test was used to assess the presence of *M. restricta* (catalase negative) and the avoidance of contamination from the other two *Malassezia* species (catalase positive) during the experimental procedure. The aspect of the growth of the isolates recovered on SDA and MLNA, was used to assess and semi-quantify the ability to grow on other lipidic media, comparing the macroscopic aspect of both plates and applying the following criterium: Value 0: similar growth to the one on standard medium; Value 0,5: better growth than on the standard medium; Value -0.5: scarce growth, less than on the standard medium; Value -1: no growth at all.

2.3. In vitro growth assays on different lipidic sources

2.3.1. Inoculum preparation. The inoculum of each isolate was prepared from fresh cultured cells that were suspended in sterile distilled water. Its concentration was adjusted by counting in a Neubauer chamber, and according to the McFarland scale and was of 10^6 UFC/mL. Incubation was performed at 30° C degrees in an air incubator (Heidolph Inkubator 1000).

2.3.2. Culture media used. Nine culture media with different lipidic content were assayed, including the standard media for lipophilic yeasts (Modified Leeming and Notman agar medium -MLNA) [28]. One new medium (NM1) was created substituting the glycerol monostearate (GME) by DPPC, and another 7 more media were designed, consisting of a common nutrient base (Base Medium plus glycerol - MBG) to which 7 different lipids were added separately: Glycerol Monostearate (GME), 4 Tween components (T20, T40, T60 and T80), purified DPPC (Sigma-Aldrich®) and pig surfactant extract (Curosurf®, Chiesi Laboratories). Table 2 shows the detailed composition of these media. SDA was used also as a culture medium, as mentioned above, as standard medium for non- lipophilic yeasts.

Table 2- Detailed composition of the culture media used for testing the ability of yeast to grow on different lipidic sources.

COMPOSITION OF MEDIA										
Components	MLNA	NM1	Tw20	Tw40	Tw60	Tw80	GME	DPPC	SURF	SDA
Peptone	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr
Bile salt	0.8 gr	0.8 gr	0.8 gr	0.8 gr	0.8 gr	0.8 gr	0.8 gr	0.8 gr	0.8 gr	
Glycerol	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	
Glucose	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr	1 gr
Yextract	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg	200 mg
Olive oil	2 mL	2 mL								
Glycerol monostearate	50 mg						50 mg			
Tween 20			1 mL							
Tween 40				1 mL						
Tween 60					500 µL					
Tween 80						500 µL				
DPPC		16,7 mg						16,7 mg		
Surfactant*									627 µL	
Destilled water	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL
Agar-agar	1,5 gr	1,5 gr	1,5 gr	1,5 gr	1,5 gr	1,5 gr	1,5 gr	1,5 gr	1,5 gr	1,5 gr

*Commercial surfactant (Curosurf). Concentration of surfactant in the vial 80mg/mL

2.3.3 Culture methods. For all the yeasts tested, three different culture methods were assayed and performed in triplicate: growth on surface of solid medium; growth in depth (dug wells) in solid medium, and growth in liquid medium in a microtiter plate.

- Growth on surface of solid medium:

Plates were prepared with each of the culture media described before and were divided into numbered sections. Each isolate was inoculated in its corresponding section by a 5 μ L drop of inoculum. The plates were left at rest and were incubated at 30^o C. Growth checked at 24 hours, 5 days, and every 3 days until 28.

- Deep growth in wells in solid medium

A new set of plates of the designed culture media was also divided into numbered sections. Wells of 3-5 mm depth were performed by a sterile punch of 5 mm of diameter in each of the sections. Each well was inoculated by 50 μ L of the yeast cells suspensions. They were left to stand at 30^oC and the results were read at 24 hours, 5 days, and every 3 days until 28.

- Growth in liquid media (microtiter plates)

Eight different liquid media were prepared with the components described for Tw20, Tw40, Tw60, Tw80, GME, DPPC, SURF and SDA, excluding the agar-agar in all of them (Table 2). After sterilization, the media were disposed in the columns of three 96-well microtiter plates. Each well was filled with 150 μ L of medium. Rows from A to I were inoculated by 50 μ L of yeast cell suspension and row H was kept sterile as contamination control. Three sets of two plates (A and B) were used to test all the strains distributed as follows: plate A: yeasts of the genus *Candida*, *Nakaseomyces*, *Meyerozyma* and *Cryptococcus*; and plate B: the tree species of *Malassezia* (for *M. restricta* two rows per plate were used). The growth of the strains was assessed by serial readings, starting at 24 hours for plate A, and every 3 days until 21 days for plate B, since the generation times of each of the species are different. The reading was facilitated by the addition of 2.5 μ L of a 5 μ g/mL of alamar blue solution (Resazurine. Sigma-Aldrich[®]) to the wells. Growth was indicated by a colour change from blue to red-pink [29].

3. Results

3.1. Growth on surface experiments:

Most of the tested yeasts developed on lipid-enriched media after their respective incubation periods. For non-pulmonary lipids such as tweens and GME, yeast mainly showed a similar growth than on the standard medium. Only *Malassezia pachydermatis* grew better on Tw40, Tw80 and GME, than on the standard medium (MLNA); and 3 negative cultures were obtained for *C. deneoformans* on Tw60 and for *M. restricta*. For pulmonary-lipid-enriched media (DPPC and surfactant), *Malassezia* species and *C. deneoformans* showed better growth than on the standard and *C. parapsilosis* showed similar one. Other species showed scarce growth or did not develop on these media such as *C. albicans*, *N. glabrata*, *C. neoformans*, and *C. deuterogattii*. *M. guilliermondii* and *C. deneoformans* did not grow on DPPC but on surfactant medium showed respectively similar or better growth than on the standard (Figure 1).

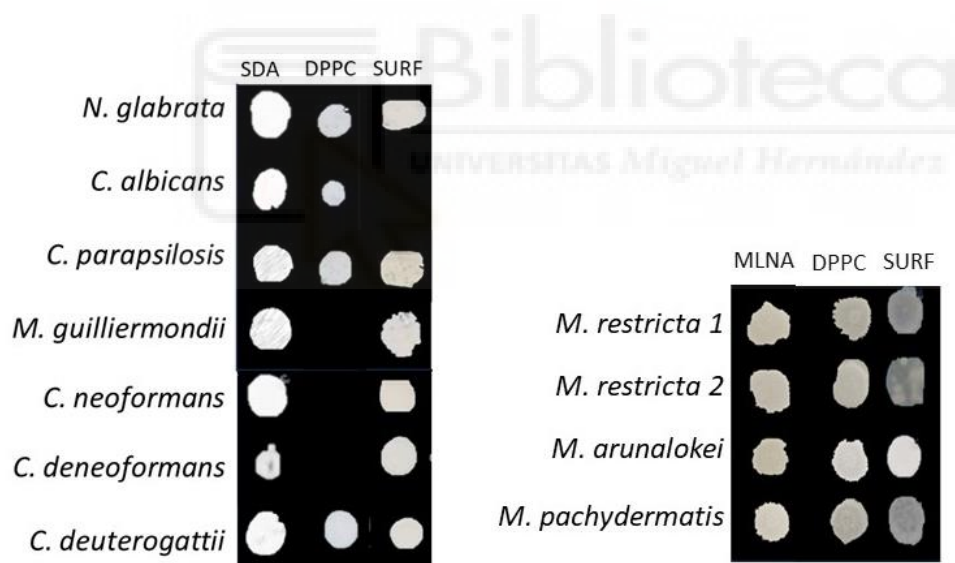


Fig 1. Growth of all isolates tested on the standard medium (SDA for non-lipo-dependent species and MLNA for *Malassezia* species) and on the media containing pulmonary lipids (DPPC and Surfactant –SURF-). The color of the background of the colonies has been eliminated and substituted by a black square by using the power point tool “remove background”.

The better development of *Malassezia* species on media with pulmonary lipids was also assessed with NM1 media, in which the GME was exchanged for DPPC (Figure 2).

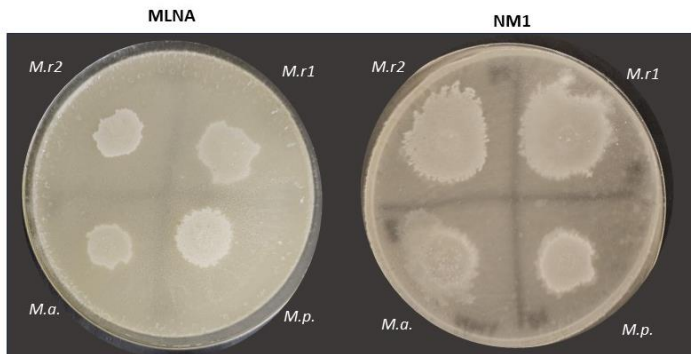


Fig 2. Growth of *Malassezia* species after 21 days in MLNA and NM1 (MLNA in which GME has been substituted by DPPC). *M.r.*: *M. restricta*, *M.a.*: *M. arunalokei* and *M.p.*: *M. pachydermatis*.

3.2.2. Growth in depth experiments:

The growth in depth in the lung-lipid-enriched media of *Malassezia* strains are shown in Figure 3. All isolates showed some growth around the wells been moderate even in those inoculated with *M. restricta*, in the DPPC medium. *M. pachydermatis* showed abundant growth in both media as well as *N. glabrata* and *C. deuterogattii* in the medium with surfactant. For non-pulmonary lipids, most of the results with tween compounds were very similar to the ones on surface experiments, although for the three *Malassezia* species, only the growth on Tw40 was reproducible in the three sets of experiments. The growth in wells on GME was also very variable for all strains tested (Table 3).

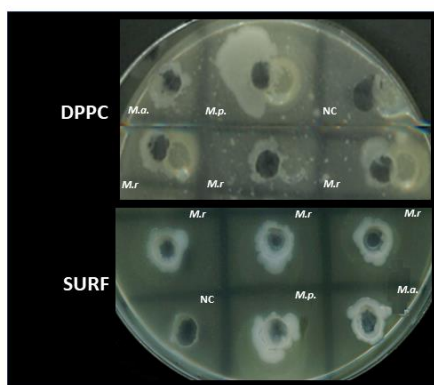


Fig 3. Growth of *Malassezia* isolates on media containing pulmonary lipids. Upper plate: medium with DPPC and lower plate: medium with commercial surfactant (Surf). *M.r.*: *Malassezia restricta* (triplicated inoculum); *M.p.*: *M. pachydermatis*; *M.a.*: *M. arunalokei*; NC: Negative Control.

3.2.3. Experiments in liquid (microtiter plates):

These experiments showed relatively good growth of *C. parapsilosis* in all the media tested, while *C. albicans* and *M. guilliermondii* had limited growth specially in pulmonary lipids compared to Sabouraud Dextrose Broth (SDB). For *Malassezia* isolates, their growth in liquid could only be read in one of the replicates and was very good for *M. restricta* in the two pulmonary lipids, and in all the Tweens for *M. pachydermatis*.

Experiments performed in the liquid media in microtiter plates yielded results that were not always reproducible due desiccation of the medium, especially when incubation periods were very long as in the case of plates with *Malassezia* species. Additionally, in some cases after long incubation the colour obtained by the reduction of resazurin was not in the normal scale (from blue-violet to light pink), what made the reading inaccurate. Therefore, we have considered only the results that maintained reproducibility in the three assays performed, such as the plates with *Candida* and related species.

Global results of all isolates in all media tested by the three methods are summarized in Table 3.

Table 3. Representation of the ability to grow of all isolates tested on different lipidic sources. Intensity of the colour represents the growth rate in comparison with the one showed on standard media (SDA and MLNA). DPPC: Dipalmytoil phosphatidylcholine; SURF: commercial pig surfactant (*Curosurf*[®]), S: surface, D: depth, L: liquid.

Comparing the ability to grow on non-pulmonary-lipids with the one on pulmonary-lipids, results show that some yeast can be inhibited by surfactant while others can be stimulated by its presence in the medium. Summarizing our results and representing the findings obtained on surface experiments (which were the most reproducible), only *C. deneoformans* developed better on surfactant, as well as *M. restricta* and *M. pachydermatis*. The three *Malassezia* species developed well on DPPC (Figure 4).

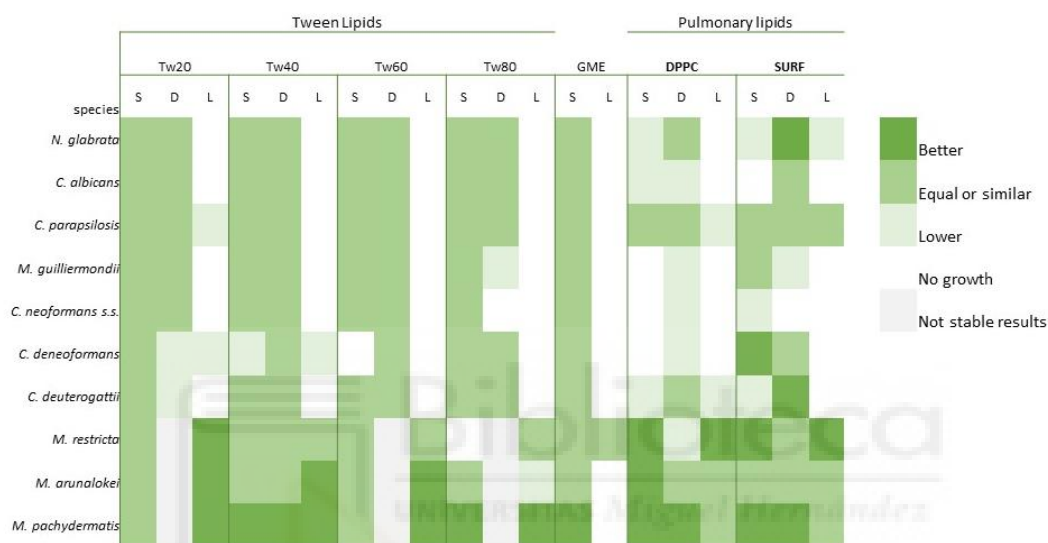


Fig 4. Representation of the ability to grow on pulmonary lipids of all isolates tested in comparison with their respective growth on standard media (SDA and MLNA), represented by the line at value 0. The value of growth on pulmonary lipids was assigned following a semi-quantitative method considering: 0,5: for strains growing better than the standard; 0: for growth equal or similar to the standard; minus 0.5 (-0.5): for lower growth than the standard and minus 1 (-1): when no growth was obtained. DPP: Dipalmytoil phosphatidylcholine; SURF: commercial pig surfactant (*Curosurf*[®]).

4. Discussion

This study constitutes a preliminary approach to the influence that pulmonary lipids may have in the composition of the LRT mycobiome. The most important finding reported here is the demonstration of the ability to grow on pulmonary lipids for yeasts species described as important members of the LRT, such as *Malassezia restricta* or *Candida parapsilosis*.

In our experiments with pulmonary lipids, this species provided larger colonies on media with DPPC and surfactant than in MLNA. This fact together with its high prevalence in lung mycobiome studies suggests that pulmonary lipids may probably be one of the most important factors determining the composition of the LRT mycobiome, and that the lung could be the natural habitat for this yeast species, as the skin and the ear canal are considered as the niche for *Malassezia furfur* and *M. globosa*, and the ear canal of dogs for *M. pachydermatis*. Other *Malassezia* species tested (*M. arunalokei* and *M. pachydermatis*), even though they also showed a good growth rate on pulmonary lipids, have only been occasionally detected in samples of the LRT by molecular methods [4].

The important presence of *M. restricta* in the respiratory tract deserves further study as this species has been recently related with the development of carcinomas of the digestive system, with special mention of pancreatic cancer [30]. This fungus also appears to be involved in the development of carcinoma of the uterine cervix, and its relationship with cutaneous carcinogenesis has also been proposed [31,32]. There are even some studies that try to link the mycobiome with non-small cell lung cancer, but for the moment the evidence is scarce [30,33-35].

For the other species tested, according to the growth rate obtained on solid and liquid media, *Candida parapsilosis* grow equally or better on media containing pulmonary lipids than on SDA. This yeast has been described as part of the nuclear mycobiome of BAL samples [4]. On the contrary, species such as *Candida albicans*, *Meyerozyma guilliermondii* and *Nakaseomyces glabrata*, which are important members of the oral mycobiota, showed less ability to develop on pulmonary lipids on which some of them always showed scarce or negative growth. Importantly, these yeasts are not considered as permanent members of the pulmonary mycobiome and had only been occasionally detected in the LRT [4-7].

For the species of the genus *Cryptococcus*, in general they showed a scarce development on lipids compared to their growth on SDA. Nevertheless, *C. deneoformans* showed some ability to develop on surfactant as well as *C. deuterogatii* that grew on pulmonary lipids in experiments performed by inoculation in wells. From 2015 seven species of *Cryptococcus* are included in the *C. neoformans* and *C. gattii* species complexes. *C. neoformans* sensu stricto and *C. deneoformans* in the first, and *C. gattii* sensu stricto, *C.*

deuterogattii, *C. tetragattii*, *C. bacillisporus* and *C. decagattii*, in the second [26]. Although *C. neoformans* has been reported as member of the lung mycobiome in several works, it is not possible to know to which specific members of the *Cryptococcus neoformans*–*Cryptococcus gattii* species complexes are these findings related to. The mycobiome studies are mainly performed by the sequence of the fungal ITS region which do not allow difference between members of these species' complexes. Therefore, when mycobiome studies report the presence of *C. neoformans*, it just means one of the members of these two complexes. The different behaviour detected in our experiments for the different species of the genus, should be further investigated to reveal whether there is any relationship between lipo-tolerance or lipoaffinity with yeast pathogenicity. In fact, although the species are well known to cause invasive pulmonary infections in humans, members of the *C. gattii* species complex seem to be more prone to invade the lungs, while *C. neoformans* species complex is lesser related with respiratory problems but an important invader of the central nervous system. There are also some differences in the pathogenesis of cryptococcosis between the two species complexes that could be related to their different tolerance or affinity for the pulmonary lipids. In this sense, the recent findings reported by Rossi, et al in an in vitro 2D organoid model of minilung are very interesting, as they demonstrate that *C. neoformans* s.s. induces the secretion of surfactant by pneumocytes and “uses” it as a way of opsonization that allows the yeast entering the cells [36]. This behaviour would be better related to the lipo-tolerance of these yeasts for surfactant than to the ability to use it as a nutrient. This aspect deserves further study, especially among the species of the pathogenic complexes of *Cryptococcus*.

The methods employed in the study were all based on culture at the same conditions of atmosphere and temperature, which were established mainly to favour the growth of *Malassezia restricta*. Therefore, the results obtained for some species may not correspond to its best development in the media employed. For this reason, the result of yeast growth with the different lipids was not always coincident in all methods. In general, surface growth showed the highest stability with good reproducibility of the results. Growth in liquid medium was the most difficult for the assessment of the results, this could be due to the fact that in a liquid medium, lipids act as a barrier and oxygen

does not get to the site properly. Culturing *Malassezia restricta* is frequently difficult and the growth of the yeast in specific lipidic media such as MLNA, takes long incubation periods and are not always successful.

Most of the yeasts studied showed lipo-tolerance or even lipophilicity, especially for the pulmonary lipids. However, apart from the genus *Malassezia*, none of them are currently considered as lipophilic. To our knowledge, there are no studies on lipophilicity for human lipids with any of these yeasts in major databases. This new finding could have important implications for future studies on the microbiome, as well as having implications for the possible pathogenic involvement of these yeasts in respiratory processes and how some of them use the lung as a gateway to produce distant infections.

5. Conclusions

The study shows that specific pulmonary surfactant lipids allow optimal development of *Malassezia restricta*, which is the most prevalent yeast in the lower airway according to previous mycobiome studies. This species seems to have its natural niche in the LRT of humans.

Pulmonary lipids may be the major determinant of the LRT mycobiome, as most of the species considered as nuclear mycobiome of this site, are able to develop on surfactant and DPPC, even though they are not considered as lipophilic yeasts.

References

- 1- Dickson RP. Approaches to sampling the respiratory microbiome. In: Huang YJ, Garantziotis S. The microbiome in respiratory diseases. Principles, tools and applications. 1st ed. Springer: 2021. pp. 3-19.
- 2- Huseyin CE, Rubio RC, O'Sullivan O, Cotter PD, Scanlan PD. The fungal frontier: a comparative analysis of methods used in the study of the human gut mycobiome. Front Microbiol. 2017;8:1432. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01432>

- 3- Gosens R, Hiemstra PS, Adock IM, Bracke KR, Dickson RP, Hansbro PM, Krauss-
Etschmann S, Smits HH, Stassen FRM, Bartel S. Host-microbe cross-talk in the lung
microenvironment: implications for understanding and treating chronic lung disease.
Eur Respir J. 2020;56(2):1902320. <https://doi.org/10.1183/13993003.02320-2019>
- 4- Rubio-Portillo E, Orts D, Llorca E, Fernández C, Antón J, Ferrer C, Gálvez B,
Esteban V, Revelles E, Pérez-Martín C, et al. The domestic environment and the lung
mycobiome. *Microorganisms.* 2020;8(11): 1717.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8111717>
- 5- Soret P, Vandenberghe LE, Francis F, Coron N, Enaud R, Avalos M, Schaefferbeke
T, Berger P, Fayon M, Thiebaut R, et al. Respiratory mycobiome and suggestion of inter-
kingdom network during acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *Sci Rep.*
2020;10(1):3589. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60015-4>
- 6- Bittinger K, Charlson ES, Loy E, Shirley DJ, Haas AR, Laughlin A, Yi Y, Wu GD, Lewis
JD, Frank I, et al. Improved characterization of medically relevant fungi in the human
respiratory tract using next-generation sequencing. *Genome Biol.* 2014;15(10):487.
<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0487-y>
- 7- Cui L, Morris A, Huang L, Beck JM, Twigg HL, Von Mutius E, Ghedin E. The
microbiome and the lung. *Ann Am Thorac Soc.* 2014;11(Suppl 4):S227-32.
<https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201402-052PL>
- 8- Mac Aogáin M, Chandrasekaran R, Lim AYH, Low TB, Tan GL, Hassan T, Ong TH,
Hui Qi Ng A, Bertrand D, Koh JY, et al. Immunological corollary of the pulmonary
mycobiome in bronchiectasis: the CAMEB study. *Eur Respir J.* 2018;52(1):1800766.
<https://doi.org/10.1183/13993003.00766-2018>
- 9- Willger SD, Grim SL, Dolben EL, Shipunova A, Hampton TH, Morrison HG, Filkins
LM, O'Toole GA, Moulton LA, Ashare A, et al. Characterization and quantification of the
fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis. *Microbiome*
2014; 2:40. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-40>
- 10- Zinter MS, Dvorak CC, Mayday MY, Iwanaga K, Ly NP, McGarry ME, Church GD,
Faricy LE, Rowan CM, Hume JR, et al. Pulmonary metagenomic sequencing suggests

missed infections in immunocompromised children. Clin. Infect. Dis. 2019; 68 (11): 1847–1855. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy802>

11- Neu AT, Allen EA, Roy K. Defining and quantifying the core microbiome: Challenges and prospects. Proc Natl Acad Sci USA. 2021;118(51):e2104429118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2104429118>

12- Belvoncikova P, Splichalova P, Videnska P, Gardlik R. The Human Mycobiome: Colonization, Composition and the Role in Health and Disease. J Fungi (Basel). 2022; 8(10): 1046. <https://doi.org/10.3390/jof8101046>

13- Martinsen EMH, Eagan TML, Leiten EO, Haaland I, Husebø GR, Knudsen KS, Drengenes C, Sanseverino W, Paytuví-Gallart A, Nielsen R. The pulmonary mycobiome— A study of subjects with and without chronic obstructive pulmonary disease. PLoS One. 2021; 16(4): e0248967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248967>

14- Zhao Y, Yi J, Xiang J, Jia W, Chen A, Chen L, Zheng L, Zhou W, Wu M, Yu Z, et al. Exploration of lung mycobiome in the patients with non-small-cell lung cancer. BMC Microbiol. 2023;23:81. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02790-4>

15- Midgley G. The lipophilic yeasts: state of the art and prospects. Med Mycol. 2000; 38(1): 9-16. <https://doi.org/10.1080/744118733>

16- Gholami M, Mokhtari F, Mohammadi R. Identification of *Malassezia* species using direct PCR- sequencing on clinical samples from patients with pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis. Curr Med Mycol. 2020;6(3):21-26. <https://doi.org/10.18502/cmm.6.3.3984>

17- Cabañes FJ. *Malassezia pachydermatis*: to be, or not to be lipid-dependent. Rev Iberoam Micol. 2020; 37(1): 3-4. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2019.10.003>

18- Tenagy, Tejima K, Chen X, Iwatani S, Kajiwara S. Long-chain acyl-CoA synthetase is associated with the growth of *Malassezia* spp. J Fungi (Basel). 2019; 5(4): 88. <https://doi.org/10.3390/jof5040088>

- 19- Agrawal V, Bhagwat AM, Sawant C. Sesame oil incorporated medium for isolation and enumeration of lipophilic yeasts. *IJPSR*. 2014; 5(7): 2972-79. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5\(7\).2972-79](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.5(7).2972-79)
- 20- Odds FC. Sabouraud('s) agar. *J Med Vet Mycol*. 1991;29(6):355-9. <https://doi.org/10.1080/02681219180000581>
- 21- Youngchim S, Nosanchuk JD, Pornsuwan S, Kajiwara S, Vanittanakom N. The role of L-DOPA on melanization and mycelial production in *Malassezia furfur*. *PLoS One*. 2013;8(6):e63764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063764>
- 22- Begum N, Lee S, Portlock TJ, Pellon A, Nasab SDS, Nielsen J, Uhlen M, Moyes DL, Shoaie S. Integrative functional analysis uncovers metabolic differences between *Candida* species. *Commun Biol*. 2022;5(1):1013. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03955-z>
- 23- Brown AJP, Brown GD, Netea MG, Gow NAR. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends Microbiol*. 2014;22(11):614-22. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.07.001>
- 24- Bernhard W. Lung surfactant: function and composition in the context of development and respiratory physiology. *Ann Anat*. 2016;208:146-150. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2016.08.003>
- 25- Han S, Mallampalli RK. The role of surfactant in lung disease and host defense against pulmonary infections. *Ann Am Thorac Soc*. 2015;12(5):765-774. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201411-507FR>
- 26- Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, Falk R, Parnmen S, Lumbsch HT, Boekhout T. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex, *Fungal Genet Biol*. 2015;78:16-48. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.009>
- 27- Kidd SE, Abdolrasouli A, Hagen F. Fungal nomenclature: managing change is the name of the game. *Open Forum Infect Dis*. 2023; 10(1): ofac559. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac559>

- 28- Far FE, Al-Obaidi MMJ, Desa MNM. Efficacy of modified Leeming-Notman media in a resazurin microtiter assay in the evaluation of in-vitro activity of fluconazole against *Malassezia furfur* ATCC 14521. *J Mycol Med.* 2018;28(3):486–491. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.04.007>
- 30- Aykut B, Pushalkar S, Chen R, Li Q, Abengozar R, Kim JI, Shadaloey SA, Wu D, Preiss P, Verma N, et al. The fungal mycobiome promotes pancreatic oncogenesis via activation of MBL. *Nature.* 2019; 574(7777): 264-267. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1608-2>
- 31- Gaitanis G, Velegraki A, Magiatis P, Pappas P, Bassukas ID. Could *Malassezia* yeasts be implicated in skin carcinogenesis through the production of aryl-hydrocarbon receptor ligands? *Med Hypotheses.* 2011;77(1):47-51. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.03.020>
- 32- Godoy-Vitorino F, Romaguera J, Zhao C, Vargas-Robles D, Ortiz-Morales G, Vázquez-Sánchez F, Sanchez-Vázquez M, de la Garza-Casillas M, Martinez-Ferrer M, White JR, et al. Cervicovaginal fungi and bacteria associated with cervical intraepithelial neoplasia and high-risk human papillomavirus infections in a Hispanic population. *Front Microbiol.* 2018;9:2533. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02533>
- 33- García-Castillo V, Sanhueza E, McNerney E, Onate SA, García A. Microbiota dysbiosis: a new piece in the understanding of the carcinogenesis puzzle. *J Med Microbiol.* 2016; 65(12): 1347-1362. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000371>
- 34- Chen J, Domingue JC, Sears CL. Microbiota dysbiosis in select human cancers: evidence of association and causality. *Semin Immunol.* 2017; 32: 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.08.001>
- 35- Zong Z, Zhou F, Zhang L. The fungal mycobiome: a new hallmark of cancer revealed by pan-cancer analyses. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8(1):50. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01334-6>
- 36- Rossi SA, García-Barbazan I, Chamorro-Herrero I, Taborda CP, Zaragoza O, Zambrano A. Use of 2D minilungs from human embryonic stem cells to study the

interaction of *Cryptococcus neoformans* with the respiratory tract. *Microbes Infect.*
2024;26(3): 105260. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2023>



ANEXO VII.

Alveolar macrophage expression differs according to lung cancer subtype

Authors: Violeta Esteban¹, Javier Javaloyes², Sebastián Martínez³, Jose Norberto Sancho-Chust¹, Consuelo Ferrer², Beatriz Gálvez⁴, Eusebi Chiner¹, María Francisca Colom²

Affiliations:

1. Department of Respiratory Medicine, San Juan de Alicante University Hospital, Alicante, Spain.
2. Department of Plant Production and Microbiology, Miguel Hernández University. Institute for Healthcare and Biomedical Research of Alicante (ISABIAL), Alicante, Spain.
3. Department of Clinical Medicine, Miguel Hernández University, San Juan de Alicante, Alicante, Spain.
4. Department of Respiratory Medicine, Vinalopó University Hospital, Alicante, Spain.

Contact details for correspondance: Violeta Esteban Ronda. Email: esteban_vio@gva.es

Postal adress: Department of Respiratory Medicine, San Juan de Alicante University Hospital, Ctra N-332, s/n, 03550 San Juan de Alicante, Alicante, Spain.

Funding

This work has received funding from two competitive grants from Fundación Española del Pulmón (*SEPAR*) and from Fundación de Neumología de la Comunidad Valenciana.

Conflicts of Interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

We are grateful to Javier Puentes, *laboratory technician*, for their help with sample processing and to Ana Pulido and Lía Maestre, bronchoscopy nurses, for their help in ensuring optimal sample collection.

To the Director,

With an estimated 2.2 million new cancer cases and 1.8 million deaths in 2020, lung cancer is the second most commonly diagnosed cancer and the leading cause of cancer death¹. According to the clinical histologic characteristics, lung cancer is mainly divided into small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC), which make up 85% of all cases². The common subtypes of NSCLC mainly include lung adenocarcinoma, lung squamous cell carcinoma and large cell carcinoma.

The role of the immune system in tumorigenesis has become increasingly appreciated, such that immune evasion is now considered one of the hallmarks of cancer³⁻⁵. Macrophages comprise the bulk of the immune infiltrate in tumors and are the key cell type that links inflammation and cancer⁶. They are extremely plastic cells capable of diverse functions, with their distinct phenotypes or subpopulations: M1 or classically activated macrophages and M2 or alternatively activated macrophages^{7,8}. Differentiation of M1 macrophages occur in the presence of Toll-like receptor activation in the presence of Th1 helper cytokines and is involved in the Th1 response to pathogens, they are excellent antigen-presenting cells resulting in immunostimulation and accelerate the activation of adaptative immune responses^{7,8}. In contrast, Th2 cytokines have been shown to induce M2 macrophage polarization and participate in the Th2 immune response. M2 macrophages are characterized by impaired ability to present antigen and function to scavenge debris and promote angiogenesis, tissue remodelling, and repair^{7,8}. Specifically in cancer, it is believed that M1 macrophages support initiation of tumorigenesis whereas M2 macrophages are typically associated with tumor progression^{7,8}. Here, we study the alveolar macrophage populations in bronchoalveolar lavage (BAL) samples from patients with different types of lung cancer.

From November 2021 to October 2022, we collected bronchoalveolar lavage samples from adults' patients with diagnostic of primary lung cancer (none of the patients had yet received treatment) and control subjects at the two hospitals. The control subjects were undergoing bronchoscopy to exclude endobronchial abnormality. Patients with active infection or immunosuppressed were excluded. BAL was performed at the time of diagnostic fibreoptic bronchoscopy using warm sterile 0.15 M NaCl instilled in 50 ml aliquots to a total volume of not greater than 150 ml. In patients with lung cancer,

lavage was performed in the bronchus closest to the tumor lesion. The endobronchial findings in all control subjects were normal, and in this group either the right middle lobe or the lingula lobe was lavaged. An aliquot of 10 mL of BAL was immediately processed for immunological study. A macrophage labelling protocol was followed, finally adding 200 μ L of fetal bovine serum with 5 μ L of each of the selected marker antibodies for flow cytometry (CD14 and CD86 for M1, CD206 and CD163 for M2). The files extracted from the cytometer reading were analyzed with FlowJo[®] software from BD Bioscience[®]. Sociodemographic data, smoking, final diagnosis, tumor stage, treatments received and survival were collected as covariates. Staging was performed using the current system of the 8th Edition of the TNM Classification of Lung Cancer⁹. Ethics committee approval of the two centres was received and informed consent of all participating subjects was obtained. All data analysis was performed using SPSS 24 (SPSS, IBM Corp).

We included 16 patients with lung cancer with a median age of 65 years and 4 patients with benign non-infectious pathology (3 with interstitial lung disease and with 1 tracheal stenosis) as the control group, with median age of 66 years. In the group of patients with lung cancer, the most frequent histologic subtype was adenocarcinoma (53.3%) and most of the cases were stage IV (86.6%). The main results of the enrolled patients are shown in Table 1. For the final data analysis, patient 10 was excluded from the study because he changes his place of residence and was lost to follow-up.

Table 1. Baseline characteristics of the patients included in the study. Med: median; IQR: interquartile range.

	Lung cancer (15)	Controls (4)	<i>p</i> value
Age (years), med (IQR)	65 (60-71)	66 (63-73)	0.802
Male, n (%)	7 (46.7%)	2 (50%)	0.990
Smoking status, n (%)			0.798
-Smokers	7 (46.7%)	1 (25%)	
-Former smoker	5 (33.3%)	2 (50%)	
-Non-smoker	3 (20%)	1 (25%)	
Median pack-year index, med (IQR)	35 (14-50)	30 (5-52)	0.960
M1 macrophages, med (IQR)	0.09 (0.04-0.47)	0.63 (0.12-1.42)	0.802
M2 macrophages, med (IQR)	1.61 (0.64-5.63)	0.32 (0.30-0.68)	0.009
Histologic subtype of lung cancer		-	
-Small cell lung carcinoma	4 (26.7%)		

-Adenocarcinoma	8 (53.3%)		
-Squamous cell lung carcinoma	3 (20%)		
Treatment, n (%)		-	
-Surgery	1 (6.7%)		
-Immunotherapy	9 (60%)		
-Chemotherapy	10 (66.7%)		
-Radiotherapy	5 (33.3%)		
-Only palliative care	3 (20%)		
-Others	1 (6.7%)		
	Osimertinib		
Survival at 6 months, n (%)	9 (60%)	4 (100%)	0.255

A higher percentage of M2 macrophage population was seen in patients with lung cancer: 1.61 (0.64-5.63) compared to patients with benign lung disease: 0.32 (0.30-0.68), $p=0.009$. When subanalysis by type of lung cancer was performed, a much higher M2/M1 ratio was obtained in patients with adenocarcinoma: 36.11 (18.43-94.60), 10.89 in squamous cell LC, and 2.41 (1.42-4.25) in SCLC, $p=0.005$. These results are shown in Fig. 1 and are due to significant differences in the M1 between the different types of lung cancer, much higher in SCLC 0.66 (0.27-4.40), squamous cell LC 0.47 (0.21-0.47) and adenocarcinoma 0.35 (0.11-0.72), $p=0.007$. No relationship was found between the patients' smoking habits and their inflammatory status ($p=0.13$).

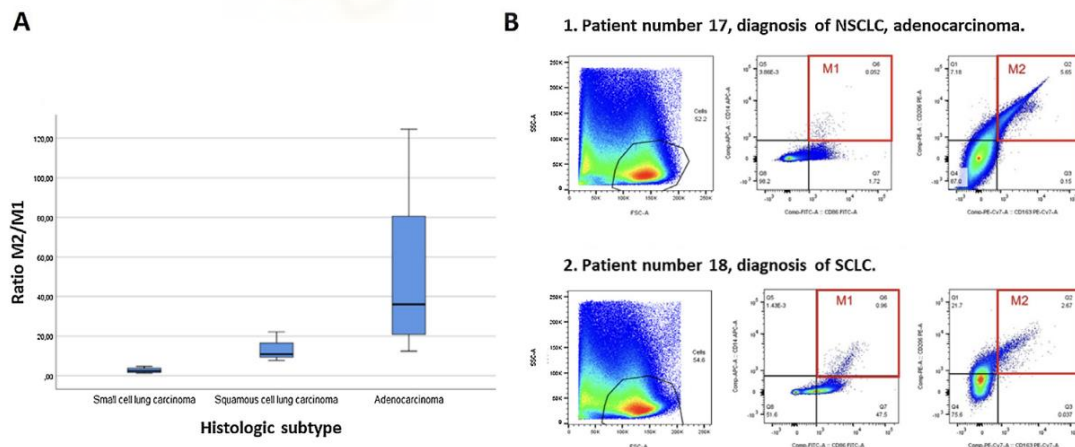


Fig 1. Characterization of alveolar macrophage populations. A) M2/M1 ratio according to definitive diagnosis. B) Different examples of flow cytometry of included patients: SCLC: small cell lung cancer, SSC: Side scatter channel, FSC: forward scatter channel.

Flow cytometry is the gold standard for phenotyping and quantifying the immune cells¹⁰. Previous studies have shown that increased tumor-associated macrophages (TAMs)

density correlates with a poor prognosis in lung cancer^{11,12}. Nowadays the notion that TAMs resemble M2 macrophages has been supported in vitro and in vivo⁷. TAMs produce cytokines and other proteins to maintain immunosuppression, and a strong correlation has been demonstrated between TAMs and chemotherapy resistance¹³, also M1 have shown to enhanced the sensitivity of lung cancer cell A549 to cisplatin and decreased the tube formation activity and cell viability of A549 cells¹⁴. Regarding our results, all samples from lung cancer patients had a higher percentage of M2 macrophages. This is expected as this macrophage subtype favors tumor progression. In a recent study made with 67 patients was found that M2 macrophages significantly increased in patients with SCLC, with simultaneously elevated IL-10, as compared to NSCLC patients¹⁵. Furthermore, the increased frequency of M2 and elevated level of IL-10 in BAL of SCLC patients were positively correlated with advanced tumor stage, but negatively correlated with their survival time¹⁵. We believe that the differences with our results may be due to an only use a specific marker to identify M2 macrophages (CD206), while we have used two (C206 and CD163) and no M1-specific markers are used.

BAL analysis is a promising approach to evaluating the tumor microenvironment. Targeting this tumor-associated macrophages may be at the forefront of lung cancer research and it could be in the future a new treatment strategy¹⁶⁻¹⁸. In fact, an article published in 2018 demonstrated that M1NV-R848 injection can repolarize M2 TAMs to M1 and potentiate antitumor efficacy of the PD-1 checkpoint inhibitor therapy in bladder cancer¹⁹. In our findings, we can see that in patients with SCLC in addition to having high M2 macrophages, they also have high M1, thus making their M2/M1 ratio significantly lower compared to other types of lung cancer. We don't know if this could be related to its different neuroendocrine cell origin and aggressiveness, or if it could influence its central parahiliar or paramediastinal location (90%), causing atelectasis and retention of secretions distally. Some study limitations should be acknowledged. We have a small sample size ant the control subjects used are not completely healthy. The reliability of the findings and its implications should be confirmed in a larger cohort and over a longer timeframe. In conclusion, the immunological study has corroborated the preponderance of M2 macrophages in patients with lung cancer. Subanalysis of the data

shows that alveolar macrophage expression differs by lung cancer subtype, before receiving any oncological treatment.

References

- 1- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. 2021. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- 2- Xu F, Wei Y, Tang Z, Liu B, Dong J. Tumor-associated macrophages in lung cancer: friend or foe? (review). *Mol Med Rep*. 2020;22(5):4107-4115. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11518>
- 3- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- 4- Muenst S, Läubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *J Intern Med*. 2016;279(6):541-62. <https://doi.org/10.1111/joim.12470>
- 5- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2022;3(11):991-8. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- 6- Conway EM, Pikor LA, Kung SHY, Hamilton MJ, Lam S, Lam WL, et al. Macrophages, inflammation and lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016;193(2):116-30. <https://doi.org/10.1164/rccm.201508-1545CI>
- 7- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002; 23 (11): 549-555. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(02\)02302-5](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)02302-5)
- 8- Almatroodi SA, McDonald CF, Pouniotis DS. Alveolar macrophage polarisation in lung cancer. *Lung Cancer Int*. 2014; 2014: 721087. <https://doi.org/10.1155/2014/721087>

- 9- Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2016; 11(1): 39-51. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2015.09.009>
- 10- Herzenberg LA, Tung J, Moore WA, Herzenberg LA, Parks DR. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat Immunol*. 2006;7(7): 681-5. <https://doi.org/10.1038/ni0706-681>
- 11- Pouniotis DS, Plebanski M, Apostolopoulos V, McDonald CF. Alveolar macrophage function is altered in patients with lung cancer. *Clin Exp Immunol*. 2006;143(2): 363-372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.02998.x>
- 12- Cao L, Che X, Qiu X, Li Z, Yang B, Wang S, et al. M2 macrophage infiltration into tumor islets leads to poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *Cancer Manag Res*. 2019;11:6125-6138. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S199832>
- 13- Hughes R, Qian BZ, Rowan C, Muthana M, Keklikoglou I, Olson OC, et al. Perivascular M2 macrophages stimulate tumor relapse after chemotherapy. *Cancer Res*. 2015;75(17): 3479-3491. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3587>
- 14- Yuan A, Jing-Hsiao Y, Chen HY, Chen HW, Ho CC, Chen YY, et al. Opposite effects of M1 and M2 macrophage subtypes on lung cancer progression. *Sci Rep*. 2015;5:14273. <https://doi.org/10.1038/srep14273>
- 15- Hu X, Gu Y, Zhao S, Hua S, Jiang Y. Increased IL-10+CD206+CD14+M2-like macrophages in alveolar lavage fluid of patients with small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(12):2547-2560. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02639-z>
- 16- Hu Q, Wu G, Wang R, Ma H, Zhang Z, Xue Q. Cutting edges and therapeutic opportunities on tumor-associated macrophages in lung cancer. *Front Immunol*. 2022;13: 1007812. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1007812>
- 17- Ma H, Zhang Z, Hu Q, Chen H, Wu G, Zhou Y, et al. Shedding light on macrophage immunotherapy in lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023; 149(10):8143-8152. <https://doi.org/10.1007/s00432-023-04740-z>

18- Rocha P, Arriola E. Immunotherapy is here to stay: a new treatment paradigm in lung cancer. Arch Bronconeumol. 2019; 55(3): 124-125. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2018.08.012>

19- Choo YW, Kang M, Kim HY, Han J, Kang S, Lee JR, et al. M1 macrophage-derived nanovesicles potentiate the anticancer efficacy of immune checkpoint inhibitor. ACS Nano. 2018; 12(9): 8977-8993. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b02446>



IX. AGRADECIMIENTOS





AGRADECIMIENTOS

Querría dar las gracias en primer lugar a mis directoras de la tesis, las Dras. María Francisca Colom y Consuelo Ferrer, por haberme abierto vuestro laboratorio, por todo lo que me habéis enseñado durante estos años de trabajo, por vuestra constancia y paciencia. También al Dr. Luis Hernández, mi tutor en el programa de doctorado.

Gracias también a mis padres, por haberme ofrecido un entorno privilegiado que me ha permitido estudiar y trabajar en lo que me apasiona. Gracias por vuestro apoyo constante.

A mi pareja, Nacho Boira, por haber creído en mí y haberme ayudado a superar diferentes dificultades que he encontrado en el camino.

Me gustaría también dar las gracias al servicio de Neumología del Hospital Universitari Sant Joan d'Alacant, en especial a mi jefe Eusebi Chiner y a dos de mis compañeros. A mi jefe quiero darle las gracias por su orientación y estímulo, has sido fundamental en mi crecimiento personal. A mi compañero José Norberto Sancho, broncoscopista del servicio, por haberme ayudado a conseguir la mayor parte de las muestras del presente trabajo a pesar de la presión asistencial. A mi compañera Cristina Senent, por haberme animado durante todos estos años y haberme cambiado días de consulta cuando lo he necesitado para poder asistir a actividades relacionadas con el programa de doctorado.

Agradecer también la ayuda y colaboración de mis compañeros en el laboratorio de Micología Médica de la UMH: Beatriz Gálvez, Javier Puentes, Noelia Sánchez y Miguel Valverde. Sin vosotros este trabajo no habría sido posible.

Por último y de forma muy especial, gracias a los pacientes por su participación en este proyecto, ya que este trabajo es por y para ellos.