



**UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA  
“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”**

**DETERMINACIÓN IN SILICO DE LA PRESENCIA DE ADN DE  
*STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* EN ADN GENÓMICO DE TEJIDO  
CANCEROSO DE PULMÓN**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL GRADO DE BACHILLER  
EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA**

**AUTORES:**

**KAREN YSABEL LOPEZ DONGO**

**ARANXA LENY ILDEFONSO RAYMUNDO**

**ASESOR:**

**CLAUDIA INES GLORIA MACHICADO RIVERO**

**LIMA, PERÚ**

**2024**

---

## Determinación in silico de la presencia de ADN de Streptococcus pneumoniae en ADN genómico de tejido canceroso de pulmón

---

### INFORME DE ORIGINALIDAD

---

<b>9</b> %	<b>9</b> %	<b>2</b> %	<b>1</b> %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

---

### FUENTES PRIMARIAS

---

<b>1</b>	<b>doku.pub</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>2</b>	<b>pesquisa.bvsalud.org</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>3</b>	<b>repositorio.upch.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>4</b>	<b>www.cancerquest.org</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>5</b>	<b>www.jove.com</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>6</b>	<b>ri-ng.uaq.mx</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>7</b>	<b>lookformedical.com</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>8</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %

---

## ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>ESTADO DEL ARTE.....</b>	<b>3</b>
1. Epidemiología del cáncer de pulmón.....	3
2. Aspectos moleculares del cáncer pulmonar .....	4
3. Streptococcus pneumoniae y cáncer de pulmón .....	5
4. Inserción de ADN bacteriano como mecanismo de inestabilidad genética en la carcinogénesis .....	7
5. Bioinformática para la determinación de inserciones de ADN bacteriano en células cancerosas y su posible rol en la carcinogénesis .....	11
<b>PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>17</b>

## RESUMEN

*Streptococcus pneumoniae* es una bacteria Gram positiva presente en la nasofaringe, que puede causar neumonía y otras infecciones respiratorias. Diversos estudios sugieren su relación con el cáncer pulmonar; sin embargo, se desconoce si es promotora de la carcinogénesis pulmonar o si está asociada al microambiente tumoral. La interacción de la proteína PscC de *S. pneumoniae* con el receptor PAFR, en las células epiteliales del tracto respiratorio, activa vías de señalización que despliegan la respuesta inflamatoria, la cual contribuye a la carcinogénesis pulmonar. Además, su presencia in situ en muestras de tejido de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) ha sido demostrada, a través de ddPCR. El interés por averiguar si *S. pneumoniae* es un agente etiológico del cáncer pulmonar ha llevado a investigar los mecanismos subyacentes de la infección asociados con la promoción de la carcinogénesis.

Mecanismos plausibles involucrarían la inserción directa del ADN de *S. pneumoniae* en el genoma humano, lo cual causaría inestabilidad genómica, una condición que antecede al cáncer. Esto solo ha sido investigado en *Mycobacterium tuberculosis*, otra bacteria intracelular ampliamente asociada al cáncer pulmonar. De hecho, se ha identificado la presencia de un transposón de *M. tuberculosis* en el genoma de células neoplásicas de pacientes con NSCLC. Dicha inserción provoca la interrupción de un proto-oncogén, lo cual provoca su activación a la versión oncogénica, con la consecuente activación de la carcinogénesis. *S. pneumoniae* al igual que *M. tuberculosis*, es una bacteria intracelular, la cual utiliza endocitosis para evadir la respuesta inmune. Este mecanismo podría terminar en una integración del ADN en células cancerosas. En el presente proyecto,

proponemos determinar si existe ADN de *S. pneumoniae* integrado en el ADN de células de cáncer de pulmón, utilizando herramientas bioinformáticas y bases de datos de genomas de pacientes con dicha neoplasia.

Palabras clave: *Streptococcus pneumoniae*, ADN bacteriano, Inserción, Cáncer pulmonar.

## **ABSTRACT**

*Streptococcus pneumoniae* is a Gram positive bacteria present in the nasopharynx, which can cause pneumonia and other respiratory infections. Several studies suggest its association with lung cancer; however, it is unknown whether it promotes lung carcinogenesis or is associated with the tumor microenvironment. The interaction of the PscC protein of *S. pneumoniae* with the PAFR receptor, in the epithelial cells of the respiratory tract, activates signaling pathways that unleash the inflammatory response, which contributes to lung carcinogenesis. In addition, their presence in situ in non-small cell lung cancer tissue (NSCLC) samples has been demonstrated, through ddPCR. Interest in finding out whether *S. pneumoniae* is an etiological agent of lung cancer has led to research into the underlying mechanisms of infection associated with the promotion of carcinogenesis.

Plausible mechanisms would involve direct insertion of *S. pneumoniae* DNA into the human genome, which would cause genomic instability, a condition that precedes cancer. This has only been investigated in *Mycobacterium tuberculosis*, another intracellular bacteria widely associated with lung cancer. In fact, the presence of a transposon of *M. tuberculosis* in the genome of neoplastic cells of patients with NSCLC has been

identified. Such insertion causes the interruption of a proto-oncogene, which causes its activation to the oncogenic version, with the consequent activation of carcinogenesis. *S. pneumoniae* like *M. tuberculosis*, is an intracellular bacterium, which uses endocytosis to evade the immune response. This mechanism could end up in DNA integration into cancer cells. In this project, we propose to determine whether there is *S. pneumoniae* DNA integrated into the DNA of lung cancer cells, using bioinformatics tools and genome databases of patients with this neoplasia.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, bacterial DNA, Insertion, Lung cancer.

## **ESTADO DEL ARTE**

### 1. Epidemiología del cáncer de pulmón

El cáncer al pulmón se ha posicionado en los últimos años como la principal causa de muerte por cáncer, tanto para hombres como para mujeres. Este se clasifica según la célula de origen en cáncer al pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer al pulmón de células no pequeñas (NSCLC). El tipo de cáncer más común es el adenocarcinoma, el cual está dentro de la categoría de NSCLC (1).

Según datos del GLOBOCAN, en el 2018 la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón, a nivel global, fue 4.5 veces mayor que en el 2012 (2). Para el año 2020, las estadísticas no variaron mucho, el 14% de los casos nuevos eran de cáncer al pulmón y representaba el 18% de muertes por cáncer (3). En nuestro país, el cáncer al pulmón se encuentra en el séptimo puesto de incidencia y en el segundo en mortalidad (4).

Debido a estas cifras, se ha venido realizando diferentes investigaciones sobre la etiología de este cáncer. Los diversos factores que contribuyen a un mayor riesgo de desarrollar cáncer al pulmón se dividen en factores no modificables y modificables (1). Entre los

factores no modificables se encuentran la edad, el sexo, la raza y el nivel socioeconómico (1). Por otro lado, entre los factores modificables se encuentra el hábito de fumar tabaco, que causa hasta el 90% de los casos de cáncer al pulmón. Otro factor modificable es el humo de tabaco ambiental, el cual se atribuye al 17% del cáncer al pulmón en no fumadores. Además, la obesidad presenta un riesgo relativo de cáncer de pulmón de 0.77 (2).

Asimismo, tener antecedentes de infecciones o enfermedades pulmonares es uno de los factores modificables más importantes. Así, se ha observado un aumento del riesgo de padecer cáncer pulmonar ante diagnósticos previos de tuberculosis, neumonía y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (2,5). Por ejemplo, pacientes con tuberculosis o neumonía previas a desarrollar EPOC, presentaron un aumento del riesgo de desarrollar cáncer pulmonar. (2).

## 2. Aspectos moleculares del cáncer pulmonar

El desarrollo de la carcinogénesis pulmonar surge de la continua acumulación de diferentes mutaciones que afectan la estabilidad genética. Estas alteraciones se dirigen hacia las vías de señalización oncogénica, activando oncogenes o inactivando genes supresores de tumores (6).

Uno de los componentes de las vías de señalización oncogénica son los protooncogenes, los cuales regulan el crecimiento de las células, controlando la diferenciación y proliferación celular. Las alteraciones en el cáncer que afectan a este grupo de genes generan la activación permanente de protooncogenes en oncogenes, lo cual impulsa a una multiplicación celular así como a reducir la apoptosis, entre otros efectos. En cuanto a los genes supresores de tumores, estos cumplen un rol fundamental al regular negativamente el crecimiento celular y controlan la reparación del daño en el ADN. Las

mutaciones en cáncer causan pérdida de esta función, desencadenando la proliferación anormal de células que acumulan mutaciones en su ADN, lo que caracteriza a las células tumorales (6,7).

Por otro lado, las células cancerosas de pulmón suelen tener oncogenes activos codificantes de proteínas promotoras del crecimiento como HER2, MET y KRAS (8,6). Por ejemplo, las transversiones de G a T y G a A son las mutaciones más comunes que activan el protooncogen KRAS. La alteración de este gen generaría el descontrol de las vías de señalización que promueven el crecimiento. En cuanto a HER2, las mutaciones activadoras son las inserciones de 3 a 12 pares de bases de longitud en regiones exónicas. Finalmente, MET se altera en consecuencia a la amplificación del gen, lo cual genera una sobreexpresión de la proteína y de la vía PI3K/ AKT, estimuladora del crecimiento celular (6).

### 3. *Streptococcus pneumoniae* y cáncer de pulmón

*S. pneumoniae* es un patógeno predominante del tracto respiratorio humano que puede generar diferentes enfermedades como la neumonía, meningitis y sepsis (8). Este neumococo ha sido considerado en su mayoría como un patógeno extracelular, no obstante se han evidenciado diferentes mecanismos que confirman su capacidad de establecer nichos intracelulares para la invasión a células huésped y evasión de respuestas inmunológicas. El proceso de colonización inicia con la propagación de la bacteria desde la nasofaringe en tracto superior, hacia zonas aéreo alveolares en los pulmones para el desarrollo de la enfermedad.

En este proceso, los factores de virulencia son muy importantes en una colonización efectiva pues la variada expresión de estos ayudan a la supervivencia intracelular de la bacteria. Así, la toxina neumocócica PLY conforma un mecanismo importante para *S.*



*pneumoniae*, ya que mediante su unión a MRC-1 (receptor del huésped) en macrófagos alveolares y células dendríticas de los pulmones, promueve la colonización, propagación y supervivencia intracelular. Un ejemplo de ello es la evasión de la degradación de la bacteria por lisosomas ácidos, debido a su internalización en vacuolas recubiertas con MRC-1 (9). Un mecanismo diferente al mencionado, es el de la endocitosis neumocócica mediada por la interacción entre la proteína C de superficie neumocócica (PspC, factor de virulencia) y el receptor de inmunoglobulina polimérica (pIgR, huésped), que junto a la activación de algunas vías de señalización, conducen a la internalización de *S. pneumoniae* en células epiteliales (10).

Como se mencionó anteriormente, la neumonía es una de las infecciones respiratorias que puede ser causada por este microorganismo y una afección previa de esta podría tener implicancias en el aumento del riesgo de cáncer de pulmón. Como es mencionado en el estudio de Brenner y colaboradores (11), se demostró que sí existe una asociación significativa entre ambas enfermedades (OR=2.2). En otro estudio (5) se confirmó esto mediante la evaluación de los riesgos relativos, y se afirmó que un diagnóstico de neumonía se asocia con un mayor riesgo de ser diagnosticado con cáncer. Puntualmente, en el cáncer pulmonar se presentó un riesgo relativo 8 veces mayor durante el seguimiento de 1 a menos de 6 meses después de ser diagnosticado de neumonía. También se ha encontrado una asociación entre la neumonía y la neoplasia maligna pulmonar en un metanálisis de 73 estudios de Ang y colaboradores (12), en la cual la correlación es positiva y significativa entre los estudios de casos y controles.

Por otro lado, la creciente asociación entre *S. pneumoniae* y la carcinogénesis pulmonar se justifica a partir de los diferentes mecanismos moleculares desencadenados por la bacteria que han demostrado un aumento de la proliferación y migración celular en diversos estudios. En uno de ellos, se observó que el mecanismo de unión entre PspC

(proteína neumocócica) y PAFR (receptor del factor activador de plaquetas) en células de cáncer de pulmón, regula positivamente la estimulación de las vías PI3K/ AKT y NF-kB, las cuales tienen un rol promotor de respuestas inflamatorias y proliferación celular que contribuyen en el desarrollo de cáncer pulmonar (13).

Un estudio más específico en el que se evidenció la capacidad de *S. pneumoniae* de promover la migración e invasión de células, se obtuvo a partir de la infección de células epiteliales de carcinoma pulmonar (A549). Partiendo de que la expresión de DDIT4 promueve la migración celular mediante la regulación de las vías de señalización mTORC2/AKT, se observó a partir de un análisis de qPCR la expresión de DDIT4 en las células A549 infectadas y se concluyó su regulación positiva debido a la infección por *S. pneumoniae* (14).

La evidencia apunta a una asociación real entre el cáncer pulmonar y *S. pneumoniae*, la cual se reafirma en el estudio de Zhou y colaboradores (15), donde se encontró una mayor abundancia de copias de ADN de diferentes bacterias, entre ellas Streptococcus, en tejidos canceroso de pulmón, en comparación con tejidos normales (sin neoplasia).

#### 4. Inserción de ADN bacteriano como mecanismo de inestabilidad genética en la carcinogénesis

Se ha venido estudiando los mecanismos moleculares por los cuales diferentes bacterias pueden promover la carcinogénesis en el huésped. Hace algunos años, el interés por la inserción de ADN bacteriano como mecanismo plausible de carcinogénesis ha aumentado. Existen diversos mecanismos potenciales de incorporación del ADN bacteriano en el ADN humano, siendo uno de ellos mediado por la liberación de ADN bacteriano. Las bacterias pueden liberar ADN a través de sistemas de secreción, cápsulas de membrana o autólisis, proceso denominado transferencia lateral de genes (16). Estos

genes transferidos pueden ingresar a las células eucariotas a través de la membrana plasmática y, posteriormente, ingresar al núcleo de la célula. Su ingreso al núcleo se debe a que el material genético bacteriano es relativamente pequeño. Este proceso se ha demostrado con *Bartonella henselae*, la cual puede transferir su plásmido críptico a células humanas endoteliales a través de un sistema de secreción tipo 4 T4SS VirB/VirD4 (16).

Por su parte, *S. pneumoniae* promueve la liberación de ADN a través de la autolisina LytA. Esta proteína degrada el peptidoglicano de las paredes celulares de la bacteria y desencadena la lisis bacteriana en condiciones de crecimiento estacionarias, lo que provoca la fuga de contenidos citoplasmáticos de neumococo, incluidos la toxina formadora de poros neumolisina (Ply) y ADN (17). *S. pneumoniae* invade a la célula epitelial pulmonar intracelularmente a través de procesos endocíticos mediados por dinamina (10). Debido a esta internalización, el ADN se acumula en el citoplasma de la célula hospedera y con ello aumenta la probabilidad de insertar su ADN en el genoma de las células eucariotas, lo cual tendría un papel activo en la transformación celular (18). Por lo tanto, estas inserciones de ADN bacteriano en ADN eucariota pueden llegar a generar inestabilidad genómica, es decir, la acumulación de mutaciones que alteran el genoma de la célula y que superan las capacidades de corrección de daño en el material genético por parte de la célula eucariota. Finalmente, la inestabilidad genómica por inserción de ADN bacteriano puede comprometer regiones cromosómicas grandes que afecten protooncogenes y genes supresores de tumor, con la consecuente promoción de la carcinogénesis.

Por otro lado, a través de estudios bioinformáticos se ha demostrado que existe una gran cantidad de inserciones de genes bacterianos en células somáticas a través de la transferencia lateral de genes (19,20). Utilizando secuenciamiento de siguiente

generación (NGS), se pudo examinar secuencias disponibles en una base de datos pública denominada The Cancer Genome Atlas (TCGA) para determinar inserciones en el genoma de células somáticas y células tumorales. Se examinaron bases de datos de 10 tipos de cáncer, en donde se encontraron integraciones de porciones de ADN bacteriano 210 veces más frecuentes en muestras tumorales que en muestras normales (19). Asimismo, se investigaron inserciones por transferencia lateral de genes en muestras de paciente con leucemia linfocítica crónica, con secuenciamiento de ARN de 45 pacientes y 9 sujetos sanos (19). Al igual que el estudio de Riley y colaboradores (19), las muestras con cáncer presentaron inserciones con mayor frecuencia que las muestras normales. La integración fue de más del doble. Además, las muestras normales presentaron una alta tasa en células B de memoria (20).

A pesar de esos hallazgos, se sabe que la integración de ADN bacteriano ocurre en tasas muy bajas, debido a que este es reconocido por sensores de ADN de la célula del hospedero, lo cual activa la respuesta inmune innata (17). Además, el sistema de reparación del ADN de las células somáticas se encarga de prevenir estas mutaciones al corregir estas alteraciones (21). En cambio, las células cancerosas se caracterizan por tener una regulación negativa de las vías de reparación del ADN y tener mutaciones en genes supresores de tumores. Esto ocasionaría que las células tumorales que proliferan rápidamente puedan ser más permisivas para el LGT de las bacterias (19).

Dentro del grupo de bacterias que están siendo investigadas en cuanto a su asociación con el cáncer, está *M. tuberculosis*, la cual se relaciona con un aumento del riesgo de desarrollar cáncer pulmonar. Diversos estudios han comprobado el mayor riesgo de carcinogénesis en pacientes que han tenido tuberculosis previa, llegando a ser incluso de 9.7 veces mayor que en sujetos que no tuvieron tuberculosis (18). El aumento del riesgo se debe a que *M. tuberculosis*, al momento de invadir al huésped, genera diferentes

reacciones en cadena que promueven la carcinogénesis. Entre dichos eventos, después de invadir, *M. tuberculosis* induce la producción de TNF, IFN- $\gamma$  e interleucinas en el huésped. El TNF y la IL-6 estimulan la activación de genes que previenen la apoptosis mediante la activación de la vía del factor de transcripción nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) en las células del revestimiento pulmonar, lo que contribuye al proceso de formación del cáncer (22). Además de la producción de TNF e interleucinas, se ha encontrado una sobreexpresión del gen MKI67, tanto en muestras con tuberculosis pulmonar como de adenocarcinoma pulmonar. El gen MKI67 es un mediador clave de la proliferación, migración e invasión de células tumorales (23). La expresión compartida de este mediador proporciona probables mecanismos moleculares que vinculan la infección por tuberculosis y el adenocarcinoma pulmonar.

Además de los mecanismos moleculares mencionados anteriormente, un mecanismo plausible de promoción del cáncer por *M. tuberculosis* es la inserción de su ADN en el genoma de las células epiteliales pulmonares que podría promover su transformación. De hecho, a través de estudios bioinformáticos se determinó la inserción de material genético de *Mycobacterium* y otros géneros en muestras de NSCLC (19,24). No obstante, *M. tuberculosis* es la única bacteria, hasta el momento, de la cual se ha confirmado la inserción de su ADN en el núcleo de células cancerosas de pulmón. Así, un estudio reciente ha demostrado la inserción del transposón IS6110 MTb en tejido de NSCLC (24). Primero, se demostró la presencia de este transposón utilizando end-point PCR, donde el 40.9% de las muestras dieron positivo en la prueba de PCR. Luego, se realizó un RT-PCR in situ en muestras de tejido canceroso, resultando algunas de ellas con un señal positiva para ADN de micobacterias (IS-6110) en el área del núcleo de las células tumorales (24). Este transposón podría tener un rol causal en el cáncer, ya que provoca la interrupción de un proto-oncogén. Las interrupciones acumuladas promueven mutaciones que pueden

llegar a activar este proto-oncogen y convertirlo en un oncogen. Sin embargo, aún se necesita investigar el impacto de estas inserciones en la carcinogénesis.

##### 5. Bioinformática para la determinación de inserciones de ADN bacteriano en células cancerosas y su posible rol en la carcinogénesis

Para poder determinar las inserciones de material genético en el ADN de células cancerosas, se han utilizado diferentes programas bioinformáticos y diferentes algoritmos. En el estudio de Riley (19), se elaboró un proceso para identificar rápidamente estas transferencias laterales de genes (LGT) en *Wolbachia* y sus huéspedes mediante el uso de NUCMER. Esta es una herramienta para alineamiento de secuencias, desarrollada para comparar fragmentos grandes de ADN o genomas completos. Posteriormente, se utilizó BLASTN para validar estas LGT. Realizando este procedimiento pudieron encontrar evidencias de esta transferencia entre el endosimbionte y el cromosoma del huésped.

Este mismo procedimiento fue utilizado con un secuenciamiento de próxima generación para determinar LGT de bases de datos de muestras cancerosas. Para esto, realizaron una canalización para identificar secuencias paired-end con Illumina (19). Utilizaron bases de datos como el TCGA y The 1000 Genomes Project. Se realizó el mismo procedimiento mencionado anteriormente; sin embargo, se agregó un filtrado utilizando la herramienta Burrows-Wheeler Aligner (BWA), diseñada para alinear con gran eficiencia secuencias de consulta cortas con genomas de referencia mucho más largos (19). Luego de que BWA identifica los emparejamientos que respaldan las integraciones del ADN bacteriano en las muestras, se realiza un alineamiento con BLASTN para validar cada lectura.

En dicho estudio, se barrieron 3,15 mil millones de pares de lectura de Illumina del Proyecto 1000 Genomas. De estos, 191 pares de lectura respaldaron la integración bacteriana en el genoma humano somático después de la validación de BLASTN (19). La tasa de integración es baja; sin embargo, según el lugar en donde se inserten pueden llegar a ocasionar una desestabilización del ADN si el sitio de integración afecta ya sea a los proto-oncogenes, activándolos, o a los genes supresores de tumores, inactivándolos.

Este mismo procedimiento fue utilizado por Akimova y colaboradores (20). En su estudio, se utilizaron secuencias de células B de 45 pacientes con leucemia linfocítica crónica y 9 secuencias de células B de pacientes sanos. Se realizó un secuenciamiento paired-end RNA y se utilizó BWA para el alineamiento de las secuencias y determinar las integraciones de ADN bacteriano. Como resultado, 36% de las integraciones ocurrieron en regiones intrónicas; 22%, en regiones exónicas; y 17%, en UTR 3'. Además, se evaluó la asociación entre LGT y pronósticos clínicamente relevantes como aberraciones cromosómicas (20). Sin embargo, no se encontró una asociación robusta entre estos.

La bioinformática es útil para detectar de manera rápida la integración de ADN bacteriano en el genoma de células cancerosas a partir de una base de datos. Asimismo, se puede determinar el lugar de estas integraciones y estudiar su efecto en la inestabilidad genómica. Para complementar estos resultados, se deben realizar pruebas in situ y otros experimentos que demuestren si estas LGT pueden ser mecanismos plausibles de la promoción de células tumorales.

## **PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

El cáncer al pulmón es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En el Perú, se encuentra en el séptimo puesto de incidencia y en el segundo en mortalidad (3). El tipo más común es el de células no pequeñas (NSCLC), el cual representa el 85% de los casos y consiste principalmente en adenocarcinomas (13).

Uno de los factores de riesgo de cáncer de pulmón en la neumonía, causada principalmente por *S. pneumoniae*, una bacteria Gram positiva, causante de varias infecciones respiratorias. Diversos estudios epidemiológicos afirman una asociación significativa entre antecedentes de neumonía y un aumento del riesgo de contraer cáncer al pulmón (12). A través de un seguimiento de 1 a 6 meses luego de un diagnóstico de neumonía, se observó un riesgo relativo 8 veces mayor de padecer este tipo de cáncer (5). Dicho riesgo aumenta más de 8.5 veces si un paciente tiene antecedentes de alguna enfermedad obstructiva crónica pulmonar (EOCP) y desarrolla neumonía (2).

Debido al aumento de riesgo de carcinogénesis causado por neumonía, se ha tratado de determinar si *S. pneumoniae* influye o media la carcinogénesis pulmonar. Uno de los mecanismos moleculares propuestos es la interacción de la proteína PscC de *S. pneumoniae* con el receptor PAFR en las células epiteliales del tracto respiratorio, la cual activa vías de señalización que despliegan una respuesta inflamatoria (13), lo cual contribuye finalmente a la carcinogénesis pulmonar.



Además de los mecanismos moleculares, estudios recientes proponen un mecanismo plausible para la carcinogénesis: la inserción de ADN bacteriano en células humanas. La inserción es posible debido a la liberación de ADN bacteriano a través de sistemas de secreción, como el que posee *H. pylori*, una bacteria carcinogénica. El ADN bacteriano debe ingresar a la célula hospedera, lo cual puede ocurrir a través de una transferencia horizontal de genes. En este sentido, se han hecho experimentos *in vitro* en donde se agregaron células bacterianas a una línea celular de mamífero. Luego de varios días de cultivo, una de cada 10 000 células de mamífero tenían presencia de ADN bacteriano, lo cual demuestra que el ADN bacteriano puede ingresar a la célula eucariota. Así mismo, se sabe que el ADN bacteriano puede ingresar al núcleo de las células huésped a través de los poros nucleares e interactuar con componentes nucleares. Finalmente, los cambios inducidos por bacterias, como roturas de cadenas doble de ADN e inestabilidad genómica, brindan una oportunidad para que el ADN bacteriano se integre en el genoma del huésped (16). Bacterias como *E. coli*, que porta islas patógenas de PKS, causan esta ruptura de la doble hebra de ADN.

Las inserciones de ADN han sido estudiadas recientemente. De hecho, estudios bioinformáticos confirman estas inserciones en células normales, pudiendo incluso llegar a ser 210 veces mayor en células cancerígenas que en células normales. Se han determinado inserciones de diferentes géneros de bacterias en células cancerosas como *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Vibrio*, *Mycobacterium*, etc. (19) Sin embargo, no se ha llegado a realizar un análisis de inserciones a nivel de especie en la mayoría de los géneros.

Puntualmente, la bacteria con estudios más avanzados sobre inserciones en el genoma de células pulmonares cancerígenas es *M. tuberculosis*. Esta micobacteria, al igual que *S. pneumoniae*, está ampliamente relacionada con un mayor riesgo a desarrollar cáncer pulmonar (18,22,23). Al ser una bacteria intracelular obligatoria, es posible que su ADN pueda integrarse al genoma de células somáticas del pulmón. De hecho, estudios bioinformáticos confirmaron la inserción de su ADN en NSCLC con el uso de bases de datos (24).

Un reciente estudio ha encontrado la inserción in situ del transposón IS6110 de *M. tuberculosis* en muestras de tejido de NSCLC (24). Dicha inserción podría tener un rol causal en el cáncer, ya que provoca la interrupción de un proto-oncogén, lo cual puede activarlo convirtiéndolo en un oncogen. Esta confirmación de su presencia in situ refuerza la idea de la inserción de ADN bacteriano como un mecanismo plausible de carcinogénesis.

Al igual que *M. tuberculosis*, *S. pneumoniae* puede invadir a la célula intracelularmente. Ambas favorecen procesos endocíticos para poder evadir la respuesta inmune a través de diferentes receptores presentes en los macrófagos alveolares y en las células epiteliales del pulmón (25,10). Asimismo, se ha encontrado la presencia de ADN de *Streptococcus* en tejido canceroso pulmonar a través de ddPCR (15). Aunque no se ha determinado si este ADN está insertado en el genoma o si simplemente es parte del microbioma del tumor.

Lo anteriormente mencionado, junto a la evidencia de la asociación entre *S. pneumoniae* y el cáncer pulmonar, nos hace preguntarnos si existe ADN de *S. pneumoniae* integrado

en el ADN genómico de células de cáncer de pulmón, especialmente en secuencias de diversos proto-oncogenes y genes supresores de tumores. La posibilidad de ello representa un mecanismo de suma importancia, al ser considerado una causa de la inestabilidad genómica que, por consiguiente, podría desempeñar un papel activo en la transformación celular y el desarrollo del cáncer de pulmón.

Conocer ello podría abrir un nuevo camino en la investigación del cáncer de pulmón originado por bacterias y reforzar las estrategias de prevención de contagio por *S. pneumoniae*. Ello con el propósito de reducir la prevalencia de factores de riesgo del cáncer pulmonar o bien de resaltar la importancia del tratamiento oportuno de la neumonía. Así mismo, podría contribuir a los protocolos de manejo de pacientes con cáncer de pulmón para determinar presencia de infección por *S. pneumoniae* crónica o historia pasada de dicha infección.

## **ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN**

Es un estudio retrospectivo, transversal, in silico, de análisis secundario de datos genómicos. Nuestra cohorte de interés será TCGA-LUAD compuesta de un total de 877 muestras de pacientes con cáncer de pulmón. Se obtendrán los genomas completos de las muestras de TCGA-LUAD consultando bases de datos públicas como dbGaP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gap/>), GDC Portal (<https://portal.gdc.cancer.gov/>), Xena Browser (<https://xenabrowser.net/>) y CBioportal (<https://www.cbioportal.org/>). Se solicitarán los permisos necesarios para el acceso al genoma completo a través de dbDaP. En esta investigación delimitaremos la exploración genómica a genes supresores de

tumores y proto-oncogenes (asociados a cáncer de pulmón), incluyendo un aproximado de 200 genes. Esto debido a que están relacionados con el control de la división y muerte celular. Una vez con las secuencias de cada gen, por paciente, se realizarán alineamientos múltiples de secuencias y una rastreo de ADN de *S. pneumoniae*, utilizando NUCMER, Kraken y Pathoscope, para determinar los lugares de inserción de ADN de *S.pneumoniae* en el genoma de la cohorte. Posteriormente, se utilizará BLASTN para confirmar este alineamiento y se tomará como LGT a aquellos pares de secuencias que presenten sólo una pareja asignada exclusivamente al genoma humano y solo una pareja asignada exclusivamente al genoma bacteriano. Se espera obtener la tasa de inserciones por LGT por cada muestra y el lugar preciso de inserción de tal forma que se prediga la activación del oncogen o inactivación del gen supresor de tumor. Se estimará la frecuencia de afectación (inserción) por gen.

## REFERENCIAS

1. Thandra KC, Barsouk A, Saginala K, Aluru JS, Barsouk A. Epidemiology of lung cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2021;25(1):45-52. Disponible en: <https://doi.org/10.5114/wo.2021.103829>
2. Bade BC, Dela Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med*. 2020;41(1):1-24. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>
3. GLOBOCAN. Global Cancer Observatory [Internet]. 2020. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/15-Lung-fact-sheet.pdf>

4. GLOBACAN. Peru. Global Cancer Observatory [Internet]. 2020. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/604-peru-fact-sheets.pdf>
5. Søggaard KK, Farkas DK, Pedersen L, Weiss NS, Thomsen RW, Sørensen HT. Pneumonia and the incidence of cancer: a Danish nationwide cohort study. *J Intern Med.* 2015 Apr;277(4):429-38. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/joim.12270>
6. Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis.* 2013 Oct;5 Suppl 5(Suppl 5):S479-90. Disponible en: <https://jtd.amegroups.org/article/view/1597>
7. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, Schizas D, Mastoraki A, Garmpis N, Diakosavvas M, Angelou K, Tsatsaris G, Pagkalos A, Ntounis T, Fasoulakis Z. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res.* 2020 Nov;40(11):6009-6015. Disponible en: <https://doi.org/10.21873/anticancer.14622>
8. Zhou Y, Xu B, Zhou Y, Liu J, Zheng X, Liu Y, et al. Identification of Key Genes With Differential Correlations in Lung Adenocarcinoma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* 2021 May 5;9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.675438/full>
9. Subramanian K, Henriques-Normark B, Normark S. Emerging concepts in the pathogenesis of the *Streptococcus pneumoniae*: From nasopharyngeal colonizer to intracellular pathogen. *Cell Microbiol.* 2019 Nov;21(11):e13077. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/cmi.13077>
10. Asmat TM, Agarwal V, Saleh M, Hammerschmidt S. Endocytosis of *Streptococcus pneumoniae* via the polymeric immunoglobulin receptor of epithelial cells relies on clathrin and caveolin dependent mechanisms. *Int J Med*

- Microbiol. 2014 Nov;304(8):1233-46. Disponible en:  
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.10.001>
11. Brenner AV, Wang Z, Kleinerman RA, Wang L, Zhang S, Metayer C, et al. Previous pulmonary diseases and risk of lung cancer in Gansu Province, China. *International Journal of Epidemiology*. 2001 Feb 1;30(1):118–24. Disponible en:  
<https://academic.oup.com/ije/article/30/1/118/619051>
  12. Ang L, Ghosh P, Seow WJ. Association between previous lung diseases and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Carcinogenesis*. 2021 Dec 31;42(12):1461-1474. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgab082>
  13. Li N, Zhou H, Holden VK, Deepak J, Dhilipkannah P, Todd NW, Stass SA, Jiang F. *Streptococcus pneumoniae* promotes lung cancer development and progression. *iScience*. 2023 Jan 4;26(2):105923. Disponible en:  
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105923>
  14. Song X, Liu B, Zhao G, Pu X, Liu B, Ding M, Xue Y. *Streptococcus pneumoniae* promotes migration and invasion of A549 cells *in vitro* by activating mTORC2/AKT through up-regulation of DDIT4 expression. *Front Microbiol*. 2022 Dec 19;13:1046226. Disponible en:  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1046226>
  15. Zhou H, Liao J, Leng Q, Chinthalapally M, Dhilipkannah P, Jiang F. Circulating Bacterial DNA as Plasma Biomarkers for Lung Cancer Early Detection. *Microorganisms*. 2023 Feb 25;11(3):582. Disponible en:  
<http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms11030582>
  16. YANGYANQIU, Wang; SHUWEN, Han. Bacterial DNA involvement in carcinogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022, p. 1549. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.996778>

17. Herta, T., Bhattacharyya, A., Bollensdorf, C., Kabus, C., García, P., Suttorp, N., Hippenstiel, S., & Zahlten, J. DNA-release by *Streptococcus pneumoniae* autolysin LytA induced Krueppel-like factor 4 expression in macrophages. *Scientific reports*. 2018; 8(1), 5723. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24152-1>
18. Molina-Romero C, Arrieta O, Hernández-Pando R. Tuberculosis and lung cancer. *Salud Pública Mex*. 7 de junio de 2019; 61(3, may-jun):286-91. Disponible en: <https://doi.org/10.21149/10090>
19. Riley, D. R., Sieber, K. B., Robinson, K. M., White, J. R., Ganesan, A., Nourbakhsh, S., & Dunning Hotopp, J. C. Bacteria-human somatic cell lateral gene transfer is enriched in cancer samples. *PLoS computational biology*. 2013; 9(6), e1003107. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003107>
20. Akimova E, Gassner FJ, Greil R, Zaborsky N, Geisberger R. Detecting Bacterial-Human Lateral Gene Transfer in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 20;23(3):1094. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms23031094>
21. Alhmoud, J. F., Woolley, J. F., Al Moustafa, A. E., & Malki, M. I. (2020). DNA Damage/Repair Management in Cancers. *Cancers*, 12(4), 1050. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/cancers12041050>
22. Xiong K, Sun W, He Y, Fan L. Advances in molecular mechanisms of interaction between *Mycobacterium tuberculosis* and lung cancer: a narrative review. *Transl Lung Cancer Res*. 2021 Oct;10(10):4012-4026. Disponible en: <https://tlcr.amegroups.org/article/view/57033>
23. Chai, Q., Lu, Z., Liu, Z. *et al.* Lung gene expression signatures suggest pathogenic links and molecular markers for pulmonary tuberculosis, adenocarcinoma and

- sarcoidosis. *Commun Biol* 3. 2020; 604. Disponible en:  
<https://doi.org/10.1038/s42003-020-01318-0>.
24. Arrieta, O., Molina-Romero, C., Cornejo-Granados, F. *et al.* Clinical and pathological characteristics associated with the presence of the IS6110 *Mycobacterium tuberculosis* transposon in neoplastic cells from non-small cell lung cancer patients. *Sci Rep* 1. 2022; 2210. Disponible en:  
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-05749-z>
25. Schorey, J. S., Schlesinger, L. S. . Innate Immune Responses to Tuberculosis. *Microbiology spectrum*. 2016 4(6). Disponible en:  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.tbtb2-0010-2016>