

***DETECCIÓN DE BIOMARCADORES GENÓMICOS  
PREDICTORES DE RESPUESTA Y RESISTENCIA A  
INMUNOTERAPIA EN PACIENTES CON CÁNCER DE  
PULMÓN NO MICROCÍTICO METASTÁSICO***



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Alejandro Olivares Hernández**

**2022**

**DIRECTORES DE TESIS**

**Prof. Dr. Juan Jesús Cruz Hernández**

**Prof. Dra. María Dolores Ludeña de la Cruz**

**Prof. Dr. Edel del Barco Morillo**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Medicina**

**EL PROF. JUAN JESÚS CRUZ HERNÁNDEZ PROFESOR EMÉRITO DE LA FACULTAD DE MEDICINA, LA DRA. MARÍA DOLORES LUDEÑA DE LA CRUZ CATEDRÁTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y EL DR. EDEL DEL BARCO MORILLO PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo titulado “Detección de biomarcadores genómicos predictores de respuesta y resistencia a inmunoterapia en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico metastásico”, que presenta el Graduado en Medicina y Médico Interno Residente de Oncología Médica, Alejandro Olivares Hernández, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Medicina, y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentado ante el tribunal correspondiente y pueda optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, expiden el presente certificado en Salamanca a 9 de noviembre de 2022.

Prof. Dr. Juan Jesús Cruz Hernández

Prof. Dra. María Dolores Ludeña de la Cruz

Prof. Dr. Edel del Barco Morillo



## PUBLICACIONES

Los resultados de este trabajo han sido publicados o presentados en las siguientes revistas científicas o congresos:

- **Artículo de revista internacional (Anexo 1)**

**Revista:** *Biomedicines*

**Nombre del artículo:** Influence of DNA Mismatch Repair (MMR) System in Survival and Response to Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs) in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Retrospective Analysis.

**Autores:** Alejandro Olivares Hernández, Edel del Barco Morillo, Carmen Parra Pérez, José Pablo Miramontes González, Luis Figuero Pérez, Teresa Martín Gómez, Roberto Andrés Escala Cornejo, Lorena Bellido Hernández, Rogelio González Sarmiento, Juan Jesús Cruz Hernández, María Dolores Ludeña de la Cruz.

- **Artículo de revista internacional (Anexo 2)**

**Revista:** *Frontiers in Bioscience Landmark*

**Nombre del artículo:** Immunohistochemical assessment of the P53 protein as a predictor of non-small cell lung cancer response to immunotherapy.

**Autores:** Alejandro Olivares Hernández, Edel del Barco Morillo, José Pablo Miramontes González, Luis Figuero Pérez, Luis Pérez Belmonte, Javier Martín Vallejo, Teresa Martín Gómez, Roberto Andrés Escala Cornejo, Rosario Vidal Tocino, Lorena Bellido Hernández, Rogelio González Sarmiento, María Dolores Ludeña de la Cruz, Juan Jesús Cruz Hernández, Carmen Parra Pérez.

- **Comunicación en congreso internacional (Anexo 3)**

**Congreso:** ESMO Congress 2021

**Título comunicación:** Expression by immunohistochemistry of p53 tumor suppressor protein as a predictive biomarker of response to immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer.

**Autores:** Alejandro Olivares Hernández, Edel del Barco Morillo, Luis Figuero Pérez, Roberto A. Escala Cornejo, Carmen Parra Pérez, Aline Rodrigues Françoso, Lorena Bellido Hernández, Rosario Vidal Tocino, Elena Escalera Martín, Juncal Claros Martín,

Eduardo Terán Brage, Álvaro López Gutiérrez, María Dolores Ludeña de la Cruz, Juan Jesús Cruz Hernández.

- **Comunicación en congreso nacional**

**Congreso:** SEOM 2021

**Título comunicación:** Expresión de la proteína p53 por inmunohistoquímica como biomarcador predictivo de respuesta a inmunoterapia en cáncer de pulmón no microcítico con alta expresión de PDL1.

**Autores:** Alejandro Olivares Hernández, Edel del Barco Morillo, María Carmen Parra Pérez, Luis Figuero Pérez, Roberto Andrés Escala Cornejo, Aline Rodrigues Françoso, Lorena Bellido Hernández, Rosario Vidal Tocino, María Carmen Garijo Martínez, Elena Escalera Martín, Juncal Claros Ampuero, Irene Toribio García, María Dolores Ludeña de la Cruz, Juan Jesús Cruz Hernández.

- **Comunicación en congreso nacional**

**Congreso:** SEOM 2021

**Título comunicación:** Correlación de la respuesta y supervivencia del tratamiento con inmunoterapia en cáncer de pulmón no microcítico en función del estado mutacional del sistema mismatch repair.

**Autores:** Alejandro Olivares Hernández, Edel del Barco Morillo, María Carmen Parra Pérez, Luis Figuero Pérez, Roberto Andrés Escala Cornejo, Aline Rodrigues Françoso, Lorena Bellido Hernández, Rosario Vidal Tocino, Daniel Morchón Araujo, Elena Escalera Martín, Juncal Claros Ampuero, Irene Toribio García, María Dolores Ludeña de la Cruz, Juan Jesús Cruz Hernández.

*A mis padres, Irene y mis mentores los Dres. Cruz, del Barco y Ludeña*

*“Aut Caesar aut nihil”*



## AGRADECIMIENTOS

Cuando una persona comienza realizando una tarea como una tesis doctoral se enfrenta a un esfuerzo ímprobo que pone a prueba la capacidad de trabajo como ninguna otra. Y en esa circunstancia es donde uno valora más el trabajo y cariño de la gente que tiene alrededor. Estos agradecimientos son una pequeña muestra de reconocimiento hacia aquellas personas que de una manera o de otra han contribuido a la realización de esta tesis y de cuyos resultados son parte.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis. El gran poeta Oscar Wilde dijo una vez “La imitación es la forma más sincera de admiración” y esta es la forma con la que yo veo al **Dr. Juan Jesús Cruz**. Su consejo y su guía han sido fundamentales en mi carrera profesional y mi objetivo en la vida es poder imitarlo como mi forma de admiración hacia él. Su ejemplo en el día a día han sido una inspiración en todos los pasos de mi vida tanto a nivel laboral como en mi vida personal, y me gustaría que con este agradecimiento supiera que aquí siempre tendrá a una persona que lo admirará.

Junto al Doctor Cruz, el **Dr. Edel del Barco** ha sido la otra guía en este camino. Sus enseñanzas en la patología más bonita dentro de la Oncología a mi parecer, como es el cáncer de pulmón, me han ayudado a descubrir un nuevo camino profesional que me gustaría poder seguir los próximos años. Y dentro de la Oncología he conocido otro campo fundamental y bello como es la Anatomía Patológica y ello es debido gracias a la **Dra. M<sup>a</sup> Dolores Ludeña**, sin cuyo esfuerzo y ayuda sería imposible esta tesis, y por ello estoy tan agradecido como orgulloso por poder decir que he trabajado con ella. En este tipo de proyectos, a veces nos encontramos con personas que nos ayudan en un esfuerzo más allá de lo que implica el trabajo. Nos ayudan desinteresadamente, y es en estas personas con quien queda una amistad fuera del trabajo. Esta persona en mi tesis fue el **Dr. Juan Luis García**, el cual no ha sido mi director por la reglamentación, pero que sin embargo en justicia es el cuarto director de esta tesis.

Además de lo puramente académico, hay personas las cuales han nacido con una magia especial para la docencia y que te transmiten sus enseñanzas sin pedir nada a cambio. Gracias al **Dr. Pablo Miramontes** por enseñarme a hacer lo más complicado que existe

en este oficio, que es pensar y comprender la investigación y que de ello hemos hecho nuestra amistad. Y es que como dijo Marco Tulio Cicerón ¿Qué cosa más grande que tener a alguien con quien te atrevas a hablar como contigo mismo?

Para poder realizar una tesis en medicina que conjuga lo clínico con la investigación es fundamental contar con una base y un apoyo que te permita poder proyectar el trabajo y luego realizarlo. Por ello, me gustaría agradecer este trabajo al **Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínico Universitario de Salamanca** (en especial al jefe de servicio el **Dr. Emilio Fonseca**), sin el cual no hubiera sido posible realizar ni la primera frase. Asimismo, gracias a la buena predisposición y cariño que han tenido los **pacientes** conmigo que ha hecho que este trabajo sea por y para ellos. Dentro del Servicio de Oncología Médica hay dos personas que me han ayudado de manera especial y con las cuales he podido compartir y aprender de sus conocimientos. El primero de ellos es uno de los mejores oncólogos que conozco y ese es del **Dr. Luis Figuero**, al que me gustaría agradecer haberme permitido compartir mi trabajo con él, porque creo que el futuro de la oncología es suyo. Y junto con él, me gustaría agradecer este trabajo al **Dr. Roberto Escala**, junto con el cual comencé esta andadura de la oncología y que puedo decir con orgullo que trabajé junto a él y pude compartir de su sabiduría en el día a día.

Asimismo, en el terrero laboral, me gustaría agradecer este trabajo a todos los miembros del Servicio de Anatomía Patológica y del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca por toda la ayuda para poder realizar la tesis. En especial me gustaría dar las gracias a la **Dra. Carmen Parra** y la **Dra. Eva María Sánchez** por su inestimable colaboración que ha sido fundamental para la realización de todo este trabajo. Y junto a ellas, al **Dr. Pedro Gómez de Quero** con quien di mis primeros pasos en el mundo de la investigación con mi TFG hace más de 5 años, y quien su ejemplo me ha servido como inspiración en mi carrera.

Entrando dentro del plano personal, que sería de cualquiera de nosotros sin el apoyo incondicional de los que más nos quieren. El trabajo de un hombre, a mi forma de entender la vida, debe ir unido a su familia y con su ayuda se pueden conseguir todas las metas posibles. Para comenzar, me gustaría agradecer el estar siempre junto a mi en los buenos y en los malos momentos a mis amigos **Pablo Corral** y **Alejandro Martín**. Y junto a ellos, hay una persona sin cuyo consejo y cariño no existiría nada de todo esto y ese es

mi amigo **Francisco Javier Tardáguila**, al que yo que no tengo hermanos puedo llamar mi hermano.

A mis padres (**Vidal Manuel Olivares** y **Margarita Hernández**) y a mi pareja **Irene Toribio** es complicado agradecerles este trabajo porque son parte de él. Hacer un trabajo de estas características es mucho más que analizar datos y muestras o teclear un ordenador. Este trabajo es estar al lado de la persona que lo hace y darle su amor en las situaciones complicadas donde uno quiere abandonar. Los tres son el núcleo de mi vida y mi trabajo es por y para ellos, y como dijo Juan Pablo II: “La familia es para los creyentes una experiencia de camino, una aventura rica en sorpresas, pero abierta sobre todo a la gran sorpresa de Dios, que viene siempre de modo nuevo a nuestra vida”.

Para finalizar este largo agradecimiento, como hombre creyente que soy, me gustaría dar las gracias a Dios porque su camino es el que guía mi vida. De todas las ciencias, en la que más se puede ver clara la Obra de Dios es la genómica. Porque desde una mutación por un cambio de nucleótido hasta la más grande alteración en el ADN llevan la firma de Dios impresa, y nosotros somos las herramientas para descifrar sus implicaciones y poder llevarlas hasta los pacientes.

***En recuerdo a mi abuelo, Vidal Manuel Olivares Rojo.***



# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

- 1- Cáncer de pulmón.....Página 10**
  - a. Características generales del cáncer de pulmón .....Página 10
  - b. Tratamiento del cáncer de pulmón .....Página 22
- 2- Inmunoterapia y cáncer .....Página 31**
  - a. Factores predictivos de respuesta a inmunoterapia .....Página 38
  - b. Marcadores genómicos de respuesta a inmunoterapia.....Página 46
  - c. Técnicas de detección de alteraciones genómicas en oncología .....Página 51

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

- Hipótesis y objetivos .....Página 57

## MATERIAL Y MÉTODOS

- 1- Pacientes, protocolo del estudio y obtención de las muestras.....Página 61**
  - a. Consentimiento informado y leyes .....Página 64
- 2- Análisis mediante inmunohistoquímica.....Página 65**
  - a. Análisis de expresión de PD-L1 .....Página 65
  - b. Análisis de expresión de TP53 y genes del sistema MMR.....Página 65
  - c. Análisis informático de los resultados obtenidos por IHQ.....Página 65
- 3- Análisis del exoma .....Página 67**
  - a. Obtención del ctDNA y ADN del tumor primario .....Página 67
  - b. Análisis bioinformático de los exomas.....Página 68

## RESULTADOS

- 1- Características generales de la muestra .....Página 73**
  - a. Características generales de la muestra estudiada por IHQ.....Página 74

b.	Características generales de la muestra estudiada por NGS.....	Página 80
<b>2-</b>	<b>Resultados del análisis por inmunohistoquímica.....</b>	<b>Página 83</b>
a.	Estudio de la expresión proteica de p53 .....	Página 83
b.	Estudio de expresión de los genes del sistema MMR.....	Página 89
<b>3-</b>	<b>Resultados del análisis por secuenciación masiva .....</b>	<b>Página 93</b>
a.	Exoma del ADN extraído del tumor primario .....	Página 93
b.	Exoma del ctDNA extraído por biopsia líquida .....	Página 98
c.	Estudio comparativo entre el exoma tisular y del ctDNA .....	Página 107

## **DISCVSIÓN**

a.	Diagnóstico molecular en oncología (IHQ frente NGS).....	Página 113
b.	Características generales de la muestra estudiada por IHQ .....	Página 114
c.	Características generales de la muestra estudiada por NGS .....	Página 116
d.	Expresión proteica de p53 por IHQ como biomarcador predictivo ..	Página 117
e.	Expresión del sistema MMR como biomarcador predictivo .....	Página 120
f.	Análisis del exoma del ADN del tumor primario .....	Página 122
g.	Análisis del exoma del ctDNA extraído con biopsia líquida .....	Página 126
h.	Análisis comparativo entre el exoma del ADN tisular y ctDNA .....	Página 136

## **CONCLVSIONES**

Conclusiones.....	Página 143
-------------------	------------

## **BIBLIOGRAFÍA**

Bibliografía.....	Página 147
-------------------	------------

## **ANEXOS**

Anexos.....	Página 177
-------------	------------

## LISTADO DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

- **AACR:** *American Association for Cancer Research*
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **ALK:** Kinasa de linfoma anaplásico
- **APC:** Célula presentadora de antígeno
- **ARN:** Ácido Ribonucleico
- **ASCO:** *American Society of Clinical Oncology*
- **CAUSA:** Complejo Asistencial Universitario de Salamanca
- **CDK:** Quinasa dependiente de ciclina
- **Células Treg:** Células T reguladoras
- **CK:** Citoqueratina
- **CMHI:** Complejo mayor de histocompatibilidad I
- **CMHII:** Complejo mayor de histocompatibilidad II
- **CPNM:** Cáncer de pulmón no microcítico
- **ctDNA:** Ácido desoxirribonucleico circulante tumoral
- **CTLA-4:** Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4
- **EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético
- **EGFR:** Factor de crecimiento epidérmico
- **EMA:** Agencia europea del medicamento
- **EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- **ESP:** *Exome Sequencing Project*
- **FASTQ:** *Quality Tool for High Throughput Sequence Data*
- **FASTQC:** *Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*
- **FDA:** *Food and Drug Administration*
- **GATK:** *Genome Analysis Toolkit*
- **GSTM1:** Glutación S-transferasa M1
- **HR:** *Hazard Ratio*
- **IALT:** *International Lung Cancer Collaborative Group Trial*
- **IASLC:** *International Association for the Study of Lung Cancer*
- **INDEL:** Mutación por inserción y delección
- **IDO:** Indolamina Deoxigenasa
- **IHQ:** Inmunohistoquímica
- **INE:** Instituto nacional de estadística
- **iPARP:** Inhibidores de la poli ADP ribosa polimerasa
- **ITK:** Inhibidor de la tirosina kinasa
- **ITIM:** *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*
- **LDH:** Lactato deshidrogenasa
- **MDSC:** Célula mieloides supresora
- **MMR:** *Mismatch Repair*
- **NAT2:** N-acetiltransferasa 2
- **NCAM:** Molécula de adhesión de células neurales
- **NGS:** *Next-Generation Sequencing*

- **NHLBI:** *National Heart Lung and Blood Institute*
- **NIH:** *National Library of Medicine*
- **NK:** *Natural Killer*
- **OMS:** Organización mundial de la salud
- **PCR:** Reacción en cadena de polimerasa
- **PD-1:** Programmed cell death-1
- **PD-L1:** Programmed death-ligand 1
- **PD-L2:** Programmed death-ligand 2
- **RECIST:** *Response Evaluation Criteria in Solid Tumours*
- **RO:** Respuesta objetiva
- **SG:** Supervivencia global
- **SHP2:** Proteína de la tirosina fosfatasa-2
- **SLE:** Supervivencia libre de enfermedad
- **SLP:** Supervivencia libre de progresión
- **SNV:** *Single Nucleotide Variant*
- **TAM:** Macrófago asociado a tumor
- **TCR:** Receptor de célula T
- **TEM:** Transición epitelio-mesénquima
- **TIL:** Linfocito infiltrante de tumor
- **TMB:** *Tumour Mutational Burden*
- **TRO:** Tasa de respuesta objetiva
- **TTF-1:** Factor de transcripción 1 del tiroides

# INTRODUCCIÓN



# INTRODUCCIÓN

El cáncer es un importante problema de salud pública. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en la actualidad, el cáncer es una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en el mundo<sup>1</sup>. Se estima que cada año se producen en el mundo entre 18 y 20 millones de nuevos casos de cáncer y más de 9 millones de muertes debidos a esta enfermedad<sup>2</sup>. La prevalencia se estima en unos 44 millones de personas con diagnóstico de cáncer en el mundo<sup>3</sup> (Figura 1).

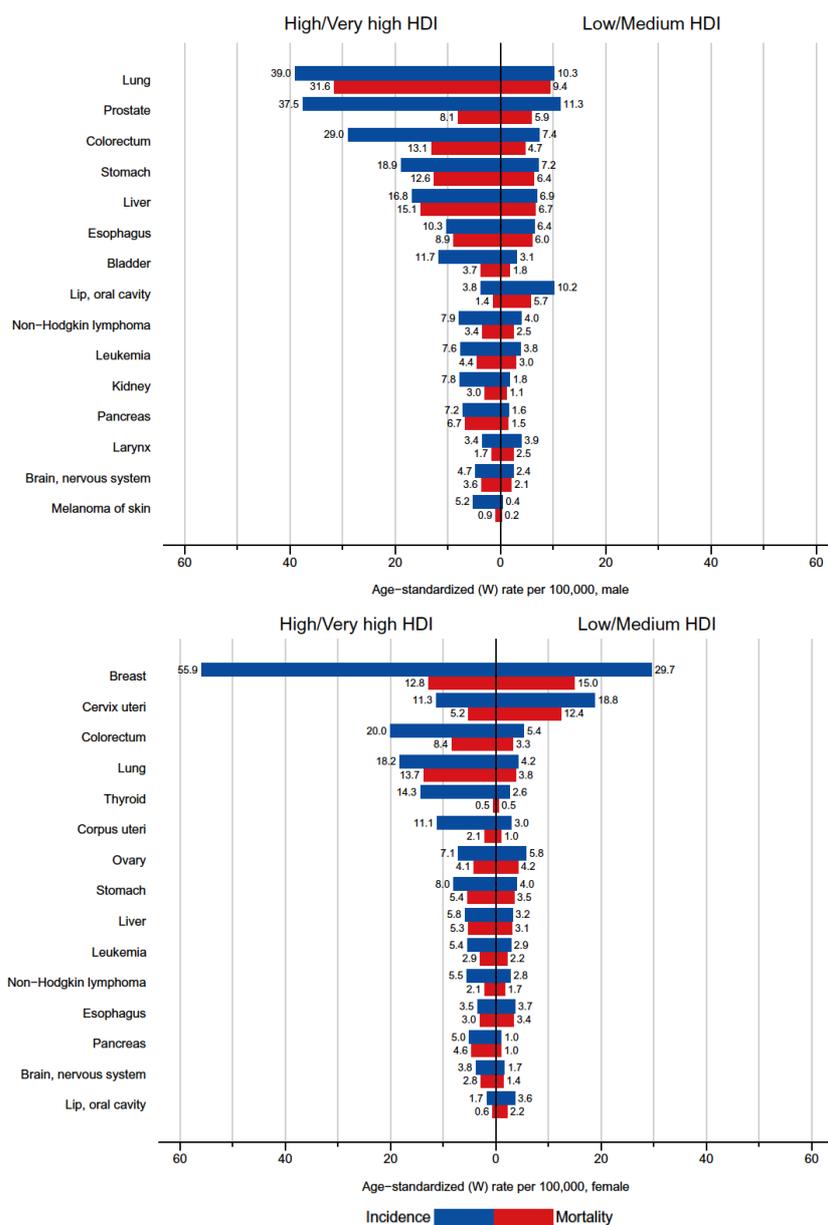


Figura 1. Incidencia y mortalidad mundial del cáncer. Globocan 2020<sup>3</sup>. Imagen superior varones e inferior mujeres (HDI: *Human Development Index*).

En función de la localización, la incidencia mundial del cáncer la encabeza el cáncer de mama, seguido de cáncer de pulmón y, en tercer lugar, se sitúa el cáncer colorrectal (Figura 2)<sup>4</sup>. A nivel de mortalidad, el primer lugar lo ocupa el cáncer de pulmón, seguido del cáncer colorrectal y el cáncer hepático<sup>5</sup>.

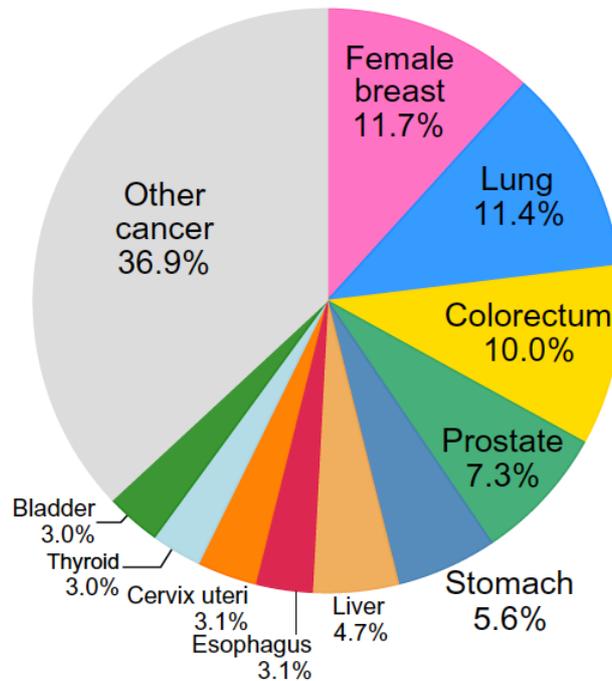


Figura 2. Incidencia a nivel mundial del cáncer. Globocan 2020<sup>3</sup>.

En Europa, alrededor de 4.2 millones de personas son diagnosticadas de cáncer al año y 1.9 millones de personas fallecen por el mismo motivo<sup>6</sup>. La incidencia teniendo en cuenta ambos sexos la encabeza el cáncer de mama, seguido por el cáncer colorrectal y el cáncer de pulmón (aumentando respecto a años anteriores, superando en tercer lugar al cáncer de próstata). En mortalidad, el primer lugar lo ocupa el cáncer de pulmón, seguido del cáncer colorrectal y el cáncer de mama<sup>7</sup>.

En España, la incidencia para el año 2022 se estima en alrededor de 280.000 casos nuevos de cáncer diagnosticados (Figura 3)<sup>8</sup>. El cáncer con mayor incidencia para ambos sexos es el de mama, seguido del pulmón y la próstata. Por sexos, en las mujeres el cáncer con mayor incidencia es el de mama seguido de colon y pulmón. En varones, los cánceres más incidentes son próstata, pulmón y colon<sup>9</sup>.

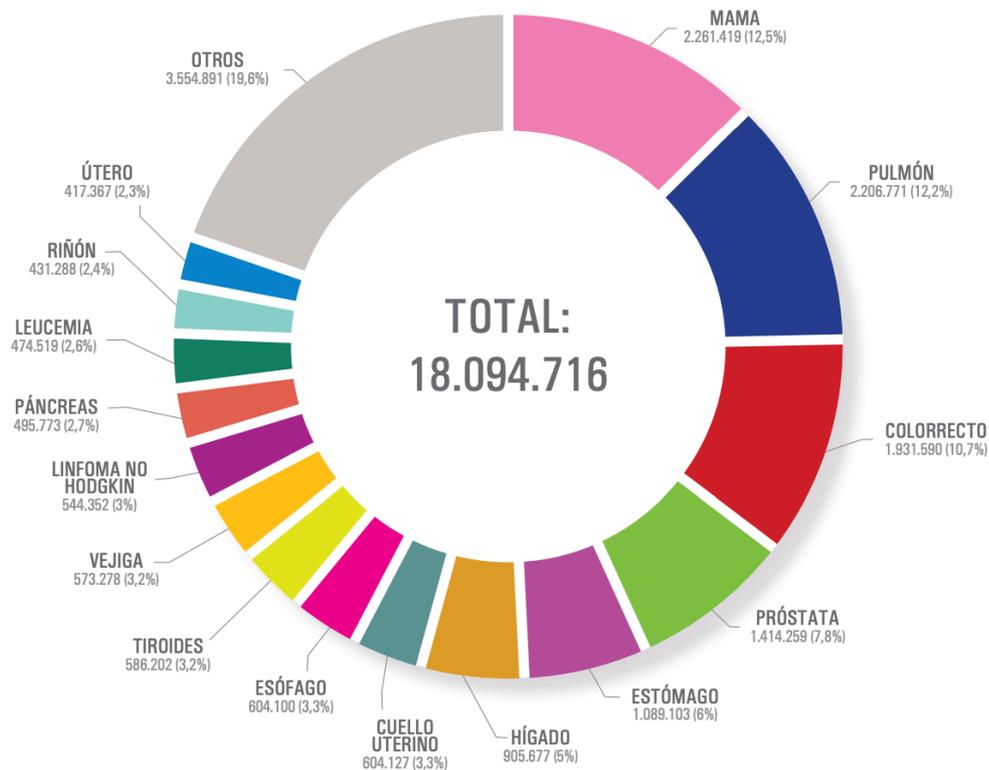


Figura 3. Incidencia del cáncer en España para el año 2022<sup>8</sup>.

La mortalidad en España por cáncer para el año 2022 se estima en unas 75.000 defunciones al año<sup>10</sup>. Para ambos sexos, la mortalidad la encabeza el cáncer de pulmón, seguido del cáncer colorrectal y el cáncer de páncreas. En las mujeres el cáncer de mama es el que más mortalidad origina seguido del cáncer de pulmón y de colon. En varones, el primer lugar es para el cáncer de pulmón seguido del cáncer de colon y de próstata.

## *1- CÁNCER DE PULMÓN*

### *CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CÁNCER DE PULMÓN*

#### **Epidemiología del cáncer de pulmón**

El cáncer de pulmón es uno de los tumores malignos más frecuentes en el mundo. A principios del siglo XX era una enfermedad poco frecuente, pero tras el inicio del consumo de tabaco en la población, superó con creces en tasas de incidencia y mortalidad al resto de tumores malignos<sup>11</sup>. La gran mayoría a nivel mundial son del subtipo adenocarcinoma, cuya incidencia se encuentra en aumento en los últimos años en los países occidentales, dado el aumento del tabaquismo entre las mujeres europeas<sup>12,13</sup>. Existe en la actualidad grandes diferencias en la prevalencia, incidencia y mortalidad en cáncer de pulmón en ambos sexos en función de las regiones estudiadas, y de la madurez en el consumo de tabaco adquirida con el tiempo<sup>14,15</sup>.

A nivel mundial, el cáncer de pulmón es el segundo en incidencia, con 2.1 millones de nuevos diagnósticos de cáncer de pulmón al año<sup>16</sup>. Más de la mitad de los casos de cáncer de pulmón diagnosticados en el mundo ocurren en países desarrollados, especialmente en Asia, Europa y Norteamérica<sup>17</sup>. Notablemente, las tasas más bajas de incidencia se observan en África y Oceanía<sup>18,19</sup>. La incidencia aumenta de manera importante por encima de los 40 años, siendo raro en edades inferiores. La probabilidad de desarrollar cáncer de pulmón a lo largo de la vida es del 7% en varones y de 6% en mujeres<sup>20</sup>.

En España, según los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), en varones se encuentra en el segundo lugar del tumor más diagnosticado con más de 21.000 casos de cáncer de pulmón al año diagnosticados en España. En mujeres, el número de casos diagnosticados al año de cáncer de pulmón en España es muy inferior al de varones, con alrededor de 8.000 nuevos tumores al año<sup>21</sup>.

A nivel de mortalidad, un total de 1.8 millones de personas fallecen a nivel mundial a causa de tumores de pulmón (representando el 18.4% de las muertes por cáncer). En varones es la primera causa de fallecimientos a nivel mundial dentro del cáncer, siendo la segunda en mujeres tras el cáncer de mama. Las tasas más elevadas de mortalidad se observan en los países occidentales, en contraste con los países africanos que presentan

las tasas de mortalidad ajustadas por edad más bajas de todos los países mundiales (Figura 4)<sup>22</sup>.

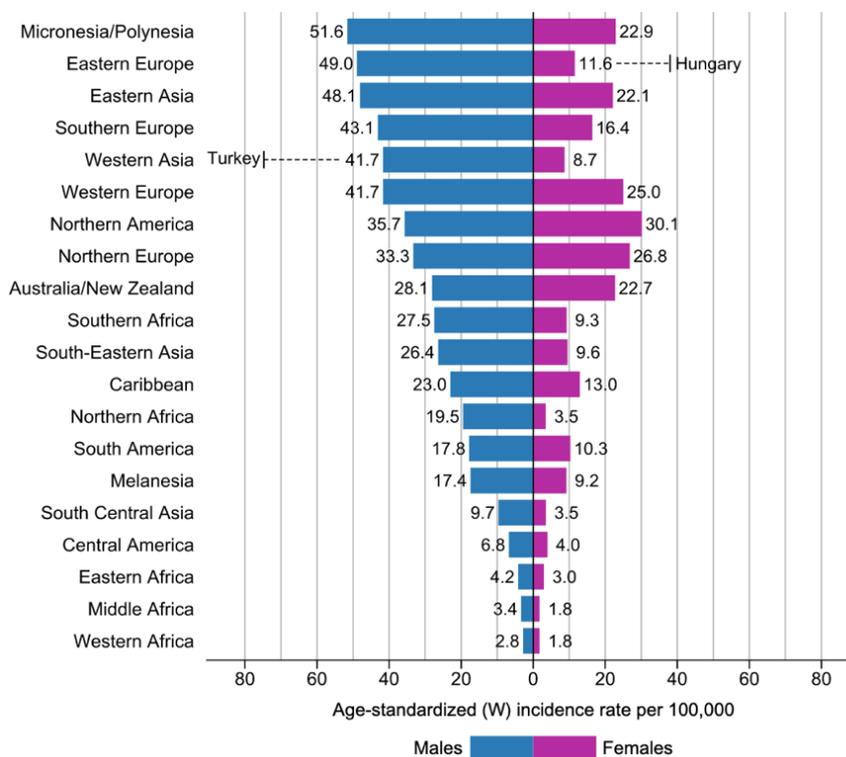


Figura 4. Incidencia (azul) y mortalidad (morado) por cáncer de pulmón a nivel mundial. Globocan 2020<sup>3</sup>.

En España, 22.000 personas fallecen a causa del cáncer de pulmón al año, de los cuales 3 de cada 4 son varones. Es la primera causa de mortalidad por cáncer actualmente en España. Haciendo un análisis por comunidades autónomas, Cantabria es la comunidad con la tasa de mortalidad más elevada por cáncer de pulmón de España, seguida de Extremadura y Asturias. La tasa de mortalidad más baja se encuentra en Islas Baleares.

Es importante remarcar el importante aumento de la mortalidad en Europa en mujeres secundario al cáncer de pulmón. La tasa de mortalidad ajustada por edad aumentó de manera significativa entre las mujeres en España desde 1989, con un aumento más pronunciado desde 1997 hasta el momento actual<sup>24</sup>. El incremento en la prevalencia del consumo de tabaco es la causa fundamental del aumento. En contraposición con lo anterior, se espera que en varones exista un descenso de mortalidad en los próximos años que siga a la disminución de la incidencia que actualmente observamos<sup>25</sup>.

## **Etiología del cáncer de pulmón**

El cáncer de pulmón es uno de los cánceres cuya etiología es una de las más estudiadas a nivel mundial. En ella, están implicadas multitud de factores ambientales y genéticos entre los cuales destaca el más conocido de todos que es el tabaco. Todos estos factores pueden interactuar para finalmente dar lugar a un carcinoma de pulmón.

### *Tabaco*

El tabaco es el factor de riesgo más importante para el desarrollo del cáncer de pulmón. Los datos que relacionan el tabaco y el cáncer de pulmón están bien establecidos y su relación es de las más conocidas en oncología. Los reportes de cáncer de pulmón a finales del siglo XIX eran anecdóticos<sup>26,27</sup>. En las primeras décadas del siglo pasado la incidencia era de tres casos por cada 100.000 habitantes, y aumentó de manera dramática en la década de los setenta a 446 por cada 100.000 habitantes entre varones de 55 a 74 años. Este incremento no tiene comparación con otras epidemias secundarias a la conducta humana<sup>28</sup>.

El potencial carcinogénico del tabaco es muy elevado dado la gran cantidad de carcinógenos que contiene. No existe un umbral a partir del cual se aumente el riesgo de cáncer de pulmón, sino que el consumo muestra una asociación casi lineal con la cantidad de cigarrillos al día<sup>29</sup>. Los patrones de incidencia y mortalidad por cáncer de pulmón han seguido, con una latencia de unos 30 años, el patrón temporal de consumo de tabaco. El tabaco puede contribuir a la aparición del 85-90% de los casos de cáncer de pulmón en hombres y el 50-80% de los casos en mujeres<sup>30</sup>.

El cáncer de pulmón microcítico es mucho más frecuente en quienes han fumado más de 30 años y durante los primeros 10 años después de haber dejado de fumar. Esto explica el porque este subtipo de cáncer de pulmón era más frecuente hace 3 o 4 décadas, dado que, si bien la prevalencia del tabaquismo sigue siendo alta, su duración ha disminuido. Este efecto es menor para otras histologías como el carcinoma epidermoide o el adenocarcinoma<sup>31</sup>.

### *Factores ocupacionales y ambientales*

La exposición a ciertos factores carcinógenos ambientales aumenta el riesgo de padecer cáncer de pulmón. Entre los principales factores carcinógenos nos encontramos el

asbesto, el radón, el arsénico, el cromo, el formaldehído, los hidrocarburos aromáticos, las radiaciones ionizantes o la contaminación atmosférica<sup>32,33</sup>.

El asbesto es un factor de riesgo muy conocido para el cáncer de pulmón. El riesgo de cáncer por la exposición a asbesto aumenta de manera sinérgica si también existe exposición al tabaco<sup>34</sup>. Actualmente en países occidentales la exposición a asbesto es mínima, dado que los gobiernos de los diferentes países han eliminado su uso en el trabajo y en los productos del hogar. El cáncer que más se relaciona con este factor es el cáncer de pulmón, sin embargo, el tumor más característico es el mesotelioma<sup>35</sup>.

Otro factor muy conocido es el radón, que es un gas invisible, inodoro e insípido. Es la principal causa de cáncer de pulmón en aquellos pacientes no fumadores y que no tienen mutaciones *driver*. Este gas radioactivo se produce por la semidesintegración natural del uranio, emitiendo partículas alfa radiactivas que cuando impactan en las células del epitelio pulmonar pueden causar alteraciones genético-moleculares y finalmente un cáncer<sup>36,37</sup>.

#### Factores genéticos

A diferencia de otras neoplasias, no se han establecido alteraciones genéticas de transmisión hereditaria involucradas en la génesis del cáncer de pulmón. Únicamente se ha especulado con una mayor susceptibilidad relacionada con alteraciones en los mecanismos de detoxificación y reparación celular. Se ha calculado que aquellas personas con familiares de primer grado afectados de cáncer de pulmón tienen entre 1.5-5 veces más riesgo de desarrollar esta neoplasia<sup>38</sup>. Las enzimas más importantes en la susceptibilidad al cáncer de pulmón son: (1) enzima aril-hidrocarburo-hidroxilasa que interviene en el metabolismo del benzopireno; (2) glutatión S-transferasa M1 (*GSTM1*); (3) N-acetiltransferasa 2 (*NAT2*)<sup>39</sup>.

#### Enfermedades pulmonares previas

Determinados subtipos de carcinoma de pulmón derivan de cicatrices pulmonares secundarias a enfermedades pulmonares previas<sup>40</sup>. La proliferación atípica de células epiteliales secundarias a lesiones crónicas pulmonares son la causa de este aumento, siendo el subtipo adenocarcinoma el más frecuente de todos. Las enfermedades que más frecuentemente causan cicatrices en el parénquima pulmonar son la bronquitis crónica, la tuberculosis, bronquiectasias, infartos pulmonares con necrosis posterior asociada,

fibrosis pulmonar idiopática (un 10% de estos pacientes fallece de cáncer de pulmón) y esclerodermia<sup>41,42</sup>.

### Dieta

En los últimos años ha crecido un especial interés por el papel que podría jugar la dieta como factor protector o de riesgo para el cáncer de pulmón<sup>43</sup>. Aunque no se ha logrado caracterizar el papel de los diferentes alimentos en el cáncer de pulmón los diferentes estudios establecen que el consumo de frutas, verduras, grasas y ácido fólico pueden variar el riesgo a desarrollar neoplasias pulmonares, disminuyendo el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón a lo largo de la vida<sup>44</sup>.

## **Bases histopatológicas del cáncer de pulmón**

### Histopatología

Entre las diversas clasificaciones nosológicas del cáncer de pulmón, la clasificación anatomopatológica más utilizada es la de la OMS de tumores epiteliales pulmonares, y la clasificación de adenocarcinomas de la *International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) /American Thoracic Society/European Respiratory Society*<sup>45</sup>. Más del 99% de los cánceres de pulmón son de estirpe epitelial, es decir, carcinomas, y se distinguen principalmente cuatro variantes de cáncer de pulmón<sup>46</sup>:

- Adenocarcinoma
- Carcinoma epidermoide o escamoso
- Carcinoma de células grandes
- Carcinoma de célula pequeña

El último de ellos tiene un comportamiento clínico diferente que implica un planteamiento terapéutico distinto al resto de subtipos de cáncer de pulmón (los cuales se denominan cáncer de pulmón no microcítico, CPNM). Dentro del CPNM, el adenocarcinoma es el subtipo histológico más frecuente en el mundo occidental (45-50%) y está experimentando una elevación significativa, fundamentalmente por un diagnóstico más certero por técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) en tumores indiferenciados<sup>47</sup>. El carcinoma epidermoide es el segundo subtipo más frecuente, seguido de lejos por el

carcinoma de células grandes<sup>48</sup>. La distribución actual de los diferentes subtipos de cáncer de pulmón se encuentra en la Figura 5<sup>49</sup>.

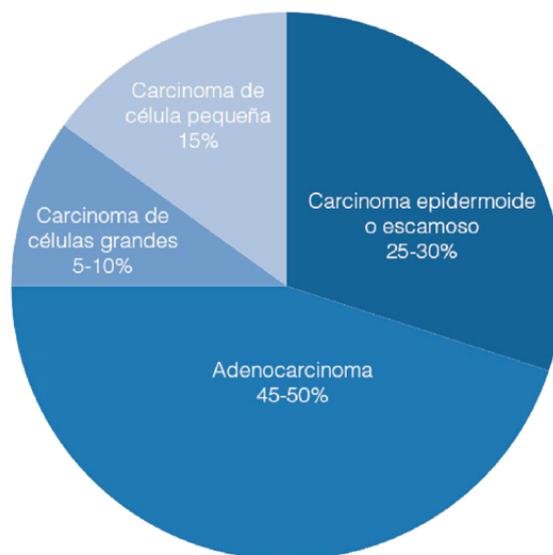


Figura 5. Distribución mundial de los subtipos de cáncer de pulmón. Inamura K, 2017<sup>49</sup>.

### Inmunohistoquímica

Con la llegada de los diferentes tratamientos para los diversos subtipos de cáncer de pulmón, se ha vuelto cada vez de mayor importancia un diagnóstico anatomo-patológico de certeza. Cuando las características microscópicas de estos tumores no nos permiten determinar el subtipo correcto de cáncer de pulmón, la información adicional mediante marcadores inmunohistoquímicos es fundamental<sup>50</sup>. Esta técnica cobra una especial importancia en tumores de pulmón de célula no pequeña indiferenciados, en los cuales la IHQ nos puede determinar si la muestra analizada es un carcinoma epidermoide o un adenocarcinoma<sup>51</sup>.

La expresión aumentada de TTF-1 (factor de transcripción 1 del tiroides) y/o napsina A en tumores de célula no pequeña indiferenciados, favorece el diagnóstico de adenocarcinoma<sup>52,53</sup>. La expresión elevada de citoqueratina (CK), especialmente la citoqueratina 5 y 6, y/o p63 (un miembro de la familia de p53) favorece el diagnóstico de un carcinoma epidermoide<sup>54</sup>. Un porcentaje de CPNM pobremente diferenciado puede no mostrar una clara diferenciación de marcadores por IHQ, y por lo tanto tener que ser clasificado como un CPNM indiferenciado.

La IHQ también puede ser utilizada para confirmar la diferenciación neuroendocrina dentro de un tumor. Los marcadores neuroendocrinos incluyen CD56 o la molécula de adhesión de células neurales (NCAM), sinaptofisina y cromogranina A<sup>55</sup>. La mayoría de las veces se utiliza una combinación de estas tinciones para establecer un diagnóstico certero. Estos marcadores apoyan una diferenciación neuroendocrina, pero no distinguen entre tipos específicos de tumores neuroendocrinos. El resumen de los marcadores de IHQ más comunes usados en cáncer de pulmón se encuentra en la Tabla 1.

**Tabla 1. – Marcadores de IHQ hallados en los diferentes subtipos de cáncer de pulmón.**

<i>Tipo de tumor</i>	<i>Marcador de inmunohistoquímica</i>
Carcinoma escamoso	CK5/6, p63, p40, CK7
Adenocarcinoma	CK7, TTF1, Napsina A
Carcinoma <i>in situ</i> o adenocarcinoma mucinoso invasivo	CK7, CK20, cdx-2, raramente TTF-1
Carcinoma neuroendocrino de célula grande	Diferentes CK, TTF-1, CD56, cromogranina A, sinaptofisina
Tumor carcinoide típico	Diferentes CK, TTF-1, CD56, cromogranina A, sinaptofisina
Tumor carcinoide atípico	Diferentes CK, TTF-1, CD56, cromogranina A, sinaptofisina
Diferenciación con otros tumores primarios	
• Adenocarcinoma de colon	CK20+/CK7-
• Pulmón, mama, páncreas, tracto gastrointestinal superior	CK7+/CK20-
• Urotelial	CK7+/CK20+
• Próstata	CK7-/CK20-
• Mesotelioma	Calretinina, WT1, CK5/6
• Melanoma	S-100, HMB-45, Melan-A

### Biología molecular

Los procesos específicos que desencadenan la transformación maligna de las células broncoepiteliales se desconocen en la gran mayoría de los casos. La contribución del carcinógeno a la transformación está modulada por una serie de variaciones genéticas, las cuales afectan a aspectos metabólicos como la conversión de metabolitos inactivos en activos con propiedades carcinogénicas<sup>56</sup>. Esta serie de sucesos dependen de variantes polimórficos en los genes de susceptibilidad conocidos al cáncer de pulmón, y por tano su contribución al cáncer de pulmón es importante, aunque baja de manera global<sup>57</sup>. Los estudios además sugieren la existencia de una predisposición familiar al cáncer de pulmón que es independiente de la exposición a carcinógenos, sin embargo, actualmente se desconoce en gran medida<sup>58,59</sup>.

Los factores ambientales, modificados por la herencia genética, probablemente afecten a genes específicos que regulan vías de crecimiento y desarrollo celular, para posteriormente habilitar las características moleculares de los tumores<sup>60</sup>. Las mutaciones somáticas más importantes en cáncer de pulmón se encuentran en los genes *RAS*, *RB*, *TP53*, *AKT*, *LKB1* y *BRAF*<sup>61</sup>. Sin embargo, las alteraciones más importantes en la clínica en cáncer de pulmón son las mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), en la kinasa de linfoma anaplásico (*ALK*) y en el gen *ROSI*<sup>62</sup>. Las mutaciones en *EGFR* varían en función de la población a estudio, de esta manera en el mundo occidental alrededor del 10% de los cánceres de pulmón son *EGFR* mutado, elevándose hasta un 35% en poblaciones asiáticas (Figura 6)<sup>63,64</sup>. Las mutaciones de este gen se localizan fundamentalmente en los exones 19 (mutaciones por desplazamiento del marco de lectura) y 20 (la más frecuente L858R), que dan como resultado una activación constitutiva de *AKT*<sup>65</sup>. Estas variantes presentan unas tasas de respuesta muy altas (del 60 al 90%) a los inhibidores específicos de la tirosina quinasa (ITK) como gefinitib o erlotinib<sup>66,67</sup>. Las fusiones de los genes *ALK* y *ROSI* se ha medido su prevalencia en cáncer de pulmón en alrededor al 3-7% la primera de ellas y 2% la segunda<sup>68</sup>. Estas mutaciones junto con las de *EGFR* se asocian a pacientes con tumores en una edad más joven, sin antecedentes de tabaquismo y con un subtipo histológico de adenocarcinoma. Las respuestas a estos fármacos son muy elevadas con respuestas duraderas en el tiempo. Sin embargo, a lo largo de los meses o años estos pacientes desarrollan resistencias a los tratamientos de primera línea. El mecanismo más común de resistencia adquirida a *EGFR* es la mutación del exón 20 que resulta en la sustitución de treonina por metionina en la

posición 790 (T790M). Esta mutación provoca resistencia primaria a los ITK en un 1% de los pacientes, pero aumenta hasta el 50% en resistencias secundarias o adquiridas<sup>69</sup>.

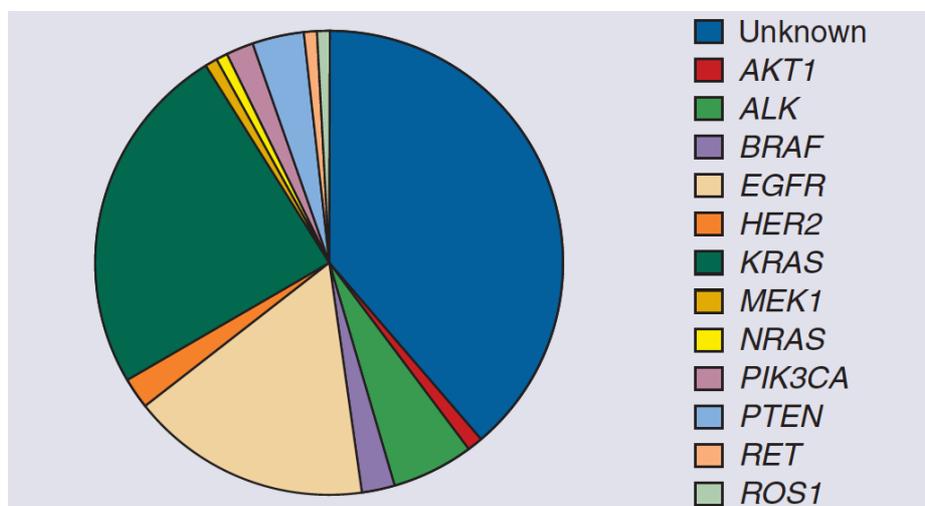


Figura 6. Mutaciones conductoras o “driver” halladas en cáncer de pulmón

Además de las mutaciones en *EGFR*, *ALK* y *ROS1*, se han descubierto otras mutaciones conductoras o “driver”, las cuales son clave en el desarrollo tumoral. Las mutaciones en *BRAF*, *PI3KCA*, *NRAS*, *AKT1*, *MET*, *NRAS*, *MEK1* y fusiones del gen *NTRK*, ocurren en menos del 1-3% de los tumores de pulmón, fundamentalmente subtipo adenocarcinoma (Tabla 2)<sup>70,71</sup>. Actualmente se encuentran en desarrollo multitud de estudios para el desarrollo de inhibidores específicos de estas mutaciones, algunos de los cuales ya se encuentra comercializados.

**Tabla 2. – Alteraciones moleculares más comunes en cáncer de pulmón**

<i>Tipo de tumor</i>	<i>Alteraciones moleculares</i>
Carcinoma escamoso	<i>TP53</i> , p16, 3p, <i>EGFR</i>
Adenocarcinoma	<i>TP53</i> , p16, <i>KRAS</i> , <i>EGFR</i> , <i>HER2/neu</i> , COX2
Carcinoma de células grandes	<i>KRAS</i> , <i>TP53</i> , p16
Carcinoma microcítico	<i>RB</i> , <i>TP53</i> , <i>BCL-2</i> , 3p21, <i>FHIT</i> , 3p22-24 5q21, 9p21

## **Bases clínicas del cáncer de pulmón**

### **Manifestaciones clínicas**

La mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón suelen tener síntomas clínicos al momento del diagnóstico, siendo los diagnósticos casuales poco frecuentes en esta enfermedad<sup>72</sup>. Es importante tener en cuenta que hasta el 90% de los pacientes con cáncer de pulmón han sido fumadores, y por tanto presentan enfermedades relacionadas con el tabaquismo como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), siendo difícil diferenciar los síntomas propios del tumor de los basales del paciente<sup>73</sup>.

Las manifestaciones clínicas del cáncer de pulmón pueden depender de diversos aspectos como son: el subtipo histológico, localización anatómica del tumor, diseminación locorregional, metástasis a distancia, síndromes paraneoplásicos o ser el resultado de una combinación de estos mecanismos (Tabla 3). Más del 90% de los pacientes con cáncer de pulmón presentará síntomas en el momento del diagnóstico, siendo la tos el síntoma más frecuente<sup>74</sup>.

**Tabla 3. – Frecuencia de aparición de síntomas en el cáncer de pulmón**

<b><i>Síntomas y signos</i></b>	<b><i>Frecuencia (%)</i></b>
Tos	75
Pérdida de peso	70
Disnea	60
Dolor torácico	50
Hemoptisis	35
Dolor óseo	30
Fiebre	20
Síndrome de vena cava superior	5
Disfagia	2
Estridor	2

La diseminación metastásica del cáncer de pulmón es bastante frecuente tanto por vía hematológica como por linfática. Casi un 50% de los pacientes con cáncer de pulmón van

a tener enfermedad diseminada al diagnóstico, y un tercio de ellos tendrá clínica asociada a estas metástasis. Los lugares más frecuentes donde asientan las metástasis son el pulmón, suprarrenales, hígado, hueso y sistema nervioso central (Tabla 4)<sup>75</sup>.

**Tabla 4. – Frecuencia de aparición de metástasis en el cáncer de pulmón**

<i>Localización</i>	<i>Frecuencia (%)</i>
Suprarrenales	20-45
Hígado	20-35
Huesos	20-30
Sistema nervioso central	15-20
Adenopatías supraclaviculares	15-20
Corazón	20
Riñón	10-15
Pleura	10-15

#### **Estadificación del cáncer de pulmón**

La estadificación del cáncer de pulmón pretende establecer la situación del tumor de acuerdo con el patrón habitual de diseminación de esta neoplasia, y para ello se utiliza el sistema TNM. Inicialmente, la clasificación TNM fue propuesta en 1946 por Denoix, y desde ese momento ha sufrido múltiples reclasificaciones realizadas en diferentes consensos<sup>76</sup>. La estadificación del cáncer de pulmón se incorporó al sistema de estadificación TNM en 1966. Sin embargo, fue en 1973 cuando se hizo una revisión profunda del sistema de estadificación en cáncer de pulmón por el Dr. Mountain et al., con una publicación titulada “*A Clinical Staging System for Lung Cancer*”<sup>77</sup>. Durante los 25 años siguientes, el sistema de estadificación sufrió tres modificaciones importantes, todas basadas sobre la realizada en 1973. Entre 1997 y 2009, IASLC desarrolló una base de datos de más de 81.000 pacientes con cáncer de pulmón, la mayoría de ellos europeos y estadounidenses. Mediante estos datos ha realizado las últimas clasificaciones del sistema de estadificación en sus 7º y 8º ediciones. Esta última es la última actualización que data del año 2015<sup>78</sup>.

Actualmente, la mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón se diagnostican en estadios avanzados. Se calcula que aproximadamente el 50% de los pacientes lo hacen con una masa irreseccable o metastásica. El estadio al diagnóstico actualmente en cáncer de pulmón es: estadio I 24%, estadio II 7%, estadio III 31% y estadio IV 38%. La actual clasificación del cáncer de pulmón en su 8º edición se resume en el anexo 4 y 5<sup>79</sup>.

Existen tres puntos en esta clasificación los cuales la diferencian de otras clasificaciones en otros tumores diferentes. El primer punto tiene en cuenta la peculiaridad en cáncer de pulmón que establece que sus principales metástasis son en el propio pulmón. Los “nódulos satélites”, situados en el mismo lóbulo que el tumor primario, se clasifican con T3. Sin embargo, los nódulos que se localizan en cualquier otro lóbulo del mismo pulmón deben considerarse T4 y en el pulmón contralateral como metástasis y, por lo tanto, M1a. El segundo punto tiene en cuenta la existencia de derrame pleural o pericárdico, que debe considerarse de entrada como M1a. A pesar de que la citología del líquido sea negativa se debe tener una elevada sospecha diagnóstica. Únicamente puede considerarse negativo el líquido pleural o pericárdico cuando el estudio citológico sea negativo para malignidad y hubiera datos clínicos para considerar una etiología no neoplásica del derrame<sup>80</sup>.

Existen estructuras en el mediastino que por su importancia fisiológica presentan una categoría especial en el estadiaje del cáncer de pulmón y es importante tenerlas en cuenta. Así, la parálisis de las cuerdas vocales, por afectación de la rama recurrente del nervio laríngeo, la obstrucción de la vena cava superior, la compresión de la tráquea o del esófago pueden producirse por la extensión directa del tumor primario o de los ganglios linfáticos. Dada su importancia, la afectación de estas estructuras debe clasificarse como T4 o N2-N3, y por lo tanto, se incluyen dentro del estadio IIIB. El hecho de estar incluido en este estadio hace que el abordaje de elección no sea el quirúrgico, sino una intención neoadyuvante con quimiorradioterapia<sup>81</sup>.

## ***TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN***

El tratamiento de los tumores de pulmón puede dividirse en dos categorías, por un lado, los CPNM y por otro los cánceres de pulmón de célula pequeña. Dado que el tema de la tesis actual versa sobre factores predictivos de resistencia a la inmunoterapia en CPNM, el tratamiento aquí expuesto es únicamente para el CPNM, no abordando los tumores de célula pequeña al ser tumores de origen, pronóstico y tratamiento no comparable al anterior.

### **Tratamiento en estadios localizados**

Alrededor de un tercio de los pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón lo son en estadios I y II. El tratamiento estándar inicial de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico estadio I y II y un buen estado funcional es la cirugía<sup>82</sup>. La lobectomía con linfadenectomía hiliomediastínica constituye el tratamiento quirúrgico estándar, reservando la neumonectomía cuando no sea posible la lobectomía<sup>83</sup>. En tumores T1 la segmentectomía o resección en cuña es una opción valorable con tasas de supervivencia similares a cirugías más agresivas<sup>84</sup>. Aproximadamente en el 25-30% de los pacientes con CPNM se puede realizar un abordaje curativo de inicio, con una supervivencia a 5 años que oscila entre el 25-67%<sup>85</sup>.

Tras la cirugía es fundamental plantear un tratamiento adyuvante en función de las características del tumor primario y los factores de riesgo asociados tras la cirugía. En el año 1998 se publicó un meta-análisis (estudio PORT), de referencia actualmente, que incluía antiguos estudios randomizados que evalúan el papel de la radioterapia postoperatoria en cáncer de pulmón. El estudio demostró que la radioterapia postoperatoria incrementa el riesgo relativo de muerte en un 21% en aquellos pacientes que la recibieron (Figura 7)<sup>86</sup>.

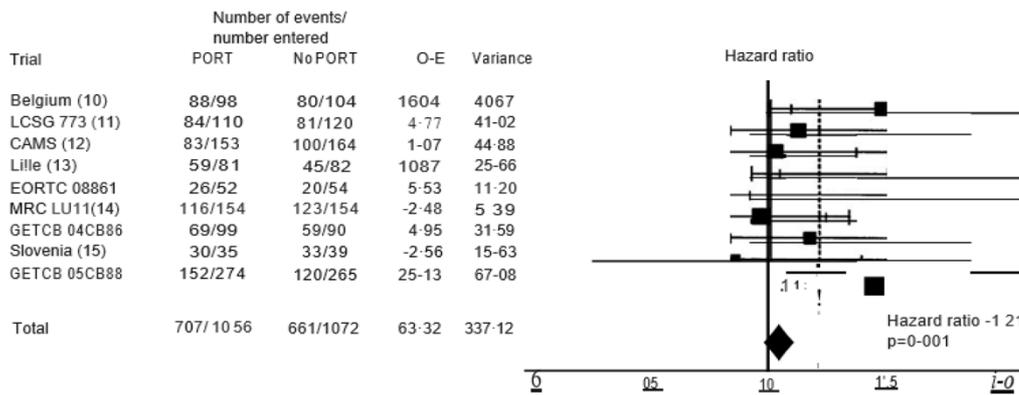


Figura 7. Resultados de meta-análisis PORT. PORT Meta-analysis Trialist Group, 1998<sup>86</sup>

Por lo tanto, en la actualidad no se recomienda la radioterapia postoperatoria en aquellos pacientes con tumores en estadio I y II.

La quimioterapia adyuvante en estadios localizados de cáncer de pulmón, sobretodo en estadio II o presencia de factores de riesgo ha mostrado un beneficio más consistente que la radioterapia postoperatoria.

El estudio más grande publicado hasta la actualidad que evalúa la adyuvancia es el estudio IALT (*International Lung Cancer Collaborative Group Trial*), en el año 2004<sup>87</sup>. En este estudio, se reclutaron 1867 pacientes con cáncer de pulmón, estadio I al III y con resección quirúrgica completa. Los pacientes se aleatorizaron a recibir quimioterapia adyuvante frente a no tratamiento (Figura 8).

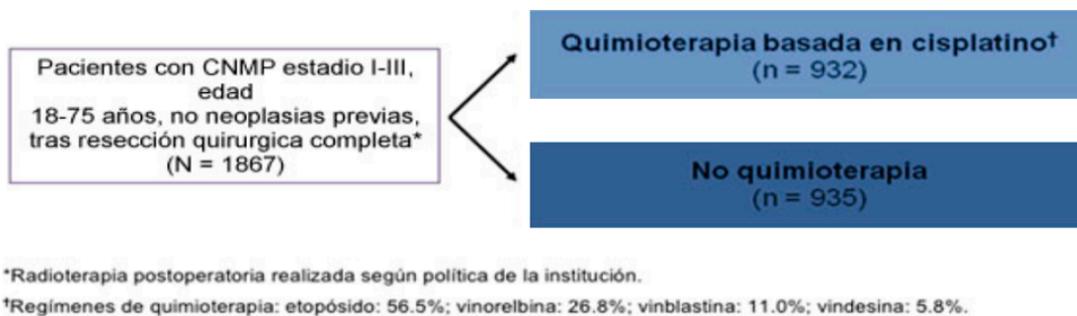


Figura 8. Aleatorización realizada en el estudio IALT. Arriagada R et al., 2004<sup>87</sup>

El objetivo primario fue la supervivencia global (SG). Los pacientes que estuvieron en el brazo de tratamiento recibieron tratamiento con cisplatino (80-100mg/m<sup>2</sup>) más etópósido más vinorelbina, vinblastina o vindesina<sup>88,89</sup>. Aproximadamente el 25% de los pacientes

a mayores recibieron radioterapia postoperatoria. Los resultados mostraron que los pacientes que recibieron tratamiento adyuvante tenían una supervivencia a 5 años del 44.5%, respecto a un 40.4% de los pacientes tratados con cirugía exclusivamente (HR 0.86;  $p < 0.03$ ). Además, la supervivencia libre de enfermedad (SLE) fue del 39.4% en pacientes que recibieron adyuvancia frente a 34.3% en pacientes con cirugía exclusivamente ( $p < 0.003$ ). En el análisis por subgrupos, el beneficio fue mayor para aquellos pacientes en estadio III. Por tanto, las recomendaciones actuales establecen la quimioterapia adyuvante de manera estándar en estadios II-III A y únicamente si existen dudas en pacientes con estadio IB (factores de riesgo asociados)<sup>90</sup>. Recientemente, se ha demostrado el beneficio de la inmunoterapia en la adyuvancia del CPNM en estadios I-III. En mayo de 2022 la *Food and Drug Administration* (FDA) ha aprobado el uso de atezolizumab para el tratamiento adyuvante del CPNM en estadios II-III A con expresión de PD-L1  $\geq 1\%$  en base a los resultados del estudio IMpower010. Su indicación en Europa está pendiente de estudio por las autoridades la Agencia Europea del Medicamento (EMA)<sup>91</sup>.

### **Tratamiento en estadios localmente avanzados**

Más de un tercio de los pacientes con CPNM debuta con enfermedad localmente avanzada<sup>92</sup>. El estadio III constituye un grupo heterogéneo de pacientes definido por diferentes subestadios (IIIA, IIIB y IIIC), siendo su tratamiento un verdadero reto dadas las diferencias existentes entre la presentación de los tumores en los diferentes pacientes pese a tener el mismo estadio. Hoy en día, es sabido que todos los pacientes se benefician de un manejo multidisciplinar que incluya quimioterapia y un tratamiento local en forma de cirugía, radioterapia o ambos. El principal factor a tener en cuenta en el tratamiento es la afectación ganglionar en mediastino<sup>93</sup>. El estudio realizado por Andre et al., demostró la gran diferencia en pronóstico entre aquellos pacientes con estadio IIIA que eran N2 frente a los N1<sup>94</sup>. Por tanto, en todos los pacientes con CPNM estadio III es recomendable la realización de un PET a mayores de un TC<sup>95</sup>. Una vez confirmado el estadio y subestadio exacto del paciente se debe hacer una valoración en comité multidisciplinar del caso para evaluación de la mejor estrategia terapéutica a seguir.

El resumen del tratamiento que tradicionalmente se ha seguido en los pacientes es<sup>96-98</sup>:

- Estadio IIIA resecable: manejo mediante quimioterapia neoadyuvante seguido de cirugía. Sin embargo, existen algunos datos que avalan el papel de la cirugía de entrada en subgrupos de pacientes con estadio IIIA (sobretudo pacientes con tumores T3N1 o T4N0-1), así como del papel de la quimioterapia o de quimioterapia más radioterapia concurrente previa a la cirugía en algunos estadios IIIA con afectación N2 en una única estación ganglionar. Asimismo, el papel de la inmunoterapia en la neoadyuvancia de estos pacientes cada vez presenta un papel mayor desde la presentación de los datos del estudio CheckMate 816, que muestra un claro beneficio del tratamiento neoadyuvante con inmunoterapia en términos de supervivencia libre de progresión y respuestas completas patológicas<sup>99,100</sup>.
- Estadio IIIA irresecable o estadios IIIB/C: manejo mediante quimioterapia y radioterapia concurrente, y si no es posible secuencial. La quimiorradioterapia concurrente radical sin cirugía se considera el estándar de tratamiento. Este esquema se basa en un modelo conceptual que se dirige a dos compartimentos. Por un lado, mediante la radioterapia se trata la enfermedad locorregional en el tórax, y por otro un compartimento sistémico mediante la quimioterapia. Además, la quimioterapia puede ejercer un efecto radiosensibilizante y conseguir la citorreducción de una enfermedad locorregional voluminosa. Inicialmente los estudios aleatorizados mostraron que la quimioterapia secuencial basada en platino seguida de radioterapia era superior en supervivencia que la radioterapia sola (Tabla 5)<sup>101-103</sup> y, estudios posteriores, que la quimiorradioterapia concurrente es superior a los esquemas secuenciales, de modo que hoy en día el tratamiento estándar para los pacientes con CNMP estadio III irresecable es la administración de quimiorradioterapia concurrente (Figura 9)<sup>104</sup>. Posteriormente, en estos pacientes juega un papel clave la inmunoterapia de mantenimiento, cuya indicación actual es para pacientes tras este tratamiento con PD-L1  $\geq$  1% en células tumorales (estudio PACIFIC)<sup>105</sup>.

**Tabla 5. – Resultados de los ensayos clínicos fase III comparando radioterapia con quimiorradioterapia secuencial.**

Investigadores	n	SLE (meses) QT/RT frente RT	SG 3 años QT/RT frente RT
Dillman CALGB 8433 1990, 1996	180	13.8 frente 9.7	24 frente 10
Sause Intergroup 1987, 2000	58	13.8 frente 11	15 frente 6
Le Chevalier 1991	353	12 frente 10	11 frente 5

A

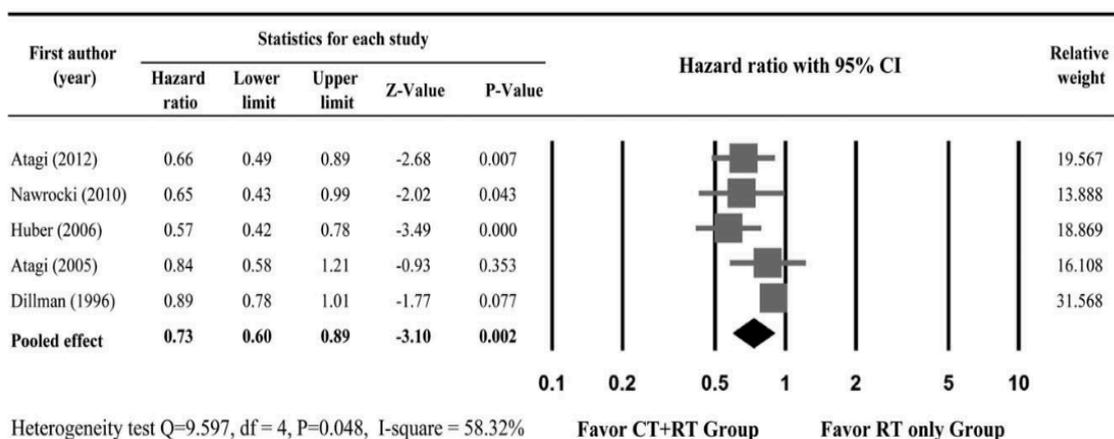


Figura 9. Resultados del metanálisis realizado por Hung MS y sus colaboradores en valores de SLE. Hung MS et al., 2019<sup>104</sup>.

### **Tratamiento en estadios avanzados**

Dados los actuales avances en el tratamiento del CPNM avanzado, junto con los objetivos marcados para esta tesis, en este apartado se habla de todos los diferentes tratamientos basados en inmunoterapia y que se encuentran estandarizados en los protocolos de tratamiento en España. Se excluyen de este apartado debido a estas razones tratamientos de inmunoterapia en CPNM como cemiplimab en primera línea para PD-L1  $\geq 50\%$  o la combinación de ipilimumab más nivolumab y quimioterapia en primera línea independiente de la expresión de PD-L1.

- ***Inmunoterapia en primera línea de tratamiento***

El estudio KEYNOTE-024 estableció el papel de pembrolizumab como tratamiento de primera línea en pacientes con CPNM avanzado sin mutación de *EGFR* o *ALK*<sup>106</sup>, cuyo tumor presenta una expresión de PD-L1  $\geq 50\%$ , detectado mediante IHQ con el anticuerpo 22C3<sup>107</sup>. Este estudio aleatorizó a 305 pacientes con CPNM avanzado con expresión de PD-L1  $\geq 50\%$  a recibir pembrolizumab en monoterapia (200mg intravenoso cada 3 semanas) hasta un máximo de 2 años, frente a 4-6 ciclos de quimioterapia estándar con un doblete de platino.

Con una mediana de seguimiento de 11.2 meses, se objetivó un beneficio en SLP de 10.3 frente 6 meses (HR 0.50) y una tasa de respuesta objetiva (TRO) de 45 frente 28% (Figura 10). La mediana de duración de respuesta fue de 12.1 y de 5.7 meses respectivamente. Con un seguimiento de 25 meses, se objetivó un aumento de SG de 30 frente 14.2 meses (HR 0.63). La toxicidad grado 3 o mayor fue menor con pembrolizumab que con quimioterapia (27 frente 53%) y los resultados de calidad de vida también beneficiaron a pembrolizumab.

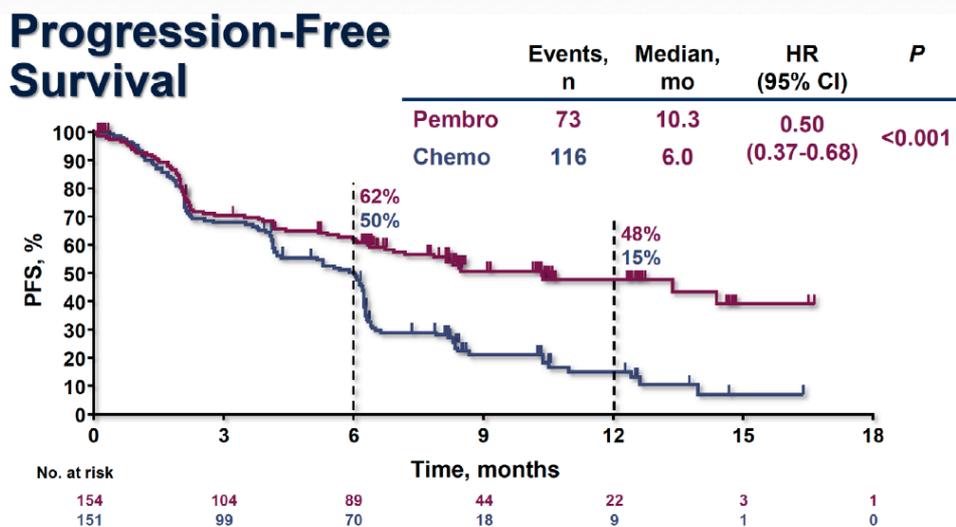


Figura 10. Resultados del ensayo clínico KEYNOTE-024<sup>106</sup>. Reck M et al., 2016.

Posteriormente se realizaron dos estudios de combinación de quimioterapia más inmunoterapia en función de la histología del tumor. El ensayo KEYNOTE-189<sup>108,109</sup>, aleatorizó a pacientes con CNMP avanzado de histología no escamosa, ECOG 0-1, sin mutación de EGFR o translocación de ALK, con independencia de expresión de PD-L1 a recibir tratamiento de quimioterapia con cisplatino o carboplatino más pemetrexed más

pembrolizumab (200mg dosis total) o placebo cada 3 semanas por 4 ciclos, seguido de mantenimiento hasta 35 ciclos con pemetrexed más pembrolizumab o placebo. Se demostró un beneficio significativo en SLP (8.8 frente 4.9 meses; HR 0.52 IC 95% 0.43 – 0.64) y en SG (HR 0.49 IC 95% 0.38 – 0.64) en el brazo de pembrolizumab. En un análisis de estratificación por subgrupos se observó que el beneficio en SLP era para el grupo con expresión de PD-L1 entre 1 y 49% (HR 0.55 IC 95% 0.37 – 0.81) y con PD-L1  $\geq$  50% (HR 0.42 IC 95% 0.26-0.68), y no mostrando diferencias de SLP ni SG la combinación de quimioterapia más Pembrolizumab respecto a la no combinación para PD-L1 <1% (HR 0.75 IC 95% 0.53 – 1.05) (Figura 11). La combinación con pembrolizumab no ha mostrado un aumento de los efectos secundarios en ninguno de los grados de toxicidad.

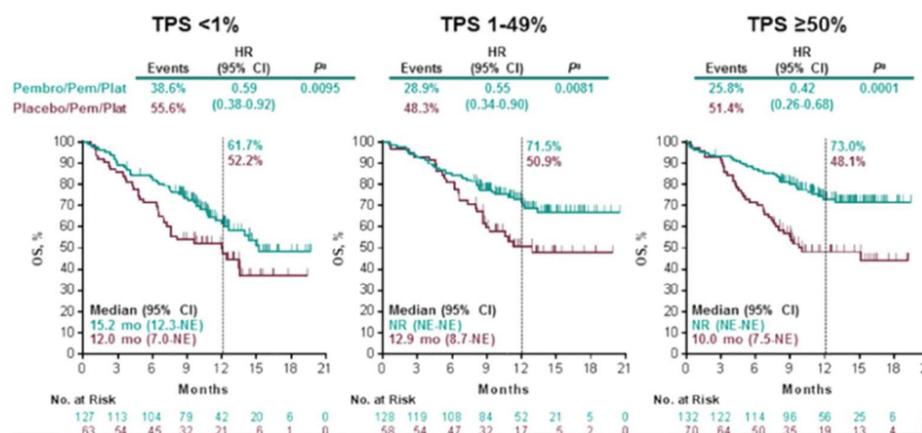


Figura 11. Resultados del ensayo clínico KEYNOTE-189<sup>108</sup> por subgrupos en función de los valores de PD-L1. Gandhi L et al., 2018.

Junto con el estudio anterior, se realizó el ensayo clínico KEYNOTE-407<sup>110-111</sup>, el cual aleatorizó pacientes con CNMP avanzado con histología escamosa a recibir tratamiento con quimioterapia con carboplatino más paclitaxel trisemanal o nab-paclitaxel semanal en combinación con placebo o pembrolizumab por cuatro ciclos seguido de placebo o pembrolizumab de mantenimiento cada tres semanas hasta un máximo de 35 ciclos. La combinación de quimioterapia más pembrolizumab se asoció a una mayor respuesta tumoral (58.4 frente 35%, p = 0.0004) y a una mayor SG (15.9 frente 11.3 meses, HR 0.64, p = 0.0008) así como SLP (6.4 frente 4.8 meses, HR 0.56, p < 0.001). El beneficio en SG fue estadísticamente significativo para los subgrupos con PD-L1 <1% (HR 0.61 IC 95% 0.38 – 0.98) y PD-L1 1-49% (HR 0.57 IC 95% 0.36 – 0.90), sin embargo, no se

observó en el subgrupo con PD-L1  $\geq 50\%$  (HR 0.64 IC 95% 0.37 – 1.10) (Figura 12). En términos de SLP si se observó beneficio para todos los subgrupos analizado independiente de la expresión de PD-L1.

En base a estos resultados se pudo establecer el nuevo estándar de tratamiento de primera línea para CPNM avanzado. La combinación de quimioterapia basada en doblete de platino con pembrolizumab es la elección para todos aquellos tumores con expresión de PD-L1  $<50\%$ . En caso de tumores con expresión mayor o igual al 50%, pembrolizumab en monoterapia ha mostrado similares tasas de respuesta y supervivencia que la combinación con quimioterapia por lo que la elección entre ambas terapias dependerá de las características del paciente (estado general, índice de proliferación tumoral o comorbilidades).

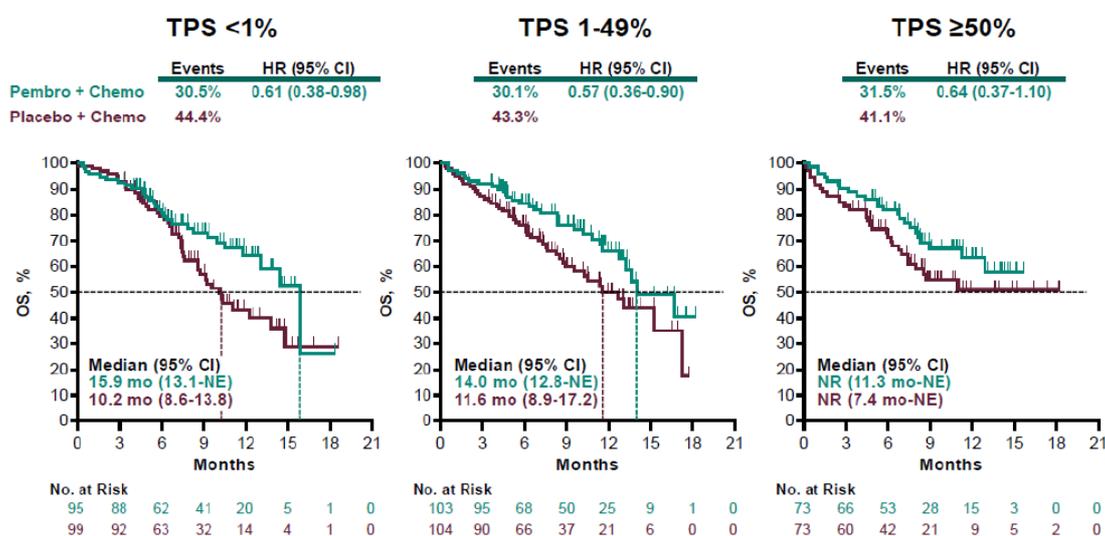


Figura 12. Resultados del ensayo clínico KEYNOTE-407<sup>110</sup> por subgrupos en función de los valores de PD-L1. Paz-Ares L et al, 2018.

Dados los resultados de los estudios mencionados se puede resumir el tratamiento del CPNM avanzado o metastásico en primera línea de la siguiente manera:

- En base a los resultados del estudio KEYNOTE-024 actualmente pembrolizumab en monoterapia constituye el tratamiento estándar en primera línea en pacientes con CNMP avanzado sin mutaciones diana y expresión de PD-L1  $\geq 50\%$ .
- En base al estudio KEYNOTE-189, pembrolizumab en combinación con quimioterapia con platino y pemetrexed está aprobado como tratamiento de primera línea en CNMP avanzado no escamoso sin mutaciones diana.

- En base al estudio KEYNOTE-407, pembrolizumab en combinación con carboplatino y paclitaxel o nab-paclitaxel está aprobado como tratamiento de primera línea en CNMP avanzado de histología escamosa.
- Existen otras opciones recomendadas en primera línea como las combinaciones de quimioterapia con nivolumab e ipilimumab, sin embargo, las recomendaciones en primera línea con pembrolizumab presentan una mayor evidencia.

- ***Inmunoterapia en segunda línea de tratamiento***

Hasta finales de 2015 solo había 3 fármacos aprobados para el tratamiento en segunda línea y sucesivas: docetaxel, pemetrexed y erlotinib<sup>112</sup>. Sin embargo, en los últimos años se ha incorporado nuevos fármacos en segunda línea. Tres moléculas de inmunoterapia han sido aprobadas para el tratamiento de segunda línea del CPNM avanzado que son nivolumab, atezolizumab y pembrolizumab por la EMA. Los tres fármacos han sido aprobados en base a resultados de estudios fase III que han demostrado una mejoría en SG en comparación con docetaxel.

Nivolumab fue el primer agente autorizado en este contexto, en pacientes que ya habían recibido una primera línea de tratamiento. Dos ensayos pivotaes, CheckMate 057<sup>113</sup> en histología no escamosa, y CheckMate 017<sup>114</sup> en histología escamosa, han sido los que han conseguido la aprobación del fármaco, ambos en comparación con docetaxel. Estos estudios mostraron la superioridad de nivolumab frente a docetaxel en segunda línea de tratamiento tanto en términos de supervivencia como en respuesta. Posteriormente, atezolizumab y pembrolizumab también fueron aprobados para el tratamiento del CPNM en segunda línea en base a los resultados de los estudios OAK y KEYNOTE-024<sup>106</sup>.

## 2- INMUNOTERAPIA Y CÁNCER

Los primeros trabajos que vinculan el sistema inmune con la actividad antitumoral se pueden remontar a finales del siglo XIX. Fue William Coley quien, en 1891, realizando una inyección intratumoral de bacterias, logró la regresión del tamaño tumoral en un paciente afectado de un sarcoma, sentando las bases de los tratamientos inmunoterápicos en cáncer<sup>115</sup>. Posteriormente, las evidencias han ido acumulándose desde la mitad del último siglo. El análisis histológico de tumores humanos ha revelado la presencia de infiltrados inmunitarios muy heterogéneos entre diferentes tumores y entre pacientes. Estos infiltrados incluyen células de la inmunidad innata (macrófagos, células dendríticas, polimorfonucleares, células naturales *killer* “NK”) y adaptativa que incluyen a diferentes subpoblaciones de células T (linfocitos T citotóxicos, T *helper* o T reguladores “*Treg*”)<sup>116,117</sup>. Se ha sugerido que algunos de estos infiltrados constituyen un intento del huésped por detectar y destruir células tumorales emergentes. A partir de estas observaciones, a finales de la década de 1950, Burnet y Thomas formularon la teoría de la inmunovigilancia del cáncer, según la cual el sistema inmunitario puede reconocer y eliminar células transformadas y tumorales antes de que puedan desarrollarse en tumores clínicamente detectables<sup>118</sup>. Estas evidencias se fundamentan en observaciones tales como que, en individuos con inmunodeficiencias adquiridas o hereditarias y pacientes con tratamiento inmunosupresor, presentan un riesgo significativamente mayor de desarrollar cáncer que la población general<sup>119</sup>.

A pesar de estos datos, es un hecho que los tumores continúan desarrollándose en presencia de un sistema inmunitario completamente funcional<sup>120</sup>. Esto revela la complejidad que existe en la interacción del sistema inmunitario y el tumor. Así, ciertas respuestas inmunitarias pueden ser protectoras contra el desarrollo de tumores, mientras que otras, como la inflamación crónica, pueden promover el inicio y contribuir a la progresión del cáncer<sup>121</sup>. De esta manera, el tumor consigue beneficiarse de las células inflamatorias infiltrantes, modificando el comportamiento de estas para crear un microambiente que favorezca el crecimiento y la supervivencia celular. Ante estas evidencias, se ha sugerido que la teoría de la inmunovigilancia es parte de un proceso más general denominado inmunoedición, que consta de tres fases: eliminación o inmunovigilancia, equilibrio y escape (Figura 13)<sup>122</sup>.

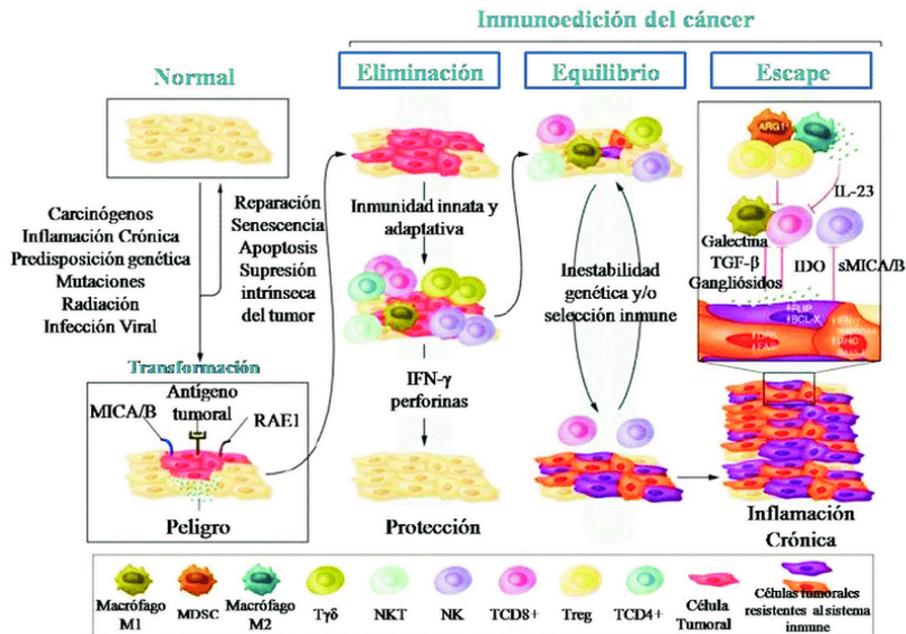


Figura 13. Teoría de la inmunoección. Rondón R et al., 2014<sup>122</sup>.

La teoría de la inmunoección propone que, durante la fase de eliminación, los efectores de la inmunidad ejercen una vigilancia tumoral, suprimiendo el crecimiento del tumor en las etapas más tempranas<sup>123</sup>. En la fase de equilibrio, el sistema inmune del hospedador y las células tumorales que han sobrevivido a la fase de eliminación, entran en un estado temporal de equilibrio dinámico. En esta fase las células tumorales permanecen latentes o acumulan cambios (mutaciones o cambios de expresión génica) que alteran su fenotipo. Finalmente, llega la fase de escape, donde las variantes tumorales que han sobrevivido comienzan a expandirse progresivamente, eludiendo el control del sistema inmune. A nivel clínico esto se acaba traduciendo en el desarrollo maligno de la enfermedad<sup>124</sup>.

En la fase de escape o inmunosubversión, el tumor despliega una serie de estrategias para evitar el ataque del sistema inmune. Estas tácticas se basan tanto en evitar la activación de una respuesta inmunitaria como en reducir la inmunidad celular (inducción de tolerancia)<sup>125</sup>. Estas estrategias se pueden agrupar en cuatro mecanismos: alteración en los procesos de presentación de antígenos, expresión de factores de inmunosupresión, vías de coestimulación negativa en el microambiente tumoral e inducción y reclutamiento de células inmunoregulatoras (células *Treg*, macrófagos asociados a tumor o TAMs, células mieloides supresoras o MDSCs)<sup>126</sup>.

Dentro del tratamiento de los tumores sólidos mediante la inmunoterapia, el mecanismo más importante y a través del cual actúan los diferentes fármacos de inmunoterapia es la vía de coestimulación negativa en el microambiente tumoral. La inhibición de las células T por parte de las células tumorales se realiza a través de dos de las vías inhibitorias mejor descritas en las células T, el receptor proteico *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (CTLA-4)<sup>127</sup> y la proteína de muerte programada 1 o *programmed cell death-1* (PD-1)<sup>128</sup>. Estas dos vías representan en la actualidad los mecanismos fundamentales a través de los que actúan los fármacos de inmunoterapia para tumores sólidos.

- **Receptor CTLA-4**

Uno de los primeros receptores de los puntos de control de inhibición del sistema inmune estudiado fue CTLA-4<sup>129</sup>. La principal función de este receptor es la de actuar disminuyendo la funcionalidad de las células T después de su activación. Entre los mecanismos utilizados se encuentran la coestimulación de la molécula CD28, para que se una con su ligando B7 provocando la detención del ciclo celular. Primero de todo, para que se pueda dar una activación de las células T, además de producirse una interacción con el antígeno mediante las células presentadoras de antígeno (APCs), se necesitan otras señales secundarias para que puedan responder correctamente, entre las cuales se encuentran la expresión de la molécula CD28, más dependientes de las células T CD4+ que las CD8+<sup>130</sup>. Las células T Helper o las también denominadas CD4+ tienen la capacidad de secretar citoquinas al darse el reconocimiento entre el receptor de células T (TCR) y el Antígeno presentado por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad II (CMHII), provocando una estimulación en la secreción de anticuerpos por parte de las células T y B y macrófagos, que se encargan de eliminar sustancias extrañas. Sin embargo, en el caso de las T citotóxicas o las denominadas CD8+, reconocen mediante su receptor de célula T (TCR) a los antígenos presentados por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad I (CMHI) y tienen la capacidad de lisar, para poder protegerse de los efectos negativos de estos<sup>131,132</sup>.

La molécula CD28 se trata de un receptor con una gran importancia a la hora de llevar a cabo la activación de los linfocitos T, ya que al unirse con sus ligandos B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86)<sup>133</sup>, glucoproteínas homólogas de la cadena lateral sencilla presentadas por las APCs, se da lugar a la activación de las señales de supervivencia (Figura 14)<sup>134</sup>. Estas señales se accionan debido a la activación de los genes antiapoptóticos que conllevan a

una proliferación de las células T, además de un aumento en su supervivencia y diferenciación gracias a la liberación de citoquinas como la IL-2 (secretada por los linfocitos T *Helper*. Esta IL-2, además de estimular la proliferación y la expansión clonal, provoca una diferenciación de las células T a Th1<sup>135</sup>.

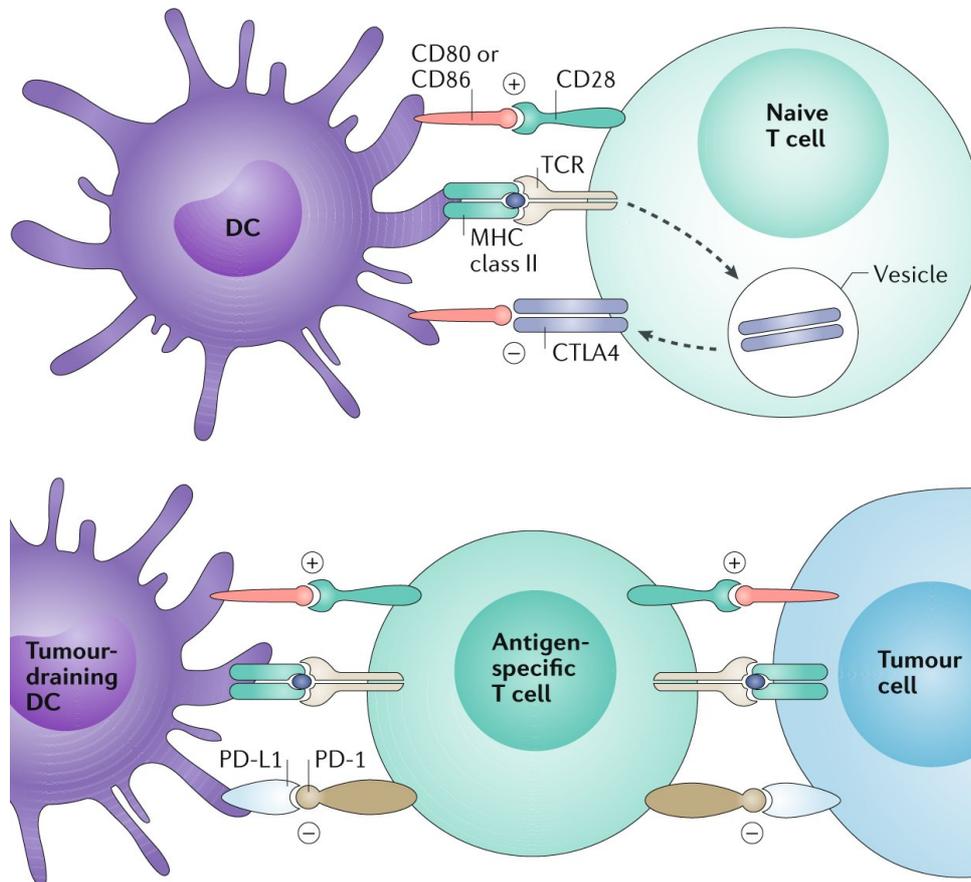


Figura 14. Figura ilustrativa de la expresión del receptor CTLA-4 en las células del sistema inmune. Sury K et al., 2018<sup>134</sup>.

La molécula CTLA-4 es homóloga del receptor CD28, pero con una afinidad mayor por su respectivo ligando B7, sin embargo, una de las principales diferencias, es que al darse la unión de CTLA-4 con su ligando B7, la señal estimuladora se ve inhibida, al contrario de lo que sucede con la unión de CD28 con B7<sup>136</sup>. Es por eso por lo que se considera CTLA-4 una molécula competitiva, cuya finalidad es la de producir la muerte celular<sup>137</sup>.

En una situación fisiológica, normalmente después de darse la activación de las células T mediante la unión de CD28 con su ligando, se produce una retroalimentación gradual provocando una mayor translocación de CTLA-4 en la superficie de la célula para así conseguir mantener una homeostasia inmunológica normal<sup>138</sup>. Al producirse una mayor

expresión de CTLA-4 en la superficie se evita la interacción de CD28 con su ligando B7 y por lo tanto se evita una sobre-activación de las células T<sup>139</sup>. El sistema inmunitario intenta mantener un equilibrio, por eso la presencia de CTLA-4 ejerce un papel esencial en situaciones fisiológicas, tal como se ha podido demostrar en estudios realizados con ratones, en los que al provocar una deficiencia de la molécula CTLA-4 las células T no pueden ser inactivadas y por lo tanto el ciclo celular no se detiene provocando una enfermedad fatal linfoproliferativa<sup>140</sup>.

No obstante, las células cancerígenas utilizan estos mecanismos para hacerse resistentes al ataque del sistema inmunológico. Por lo tanto, consiguen mantener su proliferación mediante su capacidad de sobreexpresar de manera descontrolada CTLA-4 en su superficie, de manera que al competir por el ligando B7 con CD28, evitan la acción de las células T y por tanto su función<sup>141</sup>. Es por eso por lo que, gracias a la gran cantidad de ensayos llevados a cabo en los últimos años, primero en modelos animales y luego en humanos, se usan actualmente los inhibidores de CTLA-4 en la clínica como terapia con anticuerpos, dentro del campo de la inmunoterapia<sup>142</sup>. Al bloquear el efecto de CTLA-4 mediante anticuerpos anti-CTLA4 se da lugar a una disminución en la activación de células T y por tanto permite que más clones puedan participar en la respuesta antitumoral debido a la unión del ligando con la molécula CD28. Los dos anticuerpos anti-CTLA4 más utilizados en la clínica habitual son actualmente el ipilimumab (aprobado para su uso en Europa)<sup>143</sup> y tremelimumab (no aprobado para su uso en Europa)<sup>144</sup>.

- ***Receptor PDI***

Uno de los primeros hallazgos clínicos en el campo de la inmunoterapia fue la molécula PD-1 (*programmed cell death 1*), descubierta por el inmunólogo Tasaku Honjo en el año 1992, en la Universidad de Kioto en Japón<sup>145</sup>. Se trata de una molécula del sistema inmunológico con capacidad de coestimular la inhibición de las células T, actuando en contra de las propias defensas<sup>146</sup>. Esta molécula se expresa en una gran variedad de células inmunes, como las células B, células T, células dendríticas y monocitos. Estas células se protegen de la muerte celular cuando se produce la unión con los ligandos PD-L1 (presentes en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas) o PD-L2 (presente en células hematopoyéticas como células dendríticas, células B y ciertas células epiteliales)<sup>147</sup>. La expresión del ligando PD-L1 es menor que la del ligando PD-L2 a pesar de que éste último presenta mayor afinidad por su receptor<sup>148</sup>. PD-1 regula la activación

de las células T mediante la unión a su ligando (PD-L1 o PD-L2)<sup>149</sup>. Cuando se une al ligando PD-L1 se produce una disfunción y un agotamiento de las células T, haciendo que las respuestas adaptativas de las células T CD4 disminuyan y se de un aumento en la producción de IL-10, cuya función principal es la de disminuir y regular las respuestas inmunes provocadas por las células dendríticas y macrófagos (Figura 15)<sup>150</sup>.

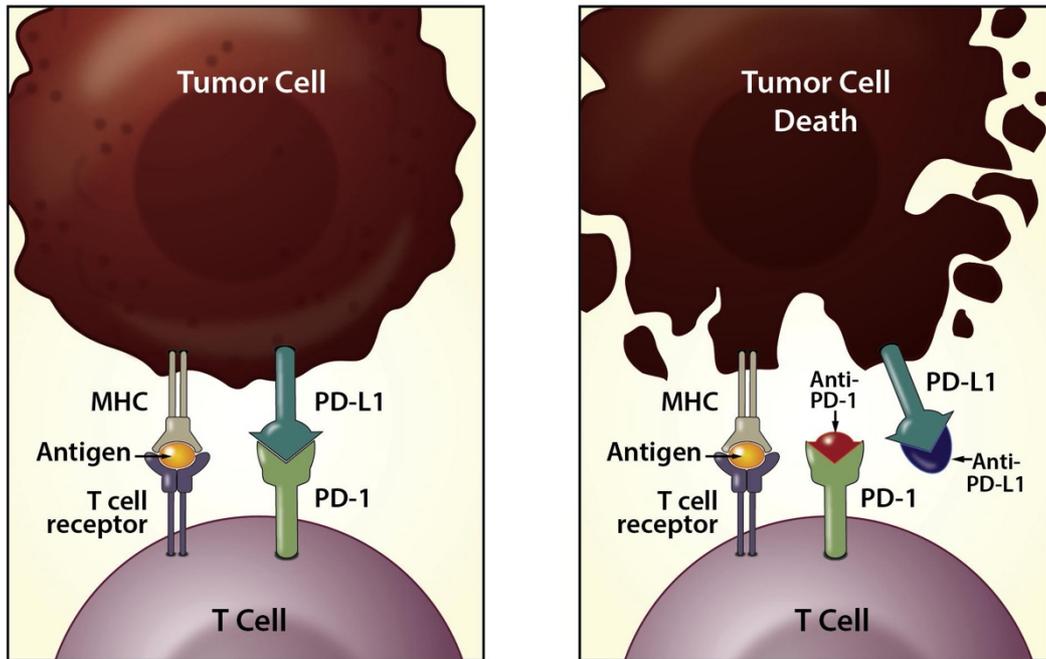


Figura 15. Mecanismo de acción de los fármacos anti-PD1 sobre el receptor PD-1 modulando la respuesta inmune antitumoral. Bellmunt J et al., 2017<sup>150</sup>.

La expresión de PD-1 en la superficie de las células T se activa cuando tiene lugar la unión de la célula T con el antígeno, dando lugar a una estimulación en la liberación de citoquinas inflamatorias, de manera que al tener en el tejido PD-1 activado, se une con su ligando produciendo una tolerancia inmunitaria<sup>151</sup>. La reducción en la activación de las células T se produce debido a la unión de PD-1 y su ligando, que provoca la fosforilación de los motivos de tirosina, como el *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM), causando el reclutamiento de la tirosina fosfatasa-2 (SHP2), encargada de desfosforilar moléculas implicadas en la señalización de TCR, disminuyendo su señal<sup>152</sup>. Además, la expresión de PD-L1 se encuentra regulada positivamente por las quinasas *PI3K-AKT* o por la secreción de IFN-gamma, produciéndose dos tipos de resistencias inmunitarias, la resistencia inmune innata y la resistencia inmune adaptativa. En cuanto a

la resistencia inmune innata, la expresión de PD-L1 está regulada debido a la inhibición del supresor tumoral *PTEN*, por parte de *PI3K-AKT*, que a su vez están activadas por STAT3 y que a su vez está modulada por la liberación de citoquinas inflamatorias como la IL-6<sup>153</sup>. En cuanto a la resistencia inmune adaptativa, la expresión de PD-L1 se induce debido a la secreción por parte de las células tumorales del IFN-gamma (pro-inflamatoria de las células tumorales), que tiene la capacidad de neutralizar las respuestas inmunes antitumorales inducidas por las células T citotóxicas CD8. Por tanto, para evitar que el tejido normal en situaciones inflamatorias se de una sobreactivación de la vía PD-1/PD-L1 y se produzca daño, se produce un bloqueo de esta vía<sup>154</sup>.

Sin embargo, pese a lo anterior, las células cancerígenas pueden hacer que la expresión de PD-L1 en la superficie se aumente, debido a la acción de citoquinas inflamatorias y vías de señalización inmunológicas, aprovechando esta unión del receptor PD-1 con su ligando PD-L1 para escapar de la acción de las células T CD8<sup>155</sup>. Todo ello, deriva en un aumento de la supervivencia y un crecimiento tumoral. Es por lo anterior, que se empezó a investigar vías de actuación sobre estos niveles, para evitar la activación de la vía PD-1/PD-L1 en las células tumorales mediante el uso de anticuerpos con afinidad por estas moléculas. En el año 2006 aparecieron los primeros anticuerpos contra PD-1 y no fue hasta 2009 cuando se empezaron a usar en clínica los anticuerpos contra PD-L1<sup>156</sup>. La principal función de estos anticuerpos es unirse al tanto al receptor como al ligando impidiendo una interacción entre ambos, impidiendo que la señal de TCR disminuya, y por tanto, permitir que las células T realicen su función de ataque contra las células tumorales. Aunque se ha podido demostrar la capacidad de los anticuerpos de bloquear la molécula PD-1 con su ligando PD-L1, no se ha conseguido evitar la interacción con el ligando PD-L2 ya que se desconoce el efecto de dicha interacción<sup>157</sup>.

Tras la realización de diferentes ensayos clínicos con una respuesta satisfactoria, el 22 de diciembre de 2014 se aprobó por la FDA el tratamiento con el anticuerpo anti-PD1 nivolumab para el tratamiento del melanoma metastásico<sup>158</sup>. Posteriormente este fármaco se aprobó en otras indicaciones como cáncer de pulmón, riñón o cáncer de cabeza y cuello<sup>159</sup>. Otras moléculas, posteriormente fueron aprobándose para los diferentes tratamientos de tumores sólidos como pembrolizumab (anti-PD1), cemiplimab (anti-PD1), atezolizumab (anti-PDL1), durvalumab (anti-PDL1), avelumab (anti-PDL1) o relatlimab (anti-LAG3)<sup>160</sup>.

## ***FACTORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA A INMUNOTERAPIA***

Establecer marcadores de respuesta a inmunoterapia es esencial para un mejor conocimiento de la enfermedad que se está tratando, y así mismo, permite la adecuada selección de los pacientes a estudio. La inmunoterapia actual no beneficia a todos los pacientes, y, por lo tanto, se deben identificar aquellos marcadores los cuales identifiquen a aquellos pacientes que mejor respuesta a inmunoterapia vayan a realizar. Hay tres grandes grupos de marcadores: dependientes del tumor, del tumor y de la relación entre ambos, que se desarrollan a continuación, excepto los marcadores genómicos de respuesta a inmunoterapia que por su importancia se desarrollan en el punto 9.

- ***Estado general del paciente***

El estado general del paciente es importante a la hora de la decisión terapéutica, y ha sido factor pronóstico para todos los tipos tumorales (especialmente cáncer de pulmón) y para prácticamente cualquier tipo de tratamiento<sup>161</sup>. La inmunoterapia no presenta citotoxicidad inmediata sobre el tumor, sino que precisa de una latencia, por lo que el estado y características del paciente pueden ser muy importantes a la hora de la decisión terapéutica, ya que el paciente ha de ser capaz de mantener el buen estado general en espera de la respuesta a la inmunoterapia<sup>162</sup>. Se calcula mediante los diferentes ensayos clínicos, que la aparición de la respuesta a los tratamientos anti CTLA-4 o anti PD1 es de alrededor de tres meses, y por tanto, el estado general del paciente debe permitir esperar esta latencia. Esto hace que, si el paciente se encuentra muy sintomático o presenta alteraciones orgánicas importantes como metástasis cerebrales, la inmunoterapia no será la mejor opción terapéutica. En conclusión, la inmunoterapia requiere de un buen estado general de los pacientes para poder realizar su efecto citotóxico, siendo un factor predictivo fundamental de respuesta a los diferentes inhibidores de los puntos de control del sistema inmune<sup>163</sup>.

- ***Lactato deshidrogenasa***

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima catalítica que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, con funciones en el metabolismo anaerobio. La LDH se encuentra elevada en sangre ante toda destrucción de tejidos (traumática, infecciosa o neoplásica principalmente), por lo que es un índice de proliferación en el seguimiento de tumores<sup>164</sup>. Diferentes estudios han relacionado los niveles de LDH con una respuesta inversamente

proporcional a los inhibidores de los puntos de control del sistema inmune. En caso de los anticuerpos anti CTLA-4, la posibilidad de beneficio es muy baja en pacientes que presentan LDH mayor a dos veces el límite superior de la normalidad. Con los anticuerpos anti PD1 se observa en los estudios un fenómeno similar. Algunos autores han sugerido que en los pacientes en que se observa una reducción de la LDH durante el tratamiento, es en los que se obtienen mejores resultados. Se necesitarán en el futuro nuevos estudios que aclaren el papel de la LDH como factor predictivo de respuesta a inmunoterapia<sup>165</sup>.

- **Microbioma**

Los gérmenes comensales que colonizan el intestino se consideran fundamentales para la homeostasis del aparato digestivo. No solo intervienen en los procesos de digestión, síntesis de vitaminas o defensa de la colonización de patógenos, sino que tienen una función reguladora del sistema inmunológico. La función reguladora es fundamentalmente a nivel antiinflamatorio, a través de la estimulación de las células T reguladoras. Diferentes estudios han demostrado, recientemente, que el tratamiento con antibióticos podría comprometer el resultado terapéutico de la inmunoterapia<sup>166</sup>. La administración de antibióticos conduce a una disminución de las especies *Bacterioides* y de *Burkholderianas*, y su posterior restablecimiento puede conducir a un aumento de la respuesta a la inmunoterapia (especialmente en los inhibidores de CTLA-4)<sup>167</sup>. De la misma forma, la introducción en la flora o el restablecimiento de la especie *Bifidobacterias* en tracto digestivo de ratones, predecía un aumento de la respuesta a los tratamientos con agentes anti-PD1<sup>168</sup>.

El efecto de la Microbioma actualmente se encuentra en investigación, no solo desde un punto de vista predictivo a la respuesta al tratamiento, sino también como un factor modificable de respuesta que podría mejorar la supervivencia en pacientes no respondedores (Figura 16)<sup>169</sup>.

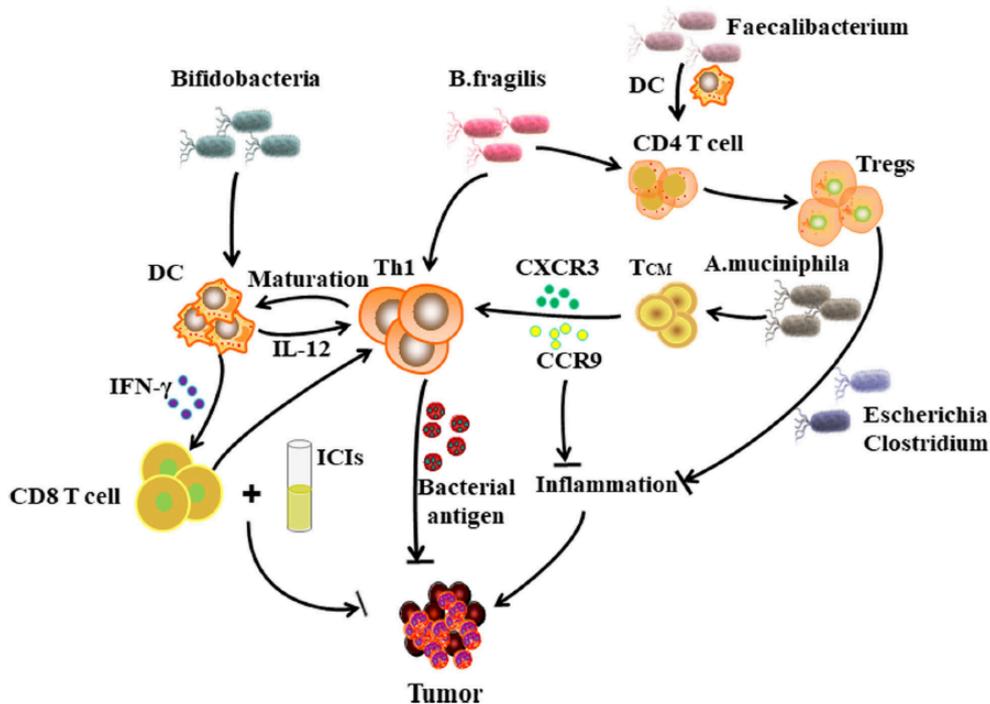


Figura 16. Esquema que muestra el efecto regulatorio de diferentes especies de bacterias sobre el sistema inmunológico. Dai Z et al., 2020<sup>169</sup>.

- ***Carga mutacional y deficiencia de reparación de errores MMR***

La carga mutacional es muy variable entre los diferentes tumores. Existen tumores con una muy elevada carga mutacional, entre los que se encuentran fundamentalmente aquellos tumores que dependen de agentes exógenos carcinogénicos (melanoma con la luz ultravioleta o cáncer de pulmón con el tabaco). La elevada carga mutacional se ha correlacionado con la respuesta a fármacos anti-PD1<sup>170</sup>. En el caso de los anticuerpos anti-CTLA4, el número de mutaciones se correlacionaba con el beneficio clínico, siendo este mayor en los pacientes que presentaban una carga de mutaciones más elevada, sin embargo, no se correlacionaba directamente con la respuesta al tratamiento<sup>171</sup>.

Dado que la determinación del número de mutaciones no es práctica desde el punto de vista asistencial, es diversos estudios se desarrolló una firma génica que caracterizaba los pacientes entre aquellos que presentaban mayor cantidad de neoepitopos y los que presentaban menor cantidad. Esta firma génica, de nuevo, fue predictiva de la supervivencia y el beneficio terapéutico a los anticuerpos anti-CTLA4<sup>172</sup>. Por lo tanto, aunque no es una relación directa, la elevada carga mutacional es un importante factor predictivo de respuesta a la inmunoterapia. En la Figura 17 se observa una imagen clásica

que define los tumores de menor a mayor por carga mutacional<sup>173</sup>. Los tumores con mayor carga mutacional son melanoma y cáncer de pulmón, los cuales presentaban importantes indicaciones para el tratamiento de inmunoterapia. Por el contrario, el astrocitoma pilocítico (tumor típico en la infancia) presenta una escasa carga mutacional, lo cual nos da un valor predictivo importante en la respuesta a la inmunoterapia (la cual no se encuentra indicada para esta tumoración).

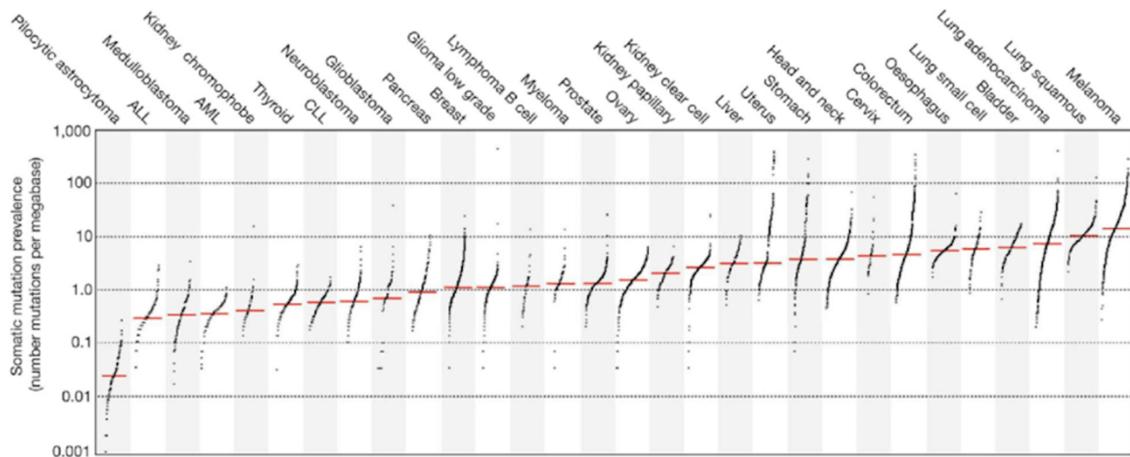


Figura 17. Carga mutacional por tumores (menor a mayor). Boyiadzis MM et al., 2018<sup>173</sup>.

Dentro de la carga mutacional, realmente el primer biomarcador predictivo de respuesta a inmunoterapia que se ha descubierto es la deficiencia del sistema de reparación de errores *mismatch repair* (MMR)<sup>174</sup>. El sistema de reparación MMR, se encarga de la reparación de pequeños errores en los procesos de reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN), de entre 1 y 4 pares de bases. Cuando, durante la copia de la hebra molde de ADN, se incorpora un nucleótido erróneo, se produce un error de apareamiento (*mismatch*) entre las hebras madres e hija. Este error provoca una alteración en la estructura de la doble hebra que puede ser reconocida y reparada por las enzimas del sistema MMR<sup>175</sup>.

Las deficiencias en MMR pueden dar lugar a la acumulación de un mayor número de mutaciones, lo que generaría neoantígenos y un mejor reconocimiento de la célula tumoral por el sistema inmune. Todo ello conlleva a una mejor respuesta a los tratamientos de inmunoterapia. El defecto de MMR está presente en un porcentaje importante de tumores, calculándose que hasta el 20% de los tumores de colon lo presentan<sup>176</sup>. El ensayo clínico KEYNOTE-177<sup>177</sup>, evaluó la eficacia de pembrolizumab en primera línea de tratamiento en 307 pacientes con cáncer colorrectal metastásico y

deficiencia del sistema MMR. Los pacientes fueron asignados a recibir pembrolizumab (200mg cada 3 semanas) frente a quimioterapia (terapias basadas en 5-fluoracilo con o sin bevacizumab o cetuximab) cada 2 semanas. Los objetivos primarios del estudio fueron la SLP y la SG (Figura 18).

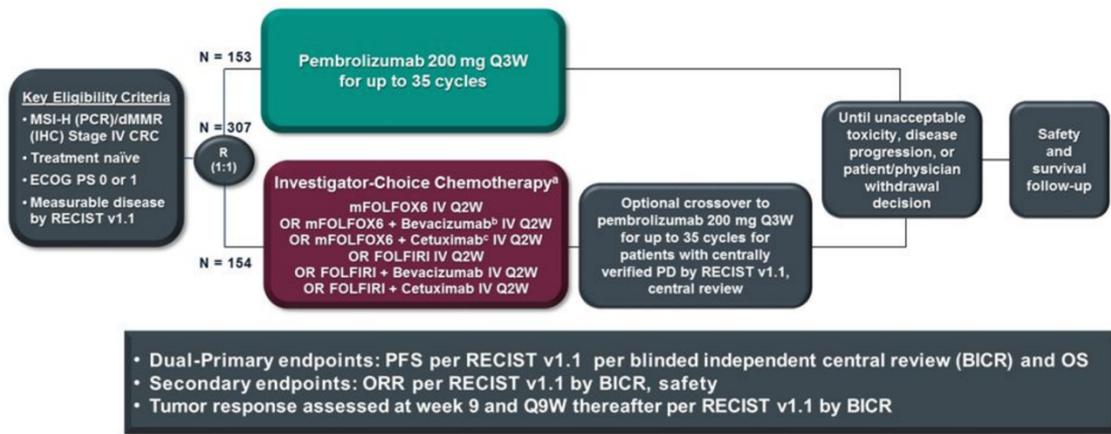


Figura 18. Protocolo del estudio KEYNOTE-177. André T et al., 2020<sup>177</sup>.

Con una mediana de seguimiento de 32.4 meses, pembrolizumab presentó una SLP de 16.5 meses frente 8.2 meses de la quimioterapia (HR 0.60, IC 95% 0.45-0.80) (Figura 19). Los datos en SG actualmente se encuentran en cálculo.

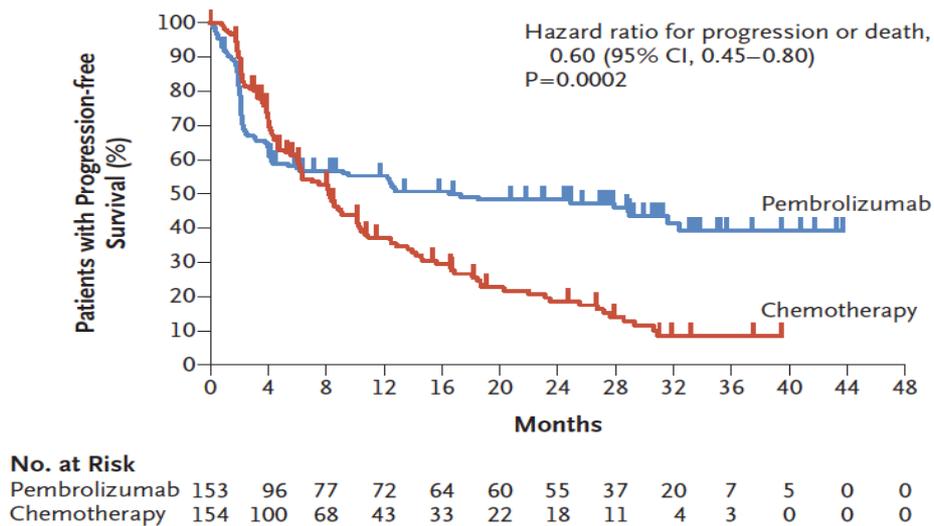


Figura 19. Resultados del estudio KEYNOTE-177 en SLP. André T et al., 2020<sup>177</sup>.

En el análisis de subgrupos, no existieron diferencias de SLP en función del estado de *BRAF*, sin embargo, aquellos pacientes que presentaban mutaciones en los genes *NRAS* o *KRAS* no mostraron beneficio con el tratamiento de pembrolizumab (HR 1.19, IC 95%

0.68-2.07). Así mismo los pacientes con tumores en colon izquierdo tampoco mostraron beneficio (HR 0.81, IC 95% 0.46-1.43). Estos resultados presentados en el congreso ASCO 2020 (*American Society of Clinical Oncology*), han hecho que el actual estándar de tratamiento en primera línea de los pacientes con tumores colorrectales metastásicos y déficit del sistema MMR sea la inmunoterapia.

- ***Expresión de PD-L1***

El ligando más importante estudiado como factor pronóstico es el ligando de PD1, PD-L1. No es el único ligando de PD-1, ya que existe un segundo ligando (PD-L2), cuya función en el desarrollo de la neoplasia y en la respuesta a este tipo de fármacos aún no está claramente establecida<sup>178</sup>. La expresión de PD-L1 por parte del tumor, se considera que es uno de los mecanismos de evasión al sistema inmunológico que utiliza la neoplasia para poder desarrollarse y evitar el efecto de los linfocitos T citotóxicos. Al ser el punto en el que los fármacos anti PD1 ejercen su efecto, se ha explorado su expresión desde el inicio de los ensayos con estos fármacos, con la esperanza de poder identificarlo como marcador de respuesta al tratamiento. Se han encontrado numerosos obstáculos que han dificultado el establecimiento de este marcador como marcador pronóstico, que se indicación a continuación<sup>179</sup>.

El primero de ellos, es que la expresión de PD-L1 es inducible por el interferón gamma y puede ser expresado tanto en las células tumorales como en las células inmunitarias. Esto supone una complicación importante a la hora de saber cuál es el valor pronóstico de la expresión de PD-L1, ya que dependerá de la célula donde esté expresado<sup>180</sup>. Por otra parte, los métodos de evaluación también han sido distintos y se dispone de diferentes metodologías para la determinación, con diferentes puntos de corte; estas metodologías han sido desarrolladas por las diferentes compañías farmacéuticas durante la investigación de sus productos, y el hecho de ser heterogéneas ha contribuido aún más a complicar la interpretación de los resultados<sup>181</sup>.

Sumado a todo lo anterior, hay que tener en cuenta el fenómeno de heterogeneidad tumoral, por el que diferentes zonas del tumor pueden tener diferentes niveles de expresión y en un solo tumor haber zonas fuertemente positivas entremezcladas con zonas negativas, por lo que el valor de pequeñas biopsias será muy limitado. Todo lo previo explicado, permite dar una idea de lo complejo que es interpretar este marcador en la

práctica clínica, y es que hay pacientes con expresión negativa de PD-L1 que responden a inmunoterapia, lo que invalida este biomarcador para la selección de pacientes<sup>182</sup>.

Pese a las limitaciones de PD-L1, la expresión de este ligando hoy se considera el predictor más fuerte de respuesta al tratamiento, y una elevada expresión de PD-L1 puede permitir detectar que pacientes es posible respondan mejor a inmunoterapia. En la Tabla 6 se recoge un pequeño resumen de los diferentes estudios que han intentado hacer una relación entre PD-L1 y la respuesta a la inmunoterapia en tumores sólidos.

**Tabla 6. – Tasas de respuesta a inmunoterapia en tumores sólidos (no seleccionado por tumores) en función de la expresión de PD-L1<sup>183</sup>.**

<i>Estudio</i>	<i>Topolian et al., 2015</i>	<i>Herbst et al., 2013</i>	<i>Segal et al., 2014</i>
Pacientes	42	94	179
RO PD-L1+	36%	36%	22%
RO PD-L1-	0%	13%	4%
Tratamiento	Anti-PD1	Anti-PDL1	Anti-PDL1

\*Abreviaturas: RO respuestas objetivas.

- ***Linfocitos infiltrantes de tumores***

Mucho antes de la llegada de las nuevas terapias inmune, se había identificado el valor pronóstico de la infiltración de linfocitos en el tumor, considerándose que aquellos pacientes que tenían tumores con un rico infiltrado linfocitario tenían mejor pronóstico que los que no tenían infiltración<sup>184</sup>. Los pacientes con tumores con gran número de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), de alguna forma que en la actualidad no se comprende del todo, han puesto en marcha el sistema inmunológico y tienen mejores respuestas a la inmunoterapia que los pacientes que no presentan TIL<sup>185</sup>. Hay un grupo de tumores en que las células TIL se disponen en forma de corona de infiltración alrededor de la neoplasia, y se ha podido comprobar que este tipo de células TIL son linfocitos CD8 y se asocian a unos niveles elevados de expresión de PD-L1 y a mejor pronóstico. Por

tanto, no solo se trata de la existencia de células TIL, sino, también, de cómo se disponen estas en torno al tumor<sup>186</sup>.

En la actualidad, se pueden distinguir dos tipos de tumores simplemente por la histología: los inflamados, en los que hay infiltración por linfocitos y en los que se han activado vías de escape inmunológico, y, por tanto, presentarán mejores posibilidades de respuesta a inmunoterapia, y los no inflamados, que no tienen infiltración linfocitaria y en los que las vías inmunosupresoras no tienen esa activación, y que, a priori, responderán peor al tratamiento con inmunoterapia<sup>187</sup>.

Esta infiltración por linfocitos en el seno del tumor es, en realidad, el resultado de la expresión de citoquinas en el microambiente tumoral<sup>188</sup>. La indolamina deoxigenasa (IDO), la presencia de células T reguladoras y la presencia de células mieloides inmunosupresoras, están inducidas por la secreción de citoquinas y se han relacionado con la inmunosupresión que ocurre en el microambiente tumoral; todas ellas se han relacionado de una forma u otra con el pronóstico de las neoplasias y con las posibilidades de respuesta a los tratamientos con inmunoterapia.

Por tanto, el estudio de este microambiente es fundamental para valorar nuevos biomarcadores predictivos de respuesta a la inmunoterapia, siendo en el futuro un punto clave para la selección de aquellos pacientes con mayor respuesta a estos tratamientos.

## ***MARCADORES GENÓMICOS DE RESPUESTA A INMUNOTERAPIA***

La principal hipótesis propuesta por la que diferentes alteraciones génicas en el tumor pueden producir interacciones con la respuesta a la inmunoterapia radica en la producción de neoantígenos que condicionan una mayor activación del sistema inmune. Sin embargo, no se conoce del todo los mecanismos dado que diferentes mutaciones conductoras en tumores no conllevan a menudo una mayor inmunogenicidad<sup>189</sup>. Dado lo anterior, es importante los perfiles moleculares de los tumores para intentar hallar futuros marcadores predictivos de respuesta a inmunoterapia condicionados por mutaciones.

Los primeros ensayos realizados en este campo en cáncer de pulmón valoraron pacientes con tumores de pulmón y no fumadores que tenían mutaciones conductoras como *EGFR* o *ALK*<sup>190,191</sup>. En estos pacientes se observó que la inmunoterapia no funcionaba bien y por tanto no debían recibir inmunoterapia en primera línea de tratamiento, independiente del valor de PD-L1, que en muchos casos es elevado en estos pacientes. De echo, existe una regulación positiva del receptor PD-L1 por parte de los oncogenes *EGFR* o *ALK* en los tumores de pulmón, sospechándose que esta regulación se basa en la inducción o activación de *ERK* o *mTOR* sobre la señalización de las vías oncogénicas del tumor<sup>192</sup>. Por tanto, la mayoría de los ensayos clínicos en inmunoterapia han excluido *EGFR*, *ALK* y *ROS1* mutados y la literatura es escasa en este sentido en este pequeño subgrupo de pacientes. La poca información que tenemos procede de los ensayos CheckMate 057<sup>113</sup> y KEYNOTE-010<sup>193</sup>, que probaron el beneficio de nivolumab y pembrolizumab sobre docetaxel en segunda línea de tratamiento del CPNM. En estos casos no se observó beneficio de la inmunoterapia frente a la quimioterapia en los pacientes con *EGFR* mutado o fusión de *ALK*. En los pacientes con CPNM *EGFR* mutado que han progresado a los inhibidores de *EGFR*, se debe ofrecer en primer lugar tratamiento de quimioterapia frente a inmunoterapia.

Parece claro que en pacientes con CPNM que tienen mutaciones conductoras, se debe ofrecer terapia dirigida en primer lugar antes que tratamientos basados en inmunoterapia. Esta falta de eficacia podría deberse entre otras hipótesis a niveles bajos de linfocitos T CD8 infiltrantes de tumores en el microambiente, lo cual limita el efecto de la inmunoterapia<sup>194</sup>. En el futuro, se determinará si efectivamente estos pacientes no presentan buenas respuestas a la inmunoterapia.

En los pacientes fumadores, otras mutaciones han sido estudiadas dado que estos pacientes presentan una mayor carga mutacional que los no fumadores. En los fumadores, *KRAS* y *TP53* están mutados con frecuencia y diversos estudios han considerado su valor predictivo sobre la respuesta a inmunoterapia, siendo los resultados obtenidos contradictorios<sup>195,196</sup>. La respuesta a estas mutaciones ha venido secundada por otras comutaciones en el tumor como pueden ser las de *STK11* o *EGFR*<sup>197</sup>, que se han asociado a una mayor densidad de linfocitos T CD8 y de expresión de PD-L1 en el tumor. Por tanto, el valor predictivo de las mutaciones de *KRAS* y *TP53* en el tumor actualmente es controvertido.

Otras mutaciones han sido estudiadas de manera no muy extensamente por lo que los datos actuales no permiten inferir conclusiones de importancia. Las mutaciones en *BRAF* en los CPNM se han asociado a una mayor respuesta a inmunoterapia<sup>198</sup>. Un artículo basado en un análisis retrospectivo de 39 pacientes postuló que la mutación de *BRAF* se asociaba a una elevada expresión de PD-L1 y que la inmunoterapia tenía una actividad favorable en estos pacientes con una tasa de respuesta objetiva de 25 y 33% en mutaciones de *BRAF* V600E y no V600E respectivamente<sup>199</sup>. Al contrario que *BRAF*, las mutaciones de *LKB1/STK11* en asociación o no con *KRAS* se relacionan con una falta de respuesta a la inmunoterapia. Esto podría estar relacionado con el entorno inmune vinculado a *LKB1/STK11* mutado<sup>200</sup>. Posteriormente a estos estudios, Hellmann et al., mostró que ninguno de los tumores con alteraciones *STK11/LKB1* en su serie respondió al tratamiento. Este grupo hizo una observación similar con mutaciones de *PTEN*, aunque no alcanzaron significación estadística<sup>201</sup>.

Otro punto clave en la respuesta a la inmunoterapia es la presencia como se ha nombrado en el punto anterior de las deficiencias del sistema de reparación *mismatch*. Los defectos del sistema MMR y de las polimerasas de replicación (*POLE* o *POLD1*) se han demostrado en diversos estudios asociadas a la mayor respuesta a la inmunoterapia<sup>202</sup>. La base de datos AACR (*American Association for Cancer Research*) muestra que los tumores de pulmón presentan deficiencia del sistema MMR en el 2.1%, 1.09%, 1.65% y el 1.87% de las veces en los genes *MSH2*, *MLH1*, *PMS2* y *MSH6* respectivamente<sup>203</sup>. Sin embargo, estos tumores son difícilmente enmarcables dentro del fenotipo del síndrome de Lynch u otros síndromes asociados a alteraciones familiares. Por lo tanto, en la clínica habitual no está justificado el estudio de este sistema reparación en los pacientes con CPNM ni microcítico, aunque es cierto que el estudio de las ADN polimerasas o del

sistema MMR podría ser considerados como sustitutos de otros marcadores como PD-L1 o el *tumour mutational burden* (TMB).

En resumen, los perfiles moleculares de las células tumorales pueden impactar significativamente en el microambiente tumoral (densidad de células T, macrófagos y neutrófilos), sin embargo, se necesitan todavía estudios con grandes muestras que validen estas conclusiones. Ahora se exponen más detenidamente los dos marcadores moleculares principales que se estudian en este proyecto mediante inmunohistoquímica (*TP53* y sistema de reparación MMR)

- ***Gen TP53***

Mientras que las funciones supresoras del gen *TP53* son extensamente conocidas y estudiadas, apenas se sabe sobre el impacto de este gen sobre la respuesta inmune contras las células tumorales<sup>204</sup>. Las alteraciones en el gen *TP53* contribuyen a la capacidad de las células tumorales para escapar de la vigilancia inmune y así promover un ambiente inmunosupresor<sup>205</sup>. La pérdida o mutación de p53 en las células tumorales se ha demostrado que influye en el reconocimiento inmune a través de mecanismos como la presentación por el complejo de histocompatibilidad 1 o el reclutamiento de células mieloides supresoras o linfocitos *Treg*<sup>206</sup>.

No solo es importante a nivel regulatorio directo, sino que tiene un papel clave en el establecimiento del microambiente tumoral, donde puede jugar diversas funciones en la inhibición o apoyo del crecimiento y supervivencia de las células tumorales. Las funciones de p53 en células epiteliales, mesenquimales o inmunes se estudia actualmente no en tumores sólidos o hematológicos, sino en otro tipo de enfermedad inmunes<sup>207</sup>. Por ejemplo, la actividad de p53 en células T es necesario para prevenir la proliferación inadecuada en ausencia de señalización de TCR, que permita una regulación y expansión estricta de las células T específicas de antígeno.

Dado lo anterior, es lógico el atractivo que tiene actualmente el estudio de *TP53* como factor predictor de respuesta a tratamientos que aumentan la capacidad del sistema inmune. Hasta ahora, sin embargo, no se ha demostrado en ningún estudio que la respuesta a inmunoterapia se vea condicionada por estas alteraciones en tumores sólidos. Los diversos estudios no logran discernir si la respuesta a la inmunoterapia aumenta en los casos de tumores con p53 mutado, ni tampoco si la expresión de PD-L1 se encuentra

aumentada en estos tumores. En el estudio de Xu et al., se observa como la expresión de PD-L1 se correlaciona con las mutaciones de *TP53* de una manera inversa en cáncer de pulmón ( $p = 0.010$ ), y junto con ello se observa que en estos pacientes la inmunoterapia no es un tratamiento adecuado al no mostrar buenos resultados en términos de supervivencia y respuestas objetivas<sup>208</sup>. Y a mayores en estos pacientes, se observa que una mayor expresión de PD-L1 junto con una expresión conservada del ácido ribonucleico (ARN) mensaje de p53 se asocia a una mayor supervivencia en pacientes con CPNM (Figura 20).

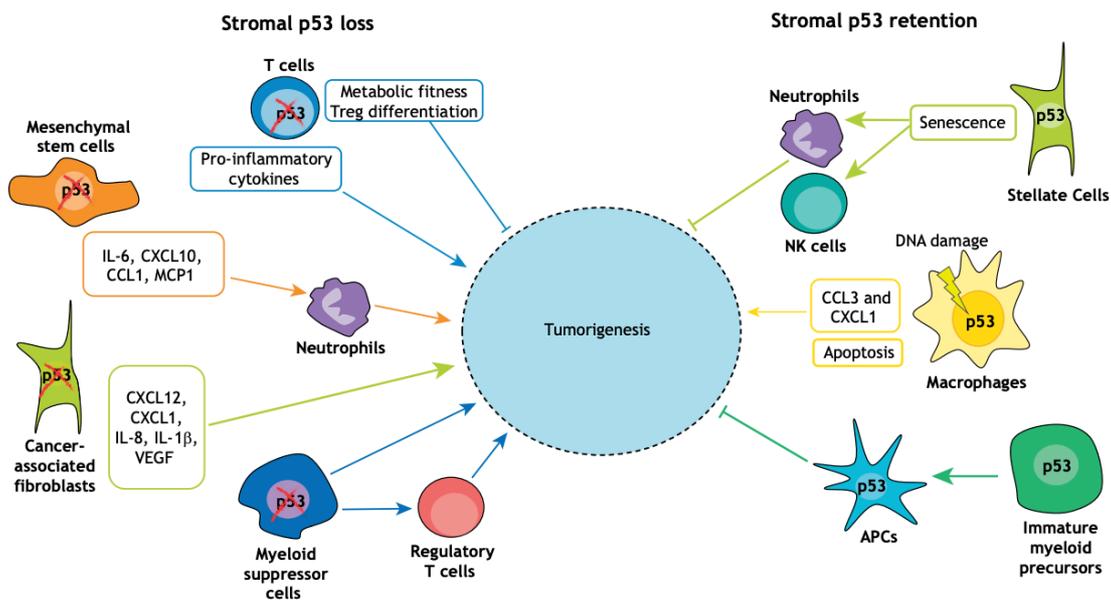


Figura 20. Efecto de las mutaciones o pérdida de p53 en el microambiente tumoral.

Blagih et al., 2020<sup>209</sup>.

Otros estudios, como el realizado por Assoun et al., muestran como las mutaciones o pérdida de *TP53* se asocian en pacientes con CPNM a una mayor supervivencia global cuando se realizan tratamientos de inmunoterapia<sup>206</sup>. Este estudio que constaba con 65 pacientes se observa que la SG de los pacientes con p53 mutado es de 18.1 meses por 15.2 meses en los pacientes sin pérdida o mutación del gen ( $p = 0.04$ ). Por lo tanto, concluyen que las mutaciones de *TP53* son un factor independiente predictivo de respuesta a la inmunoterapia.

En base a estos estudios, no se pueden sacar conclusiones exactas sobre cual es el papel de *TP53* en la respuesta a los tratamientos de inmunoterapia, sin embargo, en el futuro se determinará con más exactitud su papel y si existen factores adyuvantes que determinen esta cuestión.

- ***Deficiencias del sistema MMR en cáncer de pulmón***

Como se ha indicado anteriormente, alrededor del 1-2% de los CPNM presenta mutaciones de los genes que componen el sistema MMR. El papel de los defectos de MMR en la respuesta a inmunoterapia es bien conocido y ha sido ampliamente estudiado en diferentes tumores, fundamentalmente a nivel del tracto gastrointestinal. Diferentes estudios basados en series de pacientes o de nivel retrospectivo han mostrado que la expresión disminuida de *MSH2* o *MLH1* en adenocarcinomas de pulmón se ha asociado a una mala supervivencia de estos pacientes debido a resistencias en los tratamientos a inmunoterapia<sup>210</sup>. La deficiencia de este sistema de reparación se ha observado mayor en tumores de estirpe adenocarcinoma o escamosa respecto a la histología microcítica. En la mayoría de los casos el silenciamiento de los genes del sistema MMR se debe a alteraciones epigenéticas y no tanto a mutaciones<sup>211</sup>.

Las mutaciones de los genes MMR se han visto que se asocian en pacientes con CPNM a las mutaciones del gen *KRAS*, sin embargo, esta asociación no se ha podido traducir en una implicación pronóstica o predictiva de respuesta a quimioterapia o inmunoterapia<sup>212</sup>. No existen estudios que valoren la respuesta a inmunoterapia en CPNM y tumores con deficiencia MMR. Únicamente existen datos basados en reportes de casos únicos o series de casos y otros datos basados en extrapolaciones de estudios más grandes que incluyen más tumores como los realizados por Viale G et al., o Zhao P et al<sup>213,214</sup>.

Por tanto, aunque el sistema MMR y sus implicaciones en el tratamiento de inmunoterapia en el CPNM no han sido estudiadas con claridad, es de suponer que al igual que en otros tumores como el cáncer de colon, su presencia sea un factor predictivo favorable de respuesta a estos tratamientos, y por tanto se pueda plantear su inicio en una línea previa a la prevista o en pacientes con mutaciones conductoras. En el futuro nuevos estudios determinarán como la presencia de estas alteraciones en los genes MMR pueden afectar al tratamiento con inmunoterapia en CPNM.

## ***TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ALTERACIONES GENÓMICAS EN ONCOLOGÍA***

El actual conocimiento que se ha obtenido del genoma humano y de los tumores, ha permitido el desarrollo de la investigación de nuevos fármacos y dianas moleculares en diversos tumores sólidos y hematológicos<sup>215</sup>. La aparición de estos nuevos fármacos ha conllevado un aumento en la calidad de vida de los pacientes oncológicos, así como de la supervivencia y de la respuesta antitumoral<sup>216</sup>. Tradicionalmente, el diagnóstico molecular del cáncer se ha basado en la detección de mutaciones en uno o varios genes mediante técnicas de inmunohistoquímica o de secuenciación *Sanger*<sup>217,218</sup>. Sin embargo, en los últimos años, dado el conocimiento de la gran cantidad de genes que intervienen en el cáncer, se necesita un abordaje más amplio de la genética tumoral, apareciendo las nuevas técnicas de secuenciación genética masiva (“next-generation sequencing” NGS) que han supuesto una revolución en el diagnóstico genómico de los tumores. Además, estas técnicas de secuenciación masiva han sufrido un desarrollo en los últimos años que ha permitido que sean baratas, sencillas de realizar y con una relación coste-efectividad muy favorable<sup>219</sup>.

Pese a lo anterior, las técnicas clásicas siguen siendo fundamentales en el estudio genómico de los tumores, y en particular la inmunohistoquímica representa el pilar fundamental de diagnóstico de los tumores sólidos como es el caso del cáncer de pulmón. Diferentes mutaciones conductoras en cáncer de pulmón se identifican mediante inmunohistoquímica, siendo una técnica de eficacia probada, bajo coste y fácil acceso en todos los centros hospitalarios. Por ello, tanto las técnicas clásicas como noveles tienen un lugar clave en el diagnóstico genómico en oncología, y su uso permite un mayor conocimiento de los tumores respecto a lo que se puede conseguir por separado.

- ***Inmunohistoquímica***

La IHQ es un procedimiento que permite la identificación de una molécula específica a nivel tisular o celular. Es una técnica basada en la utilización de anticuerpos que se unen específicamente a otra molécula que se quiere identificar. Los inicios de la IHQ se hallan en el desarrollo de la metodología de anticuerpos marcados con fluoresceína realizado por Albert Coons, Hugh Creech, Norman Jones y Ernst Berlinier, en la Universidad de Harvard en 1941<sup>220</sup>. Posteriormente la evolución de esta técnica ha permitido llegar hasta lo que actualmente conocemos como IHQ, y dentro de ella su utilización para el diagnóstico y caracterización de tumores<sup>221</sup>.

La IHQ se fundamenta en la reacción antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos pertenecen al grupo de las inmunoglobulinas y se encuentran dirigidas hacia un antígeno que se pretende identificar en la muestra a estudio<sup>222</sup>. Esta reacción es incolora y para poder hacerla visible se utilizan diferentes métodos de fluorescencia, lo que permite identificar el lugar donde se depositan los anticuerpos utilizados y valorar el nivel de expresión y la localización de la molécula que se presente estudiar. Multitud de tumores necesitan de la IHQ para su caracterización, cuyas aplicaciones permiten valorar tanto el pronóstico como la predicción de respuesta a diferentes tratamientos. Entre las principales aplicaciones de la IHQ en la oncología se encuentran los tumores de mama con la determinación de expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) o los receptores hormonales, y los tumores de pulmón en la valoración de PD-L1, *EGFR* o *ALK* (Figura 21)<sup>223</sup>.

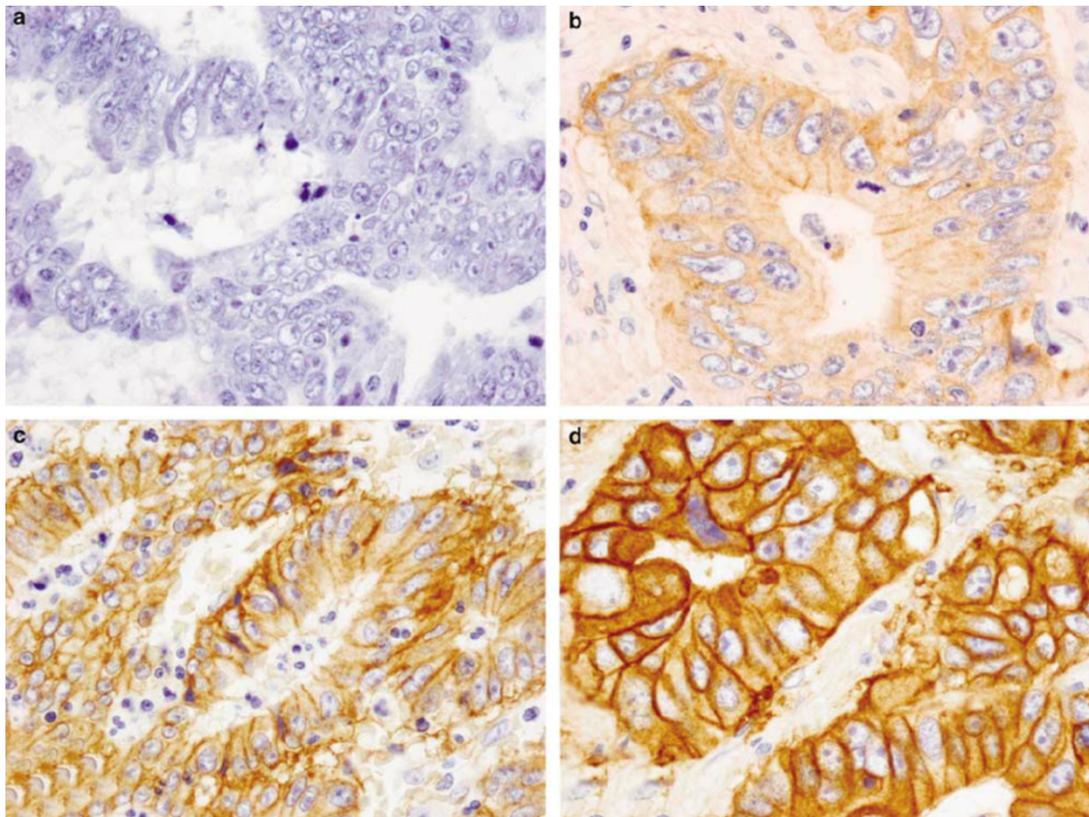


Figura 21. Ejemplo de determinación de la expresión de EGFR mediante inmunohistoquímica (ausencia arriba a la izquierda, intensa abajo a la derecha). Shia et al., 2005<sup>223</sup>.

En el campo de la inmuno-oncología existen múltiples biomarcadores que se pueden determinar mediante inmunohistoquímica, tanto genómicos como marcadores propios del sistema inmune. El principal y más conocido es PD-L1, sin embargo, en los últimos

tiempos nuevos biomarcadores se han desarrollado como predictivos de respuesta a inmunoterapia como los TIL<sup>224</sup>. Otros nuevos marcadores se encuentran en desarrollo en diferentes fases de investigación. Por ejemplo, la determinación de los niveles de expresión de IDO y de FoxP3 se han asociado a respuestas a inmunoterapia, estando unidos unos niveles elevados de proteína con una mejor respuesta a los tratamientos<sup>225</sup>. Por tanto, hoy en día, la IHQ tiene un papel clave en la determinación de biomarcadores predictivos a inmunoterapia. La combinación de estas nuevas determinaciones junto con marcadores genómicos permitirá en el futuro la identificación más precisa, con un coste menor a medida que se implementen las diferentes técnicas.

- ***Secuenciación genética masiva***

En el año 1975, los investigadores Sanger y Coulson publicaron el primer método enzimático para secuenciar ADN a través de la incorporación de dideoxinucleótidos terminales<sup>226</sup>. Este procedimiento marcó la base para el posterior desarrollo de las diferentes técnicas de secuenciación masiva que conocemos hoy en día y que se utilizan tanto en investigación como en práctica clínica. En la última década, se ha evolucionado desde la secuenciación de un máximo de 96 secuencias de 800 nucleótidos con secuenciadores de primera generación (método *Sanger*) a la secuenciación de millones de fragmentos de ADN con equipos de nueva generación (NGS)<sup>227</sup>. Esta técnica se basa en la amplificación de ADN inmovilizando en una superficie sólida y la lectura en paralelo de millones de secuencias. La secuenciación masiva permite detectar, además de mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, variaciones en el número de copias y translocaciones. Hoy en día, la NGS es fundamental para el estudio del cáncer, mediante la detección de variantes somáticas en subpoblaciones de células tumorales, que permiten el desarrollo de la medicina de precisión tanto en tumores sólidos como hematológicos<sup>228</sup>. En muchos casos estas subpoblaciones, que son indetectables mediante la secuenciación *Sanger*, son responsables en algunos casos de las recaídas tumorales o del desarrollo de metástasis. Las subpoblaciones tumorales se pueden analizar de diferentes muestras. Tanto el análisis de subpoblaciones dentro de las tumoraciones sólidas, como del ADN circulante tumoral (ctDNA) permite conocer la genómica tumoral al completo para la realización de una medicina de precisión.

Las principales aplicaciones del NGS en el campo de la oncología son los siguientes:

- Secuenciación de paneles de genes<sup>229</sup>: contienen cebadores o sondas para un grupo conocido de genes y permiten la secuenciación dirigida a una determinada patología. Permiten secuenciar mutaciones conocidas (*hot spots*), genes completos, detectar variaciones en el número de copias y translocaciones.
- Secuenciación del exoma<sup>230</sup>: el exoma corresponde a la parte codificante del genoma, representando el 1.5% del genoma, siendo su parte funcional (aunque este término esta cada día más en desuso por las implicaciones de los intrones en el genoma). Para poder conocer el exoma, existen diferentes métodos como los realizados mediante reacciones en cadena de la polimerasa o su captura mediante sonda específicas.
- Secuenciación del genoma<sup>231</sup>: consiste en abarcar la secuenciación del genoma completo, incluyendo el ADN cromosómico y mitocondrial, permitiendo la identificación de variantes no codificantes que puedan estar asociadas a procesos tumorales, aunque su principal campo de acción es a nivel de investigación.
- Secuenciación del transcriptoma<sup>232</sup>: permite obtener la información cuantitativa de los genes expresados en momento determinado, mediante el estudio de los transcritos de ARN.

Todas estas aplicaciones del NGS, tienen un campo amplio de aplicación dentro del uso de la inmunoterapia, mediante la detección de alteraciones en genes que predispongan a una mayor respuesta o resistencia a estos tratamientos. Mediante su uso tanto en investigación como en práctica clínica es posible determinar que pacientes son beneficiarios de determinados tratamientos, que a larga redundan en una mayor supervivencia, respuesta y calidad de vida en los pacientes oncológicos.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

La principal hipótesis que se ha establecido para esta tesis doctoral es la búsqueda de biomarcadores predictores de respuesta o resistencia al tratamiento con inmunoterapia, mediante la expresión de marcadores genómicos. Dados los conocimientos adquiridos sobre la genética tumoral, se han realizado estudios actualmente en modelos *in vitro* e *in vivo* con animales que muestran la existencia de mutaciones en tumores sólidos que condicionan la respuesta a los tratamientos de inmunoterapia.

Por ello, aumentar el conocimiento existente sobre los condicionantes de la respuesta a la inmunoterapia en los diferentes pacientes es clave para la mejor selección de estos. Mediante una mejor selección, se evitará tratar a pacientes con inmunoterapia de manera innecesaria (retrasando tratamientos de quimioterapia), y por el contrario existirán pacientes con elevadas tasas de respuesta a los inhibidores de los puntos de control del sistema inmune, disminuyendo la toxicidad de los tratamientos y condicionando aumentos de supervivencia, en muchos casos de larga duración de respuesta.

Tal y como se indica en el apartado introductorio, los genes *TP53*, *MLH1*, *MSH2*, *MLH6* y *PMS2*, son los que en modelos preclínicos han mostrado un mayor valor predictivo de respuesta a inmunoterapia en pacientes con cáncer de pulmón, pero su implicación en modelos clínicos no ha sido validada. Estos genes, a mayores de otros mencionados, pero más conocida su implicación en la respuesta a inmunoterapia en la práctica clínica como *KRAS*, *STK11/LKB1* o *PTEN*, pueden ser fundamentales para comprender los perfiles de respuesta de los pacientes tratados con inmunoterapia en CPNM. Por esta razón, dentro de todos los genes que actualmente se están investigando como biomarcadores predictivos a inmunoterapia, *TP53* y los genes del sistema MMR son los que tienen un futuro más prometedor y su comprensión más puede ayudar a discernir los patrones de respuesta o resistencia a inmunoterapia en determinados pacientes.

Además, estos genes tienen la facilidad de ser accesibles en cualquier centro hospitalario mediante el uso de la IHQ, por lo que su estudio es más apremiante por su sencillez de diagnóstico en pacientes con CPNM. De igual forma a los genes anteriores, existen multitud de genes que actualmente desconocemos, pero que su investigación también es esencial para comprender la inmunoterapia en CPNM. La accesibilidad para el descubrimiento e investigación de estos genes la tenemos gracias a las técnicas de NGS, por ende, junto con el desarrollo de genes ya conocidos como *TP53* o los del sistema

MMR, se debe hacer uso de estos recursos cada vez más asequibles para entender la inmunoterapia y su eficacia o resistencia en los pacientes.

Es por ello, que los objetivos propuestos en esta tesis doctoral han sido los siguientes:

1. Objetivo primario: determinar una firma genómica en tejido tumoral y por biopsia líquida asociada a respuesta o resistencia al tratamiento con inmunoterapia en pacientes con CPNM.
2. Objetivos secundarios:
  - a. Analizar las características clínicas y moleculares del espectro de pacientes con CPNM metastásico tratados con inmunoterapia en segunda línea en el Hospital Clínico Universitario de Salamanca.
  - b. Correlación de la expresión por IHQ de PD-L1, *TP53* y los genes del sistema MMR con la eficacia del tratamiento con inmunoterapia en segunda línea en términos supervivencia (SG y SLP) y respuesta (TRO) en pacientes con CPNM.
  - c. Caracterización y correlación de genes determinados por análisis del exoma en muestra tisular que condicionen respuesta o resistencia a inmunoterapia en pacientes con CPNM.
  - d. Caracterización y correlación de genes determinados por análisis del exoma en muestra de ctDNA obtenido por biopsia líquida que condicionen respuesta o resistencia a inmunoterapia en pacientes con CPNM.
  - e. Análisis comparativo de las pruebas de diagnóstico principales en oncología (IHQ y NGS) en base a los resultados hallados en el análisis de los pacientes de la muestra con CPNM y tratamiento de inmunoterapia.

# MATERIAL Y MÉTODOS



## ***1- PACIENTES, PROTOCOLO DE ESTUDIO Y MUESTRAS***

Se incluyeron para el estudio un total de 90 pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (CAUSA), todos ellos tratados con nivolumab en segunda línea. Los pacientes seleccionados debían haber sido diagnosticados de CPNM metastásico o avanzado. De los 90 pacientes, un total de 73 fueron analizados mediante estudio de IHQ y 15 pacientes lo fueron mediante secuenciación masiva para el estudio del exoma del tumor primario y del ctDNA extraído mediante biopsia líquida.

Los pacientes debían haber recibido o iniciado tratamiento de inmunoterapia durante el periodo de tiempo del 1 de enero de 2016 al 31 de diciembre de 2021 según las guías clínicas actuales.

Los criterios de inclusión del estudio fueron los siguientes:

- Pacientes mayores de 18 años en plenas facultades mentales que hubieran recibido y firmado el consentimiento informado para la inclusión en el proyecto de investigación.
- Pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico en estado metastásico o avanzado.
- Los pacientes debían haber sido tratados con nivolumab según los estudios pivotaes CheckMate 057<sup>113</sup> y CheckMate 017<sup>114</sup>.
- Muestra adecuada en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca para los estudios de IHQ y del exoma, así como muestra de sangre periférica para análisis del exoma del ctDNA.

Los criterios de exclusión del estudio fueron los siguientes:

- Negativa para la inclusión por parte del paciente.
- Carcinoma microcítico de pulmón.
- Tratamiento con inmunoterapia en primera línea.
- Ausencia de muestra para los estudios mediante IHQ o secuenciación del exoma por NGS.

Para el análisis del estudio, y la detección de los marcadores genómicos, los pacientes han sido divididos en dos subgrupos principales en función de la respuesta obtenida al

tratamiento de inmunoterapia. Los criterios de buena o mala respuesta se han basado en los que se escogieron en los diferentes ensayos clínicos con inmunoterapia en cáncer de pulmón<sup>113,114</sup>, siendo el factor diferencial la SLP. Se ha recogido este valor debido a que es el objetivo primario de los ensayos clínicos en CPNM con inmunoterapia en segunda línea. Los pacientes que se han reunido en el grupo de buena respuesta son aquellos que tuvieron una SLP  $\geq 8$  meses. Los pacientes con mala respuesta presentan una SLP  $< 8$  meses.

La obtención de las muestras se ha realizado en dos partes diferencias:

- Estudio por IHQ: las muestras corresponden a lesiones primarias tumorales o adenopatías patológicas secundarias al tumor del diagnóstico de los pacientes. Las muestras se tomaron mediante punciones con aguja fina, biopsias con aguja gruesa o de piezas quirúrgicas. Las muestras se han obtenido previamente al inicio de cualquier tratamiento oncológico.
- Estudio mediante secuenciación:
  - Exoma del tumor primario: extracción del ADN de la tumoración primaria en bloques de parafina por parte del Servicio de Anatomía Patológica. Las muestras analizadas son las utilizadas para el estudio por IHQ, y por tanto de pacientes que no habían recibido ningún tratamiento oncológico.
  - Exoma del ctDNA (biopsia líquida): muestras de sangre periférica recogidas en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de los pacientes diagnosticados. Las muestras de los pacientes se han obtenido en tiempo real, siendo de pacientes en tratamiento con inmunoterapia por el CPNM.

Las principales variables clínicas que se recogieron se registran a continuación:

- Variables demográficas:
  - Sexo
  - Edad al diagnóstico
- Variables clínicas:
  - Estadio clínico
  - Lugar de las metástasis
  - Líneas de tratamiento recibidas

- SG (meses desde el inicio de tratamiento hasta diciembre de 2021 o fallecimiento).
  - SLP (meses desde el inicio de tratamiento con inmunoterapia hasta la progresión del tumor a este tratamiento o fallecimiento).
  - Fecha de muerte del paciente.
  - Número de dosis de inmunoterapia administradas.
  - Mejor respuesta obtenida del tumor (clasificada en progresión, estabilización de la enfermedad, respuesta parcial y respuesta completa en función de los criterios de la clasificación de la “*Response evaluation criteria in solid tumors*” RECIST 1.1).
  - Toxicidad asociada a inmunoterapia.
- Variables histológicas:
- Subtipo histológico
  - Expresión de PD-L1
  - Análisis de mutaciones diana

Tras la recogida o identificación de las muestras, la realización del estudio se ha llevado a cabo según el protocolo resumido en la figura 22.

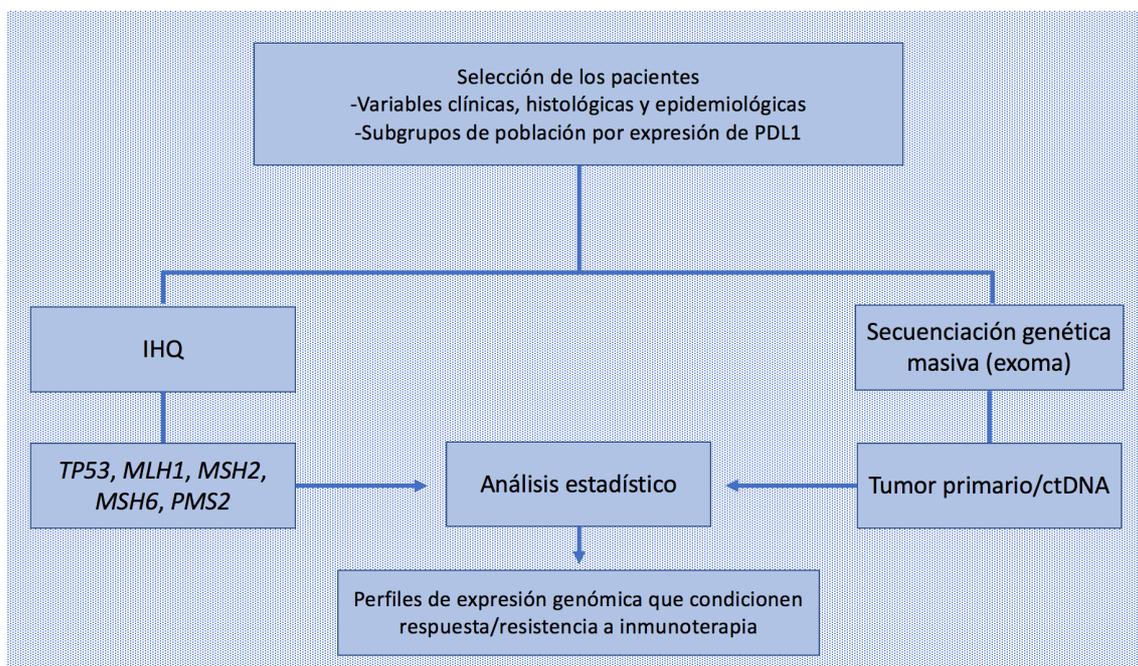


Figura 22. Algoritmo del estudio.

### **Consentimiento informado y leyes**

Todos los pacientes reclutados para el estudio han firmado un consentimiento informado y han sido debidamente informados del estudio y las finalidades de este (Anexo 6) tanto si su muestra de tumor primario fue procesada por IHQ o análisis del exoma como si se obtuvo sangre periférica para estudio de biopsia líquida. El consentimiento informado fue firmado personalmente por cada paciente y el médico responsable del tratamiento oncológico del paciente.

Los pacientes han sido reclutados por los miembros clínicos que han iniciado el tratamiento sistémico de los pacientes (Dr. Edel del Barco y Dra. Lorena Bellido). El estudio ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética del CAUSA (códigos de los estudios PI 2021 10 878 y PI 2022 10 1155). Este estudio se realizará de acuerdo con la última versión de la Declaración de Helsinki (última versión actualizada en 2013), a la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica y el Real Decreto 1716/2011. Las muestras de pacientes se identificaron mediante un código único para cada paciente (uso exclusivo del investigador principal). La confidencialidad de los datos está garantizada de acuerdo con la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal 3/2018.

## ***2- ANÁLISIS MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA***

### **Análisis de expresión de PD-L1**

La determinación o ausencia de expresión de PD-L1 en las membranas celulares tanto tumores como células inmunes asociadas se ha realizado mediante técnicas inmunohistoquímicas efectuadas sobre tejido fijado en formol e incluido en parafina (el anticuerpo monoclonar utilizado fue *Rabbit* anti-PDL1, Clone 28-8). La evaluación del resultado se ha basado en la valoración del porcentaje de células tumorales positivas para dicho marcador.

### **Análisis de expresión de TP53 y genes del sistema MMR**

El análisis de la expresión de los genes del sistema MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*) y de la proteína p53 se ha realizado con la técnica de inmunohistoquímica peroxidasa anti-peroxidasa, con los kits de revelado BOND POLYMER de LEICA. Posteriormente se utilizó una máquina automática BOND III de LEICA. El nivel de expresión de p53 se cuantificó en números porcentuales siendo 0% una expresión negativa y 100% una expresión completa de la proteína en la célula. En función de la literatura existente de la IHQ como marcador subrogado de mutaciones del gen *TP53*, se ha considerado que la expresión  $\geq 5\%$  de la proteína p53 es el punto de corte fiable para considerar el gen *TP53* mutado. La expresión de los genes reparadores se midió de manera binaria, siendo positiva o negativa, sin nivel de expresión cuantitativo.

### **Análisis informático de los resultados obtenidos por IHQ**

Se ha realizado un análisis de la supervivencia mediante los diferentes resultados obtenidos de la expresión de los genes del sistema MMR, *TP53* y PD-L1. Se han categorizado en diferentes subgrupos en función de expresión, calculando los resultados en términos de SG y SLP en función de la expresión de los genes mediante el método de Kaplan-Meier y regresión de Cox. También se ha analizado la relación de los genes mencionados con la respuesta mediante la prueba de Chi-cuadrado. Para evitar los factores de confusión se ha realizado una regresión logística de las diferentes variables

clínicas y epidemiológicas que podían hacer de variables de confusión. El análisis estadístico se realizará empleando el software estadístico SPSS® versión 25.

### ***3- ANÁLISIS DEL EXOMA***

#### **Obtención del ctDNA y ADN del tumor primario**

Tras la información y firma del consentimiento informado por parte del paciente, se procedió al análisis del ADN del tumor primario, así como la obtención de las muestras de sangre periférica de los pacientes seleccionados para el estudio. Para el estudio del ctDNA, se extrajo un tubo de sangre de EDTA de 50mL. Las muestras se conservaron en frío y posteriormente se procesaron mediante doble centrifugación de la sangre, la primera durante 10 minutos a 1000g (separación del plasma) y posteriormente otro centrifugado durante 10 minutos a 2000 g y conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La sangre tras lo anterior se purificó utilizando el *kit* de ácido nucleico circulante *QIAamp* (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Alemania).

Las muestras de tumor primario de CPNM almacenadas en el Servicio de Anatomía Patológica se utilizaron para el análisis del ADN del tumor primario. Se extrajo el ADN de tejido embebidos en parafina utilizando el *kit DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Alemania).

El flujo de trabajo de preparación y secuenciación de bibliotecas de exomas se realizó mediante el *kit* de captura posterior *SureSelect V6* (Agilent<sup>®</sup>, Santa Clara, California, Estados Unidos) e *Illumina* (Illumina Inc<sup>®</sup>, San Diego, California, Estados Unidos). Tras ello, se utilizó el dispositivo *NovaSeq6000* 150PE (150X2bp) con una profundidad promedio de 18 Gb /muestra. Previo al análisis, se comprobó la calidad de las lecturas contenidas en los archivos FASTQ (*Quality Tool for High Throughput Sequence Data*) obtenidos del secuenciador a través de la herramienta FASTQC (*Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*). Esta herramienta está disponible en la página web: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. A continuación, se realizó el proceso de recortado o *trimming* de las lecturas eliminando las secuencias contaminantes procedentes de los adaptadores, así como los nucleótidos que presentaron valores de calidad bajos. Este proceso de recortado de lecturas se efectuó con la herramienta *Trimmomatic* (v.0.39)<sup>233</sup>. Las lecturas pareadas supervivientes fueron mapeadas con el programa de alineamiento BWA-MEM (v.0.7.17) contra el genoma humano en su versión GRCh37 descargado desde el servidor de la Universidad de California – Santa Cruz<sup>234</sup>. La descarga está disponible y se puede realizar en la siguiente página web: <https://hgdownload.soe.ucsc.edu/downloads.html#human>. Los archivos formato SAM

resultantes fueron subsecuentemente procesados para mejorar la eficacia de los sucesivos pasos en el análisis.

### **Análisis bioinformático de los exomas**

Para el inicio del análisis bioinformático, se utilizó la herramienta *MarkDuplicatesSpark* de GATK (*Genome Analysis Toolkit*)<sup>235</sup> para el marcaje de secuencias duplicadas debidas a la amplificación por PCR (reacción en cadena de polimerasa) en la generación de la biblioteca de lecturas. En un segundo paso fueron añadidos los grupos de lectura a los archivos formato BAM, que son archivos formato SAM con codificación binaria, empleando la herramienta *AddOrReplaceReadGroups* de Picard® (v.2.9.0-1).

Seguidamente, se llevó a cabo la recalibración de los puntajes de calidad de los archivos BAM para eliminar errores cometidos por el secuenciador a la hora de estimar la calidad de cada base nitrogenada. Este último paso se realizó combinando las herramientas *BaseRecalibrator* y *ApplyBQSR* de GATK. Con los archivos BAM ya recalibrados se procedió a la determinación del estado mutacional de cada una de nuestras muestras. Así, las variantes de un único nucleótido (SNV, *Single Nucleotide Variants*) y las mutaciones por inserciones y deleciones (INDEL) fueron llamadas a nivel somático con la herramienta *Mutect2* de GATK en su modo pareado. Se estimó la posibilidad de contaminación cruzada con la muestra control empleando la herramienta *CalculateContamination* y finalmente, tanto SNV como INDEL a nivel somático, fueron filtrados con la opción *FilterMutectCall*. Por su parte, las variantes germinales tanto a nivel de SNV como INDEL fueron llamadas con la herramienta *HaplotypeCaller* y se sometieron a un proceso de filtrado mediante “filtros duros”. Tanto a nivel somático como germinal las variantes filtradas fueron sometidas a un siguiente proceso de filtrado considerando válidas aquellas que presentasen una profundidad de lectura global de al menos 20 lecturas, con al menos 10 lecturas que validasen el alelo alternativo y una frecuencia alélica mayor al 10%. Las variantes seleccionadas fueron anotadas con la herramienta *Funcotator*. La patogenicidad de cada una de las variantes fue estimada con la herramienta *Varank* (v.1.4.3)<sup>236</sup>.

La frecuencia y la distribución de las SNV e INDEL detectadas en las cohortes fueron comparadas con dos bases de datos de muestras de donantes sanos como son NHLBI-

ESP (*Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project, Seattle, Washington, Estados Unidos* y disponible en <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) y gnomAD empleando la herramienta ANNOVAR (último acceso en junio de 2022)<sup>237</sup>. El proceso se ilustra en la Figura 23.

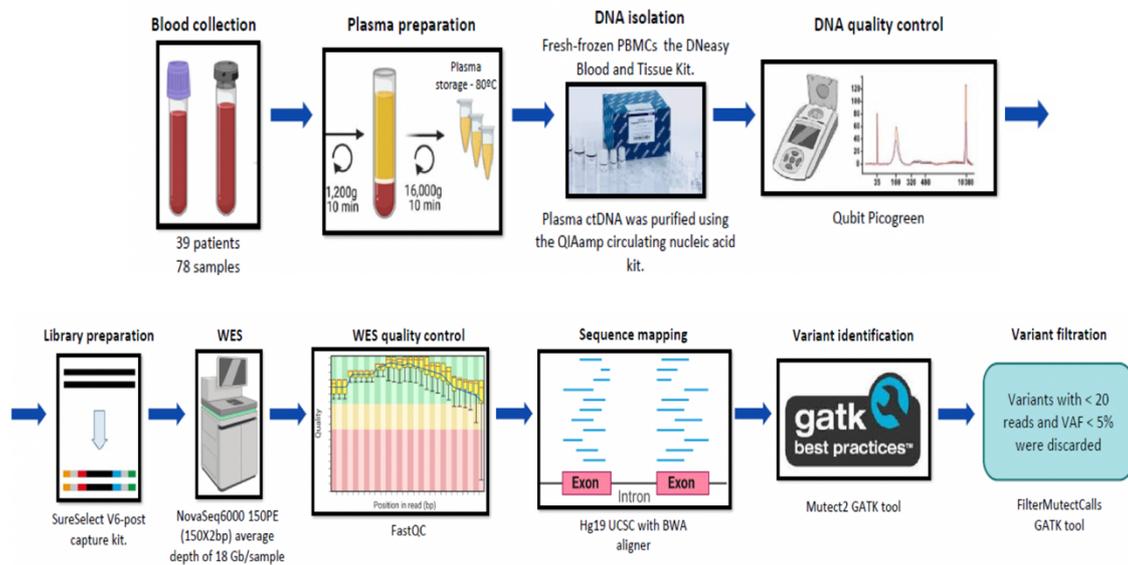


Figura 23. Ilustración del proceso de análisis de los exomas del ctDNA y del ADN del tumor primario.



## **RESVLTADOS**



## ***1- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA***

Se estudiaron para la realización de esta tesis a 90 pacientes con CPNM metastásico o irresecable y que fueron tratados con inmunoterapia (nivolumab en segunda línea). Del total, 73 pacientes fueron estudiados mediante IHQ, al existir muestra completa disponible para la realización de todas las técnicas de IHQ necesarias y que finalmente conformaron la muestra de estudio por IHQ.

En el caso del estudio del exoma por secuenciación genética masiva, un total de 15 pacientes con cáncer de pulmón y tratados con nivolumab en segunda línea se han estudiado. En este total de 15 pacientes se ha realizado tanto estudio del exoma del ADN del tumor primario, como del ctDNA extraído mediante biopsia líquida (Figura 24).

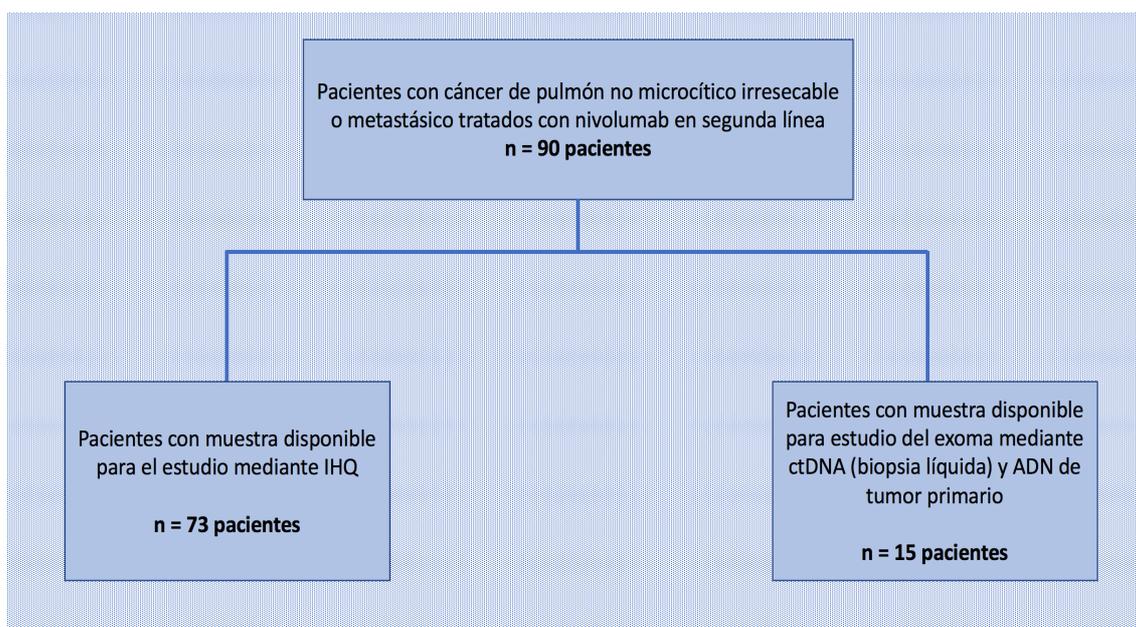


Figura 24. Algoritmo resumen del protocolo del estudio con el número de muestras disponibles para cada grupo.

### **Características generales de la muestra estudiada por inmunohistoquímica**

Un total de 90 pacientes han sido incluidos para el estudio de resistencia a inmunoterapia por inmunohistoquímica. De las 90 biopsias obtenidas para estudio de inmunohistoquímica se pudo hacer determinación de PD-L1 en el 100% de los pacientes y se pudo determinar la expresión de p53 y genes reparadores en 73 (81,1%).

La mediana de edad de los pacientes fue de 67 años [44-84], de los cuales 70 eran varones y 20 mujeres. La histología más frecuente el adenocarcinoma en 43 pacientes, seguido de la epidermoide en 41 e indiferenciado en 6 pacientes. El lugar más frecuente de afectación metastásica fue la ganglionar en 85 pacientes, seguida de la pulmonar en 65 pacientes. La afectación ósea se observó en 30 pacientes y la hepática en 20 pacientes. La totalidad de los pacientes fueron tratados con nivolumab en segunda línea o posteriores, siendo en 75 pacientes la utilización de nivolumab tras el uso de una primera línea con doblete de platino. El número medio de dosis que los pacientes recibieron fue de 7. El paciente que más dosis había recibido fue un total de 94. El paciente que menos una única dosis. Las respuestas obtenidas fueron completas en 6 pacientes (6.7%), parcial en 17 pacientes (18.9%), estabilización en 16 pacientes (17.8%) y en 51 progresión de la enfermedad tumoral (56.7%).

La mediana de expresión de PD-L1 fue 1.5%. En 36 pacientes la expresión de PD-L1 fue negativa o del 0% y en 54 pacientes fue positiva o  $\geq 1\%$ . La expresión fue mayor o igual al 10% en 25 pacientes y  $< 10\%$  en 65 pacientes. La mediana de expresión de la proteína p53 fue del 2% (73 pacientes analizados), siendo considerada positiva ( $\geq 5\%$ ) en 32 pacientes y negativa en 41 pacientes ( $< 5\%$ ). Se observó pérdida de expresión de los genes reparadores en 6 pacientes. En 5 pacientes la pérdida de expresión fue del gen *PMS2* y en 1 pacientes fue de *PMS2* y *MLH1*.

En el análisis de la SG se observó una mediana de supervivencia de 22 meses [IC 95% 14-30 meses] (Figura 25). No se observaron diferencias en la SG en cuanto a la edad estratificando a los pacientes en mayores o menores de 70 años ( $p = 0.828$ ) o al sexo ( $p = 0.539$ ). Tampoco se observaron diferencias en la muestra en cuanto al subtipo histológico entre los pacientes con subtipo adenocarcinoma y epidermoide ( $p = 0.327$ ). Los pacientes con tumores que tenían PD-L1 positivo presentaron una SG de 25 meses [IC 95% 16-34 meses] frente a los que tenían PD-L1 negativo que fue de 21 meses [IC 95% 11-31 meses] ( $p = 0.718$ ). Tampoco se observó diferencias si se estratificó en PD-L1 mayor al 10% o

menor o igual al 10% ( $p = 0.273$ ). En la estratificación entre aquellos pacientes con toxicidad grado  $\geq 3$  (grave) frente a aquellos pacientes con toxicidad grado menor o igual a 2 no se observaron diferencias estadísticas ( $p = 0.149$ ).

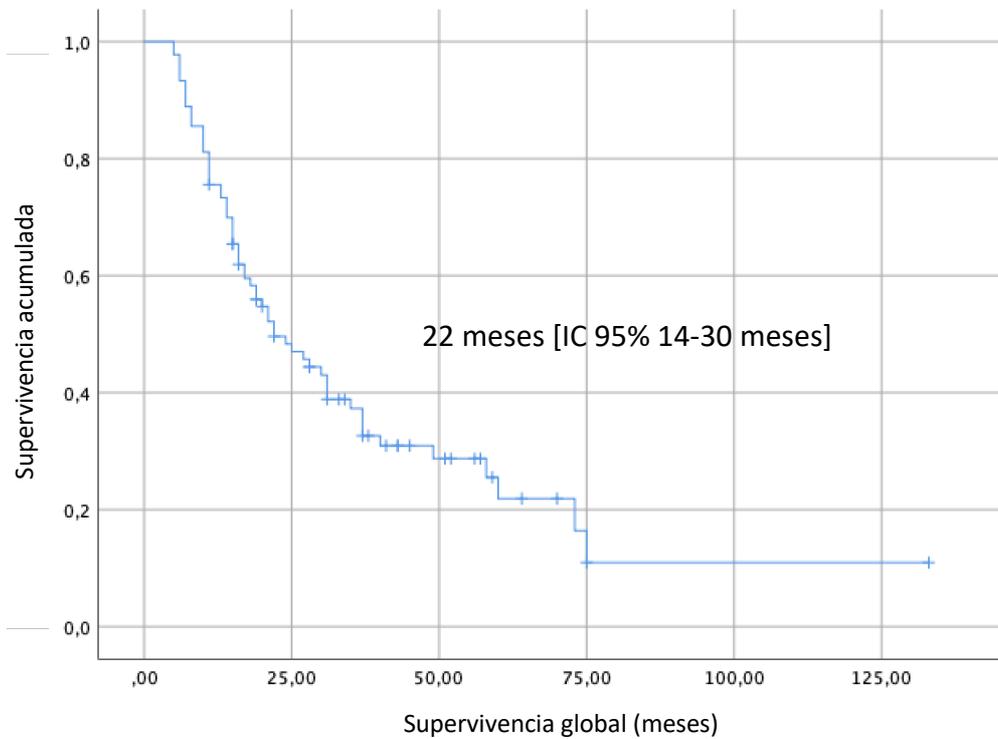


Figura 25. Curva de Kaplan-Meier en donde se observa la SG de los pacientes de la muestra que fueron estudiados sus tumores por IHQ.

La SLP de la muestra global fue de 4 meses [IC 95% 3-5 meses] (Figura 26). No se observó diferencia en la SLP en función de la edad ( $p = 0.272$ ) o del sexo ( $p = 0.084$ ). Tampoco se observaron en función del subtipo histológico ( $p = 0.343$ ).

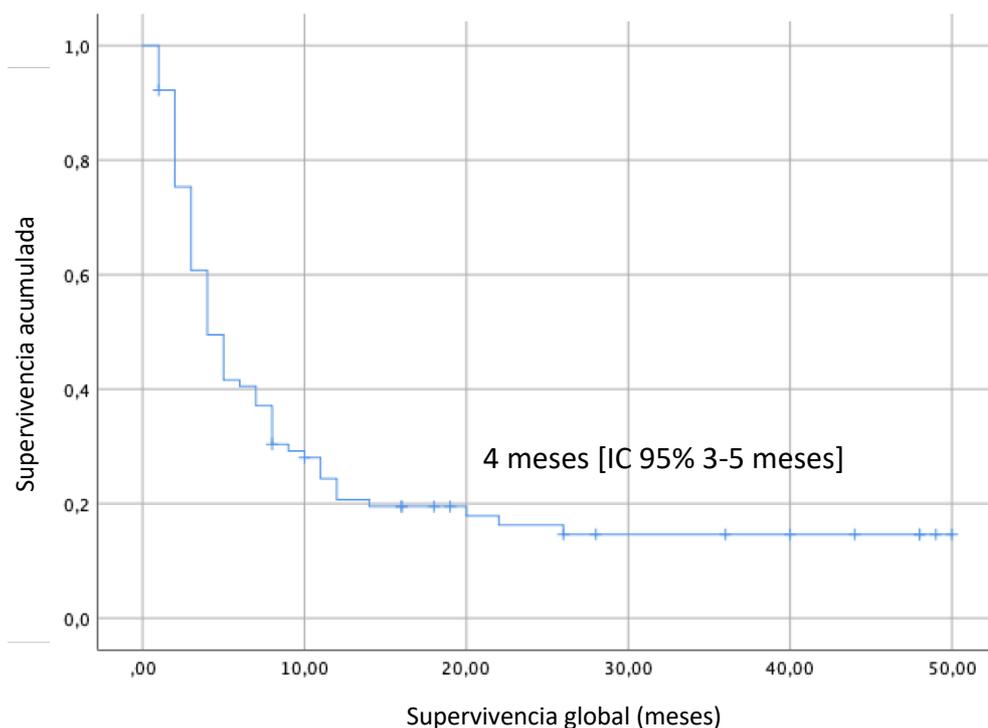


Figura 26. Curva de Kaplan-Meier en donde se observa la SLP de los pacientes de la muestra que fueron estudiados sus tumores por IHQ.

Hubo diferencias estadísticamente significativas en la SLP en función de los valores de PD-L1. La SLP de los pacientes con PD-L1 positivo fue de 6 meses [IC 95% 3.5-8.5 meses] frente a 4 meses [IC 95% 3-5 meses] (HR = 0.651; p = 0.049) (Figura 27). En pacientes con PD-L1  $\geq 10\%$  la SLP fue de 8 meses [IC 95% 3-13 meses] frente a 4 meses [IC 95% 3-5 meses] (HR 0.539; p = 0.018) (Figura 28). No se observaron diferencias en SLP en función de los tratamientos previos del paciente. Los pacientes que recibieron 1 única línea de tratamiento previo presentaron una SLP de 5 meses [IC 95% 4-6] frente a 4 meses [IC 95% 1.5-6.5] en pacientes que habían recibido 2 o más líneas (p = 0.817). Se observaron diferencias de la SLP estadísticamente significativas en función de la toxicidad observada (grado  $\geq 3$  frente 2 o menor) con 11 meses frente 4 meses (p = 0.037) En la Tabla 7 se resumen las características generales de los pacientes con tumores estudiados por IHQ.

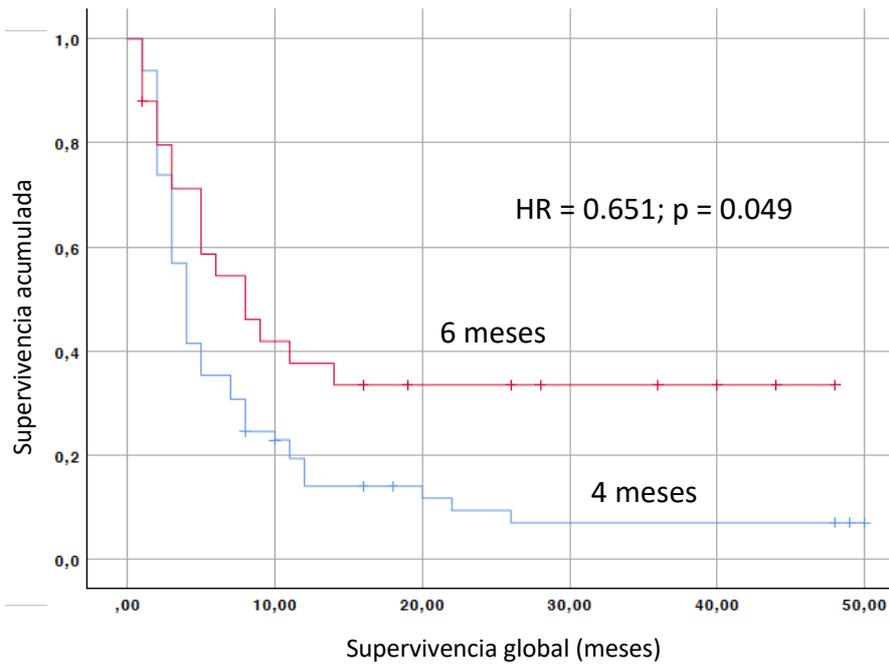


Figura 27. Kaplan-Meier comparativo de SLP entre pacientes con PD-L1  $\geq 10\%$  (rojo) frente a pacientes con PD-L1  $< 10\%$  (azul).

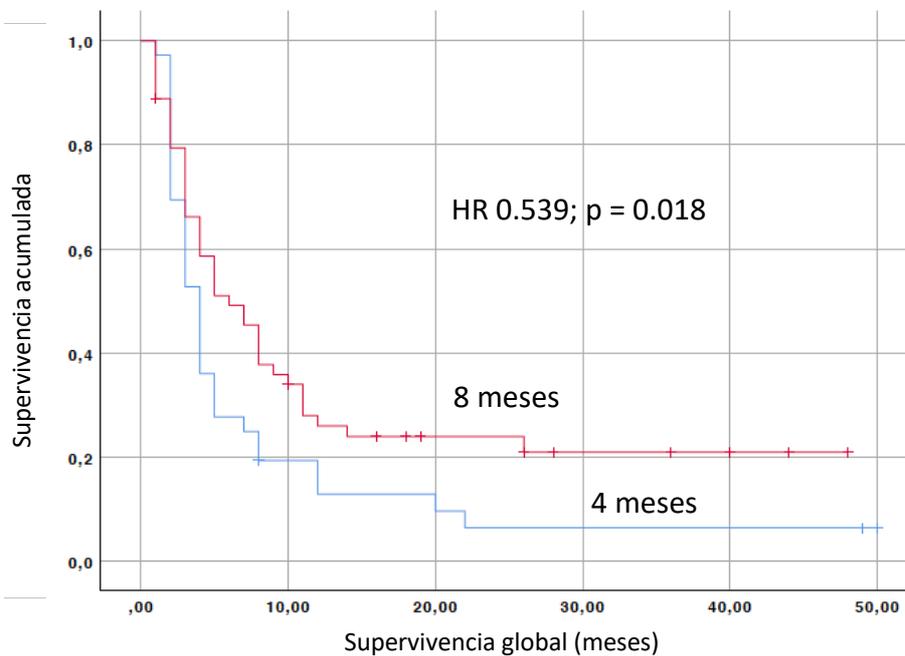


Figura 28. Kaplan-Meier comparativo de SLP entre pacientes con PD-L1  $\geq 1\%$  (rojo) frente a pacientes con PD-L1 0% (azul).

**Tabla 7. – Características generales de la muestra estudiada mediante inmunohistoquímica para los genes del sistema MMR y el gen TP53.**

<i>Muestra</i>	<i>Global, 90 (100%)</i>	<i>Adenocarcinoma, 43 (%)</i>	<i>Escamoso, 41 (%)</i>
Edad	67 [44-84]	67 [44-84]	67 [53-83]
Sexo (Varón/Mujer)	70/20 (77.8 / 22.2%)	28/15 (65.1 / 34.9%)	36/5 (87.8 / 12.2%)
PD-L1			
• Negativo	36 (40%)	23 (53.5%)	12 (29.7%)
• Positivo	54 (60%)	20 (46.5%)	28 (68.3%)
Respuesta obtenida			
• Completa	6 (6.7%)	3 (7%)	3 (7.3%)
• Parcial	17 (18.9%)	3 (7%)	11 (26.8%)
• Estabilización	16 (17.8%)	8 (18.6%)	8 (19.5%)
• Progresión	51 (56.7%)	29 (67.4%)	19 (46.3%)
Expresión de p53	Obtenida en 73 pacientes	Obtenida en 36 pacientes	Obtenida en 34 pacientes
• < 5%	41 (56.2%)	24 (55.8%)	20 (58.8%)
• ≥ 5%	32 (43.8%)	19 (44.2%)	14 (41.2%)

Expresión genes sistema MMR	Obtenida en 73 pacientes	Obtenida en 36 pacientes	Obtenida en 34 pacientes
• Pérdida	6 (8.2%)	4 (11.1%)	2 (5.9%)
• Conservada	67 (91.8%)	32 (88.9%)	32 (94.1%)
Supervivencia global	22 meses [IC 95% 14-30]	31 meses [IC 95% 14.5-47.5]	21 meses [IC 95% 16.5-25.5]
• PD-L1 negativo	21 meses [IC 95% 11-31]	37 meses [IC 95% 11.5-62.5]	17 meses [IC 95% 12-22]
• PD-L1 positivo	25 meses [IC 95% 16-34]	25 meses [IC 95% 8-42]	6.5 meses [IC 95% 9.5-34.5]
Supervivencia libre de progresión	4 meses [IC 95% 3-5]	4 meses [IC 95% 3-5]	6 meses [IC 95% 3-9]
• PD-L1 negativo	4 meses [IC 95% 3-5]	4 meses [IC 95% 3-5]	4 meses [IC 95% 2.5-5.5]
• PD-L1 positivo	6 meses [IC 95% 3.5-8.5]	4 meses [IC 95% 2-6]	8 meses [IC 95% 3-13]
Toxicidad	29 pacientes (grado $\geq 1$ )	14 pacientes (grado $\geq 1$ )	13 pacientes (grado $\geq 1$ )
• Grado 0-1	69 pacientes (76.7%)	16 pacientes (37.2%)	32 pacientes (78%)
• Grado $\geq 2$	21 pacientes (23.3%)	27 pacientes (62.8%)	9 pacientes (22%)

\*Se excluye de la tabla los 6 pacientes con tumores indiferenciados debido a su escasa representación en la muestra.

### **Características generales de la muestra estudiada por secuenciación genética masiva**

Un total de 15 pacientes han sido incluidos para el estudio mediante análisis del exoma (Tabla 8), tanto en ctDNA extraído por biopsia líquida como del ADN obtenido del tumor primario. Todos los pacientes al igual que en la muestra anterior, presentaban cáncer de pulmón no microcítico avanzado o irreseccable tratados en segundas líneas con nivolumab.

La mediana de edad de los pacientes fue de 65 años [49-80], de los cuales 10 eran varones y 5 mujeres. La histología más frecuente el adenocarcinoma en 11 pacientes, seguido de la epidermoide en 3 e indiferenciado en 1 paciente. El lugar más frecuente de afectación metastásica fue la ganglionar en 14 pacientes, seguida de la pulmonar en 7 pacientes. La afectación ósea se observó en 5 pacientes y la hepática en 3 pacientes. Únicamente 1 paciente presentaba afectación metastásica a nivel cerebral. El número medio de dosis que los pacientes recibieron fue de 9. El paciente que más dosis había recibido de inmunoterapia fue un total de 101 con nivolumab. El paciente que menos una única dosis debido al fallecimiento tras la administración de la primera dosis de tratamiento con inmunoterapia.

La mediana de expresión de PD-L1 fue 1%. En 7 pacientes la expresión de PD-L1 fue negativa o del 0% y en 8 pacientes fue positiva o  $\geq 1\%$ . La expresión fue mayor o igual al 10% en 4 pacientes y  $< 10\%$  en 11 pacientes. Las respuestas del grupo global de pacientes fueron de 1 respuesta completa (6.7%), 6 respuestas parciales (40%), 4 estabilizaciones de la enfermedad (26.7%) y 4 progresiones (26.7%). Se observó inmunotoxicidad en 7 pacientes (46.7%). La toxicidad fue grado 1-2 en todos los pacientes excepto en un paciente que presentó toxicidad renal grado 3 (asimismo este fue el paciente que tuvo la respuesta completa y que en la actualidad sigue manteniendo a pesar de haber sido necesario la suspensión del tratamiento inmune).

Con el fin de facilitar el análisis del exoma y su posterior interpretación se han dividido los pacientes en dos subgrupos de respuesta en función de los criterios de respuesta y supervivencia descritos en el punto 1 de la sección de material y métodos (basados en la SLP). Los pacientes que presentaron respuesta fueron los mismos que tuvieron una supervivencia favorable basada en la SLP. Un total de 7 (46.7%) presentaron respuesta favorable y en 8 pacientes (53.3%) no se objetivó respuesta.

La SG de la muestra estudiada mediante el exoma fue de 14 meses [IC 95% 12-16 meses] (Figura 29) con una SLP de 8 meses [IC 95% 2-14 meses]. No se observaron diferencias en un análisis estadístico en cuanto a valores de PD-L1, histología, edad, sexo o presencia de toxicidad.

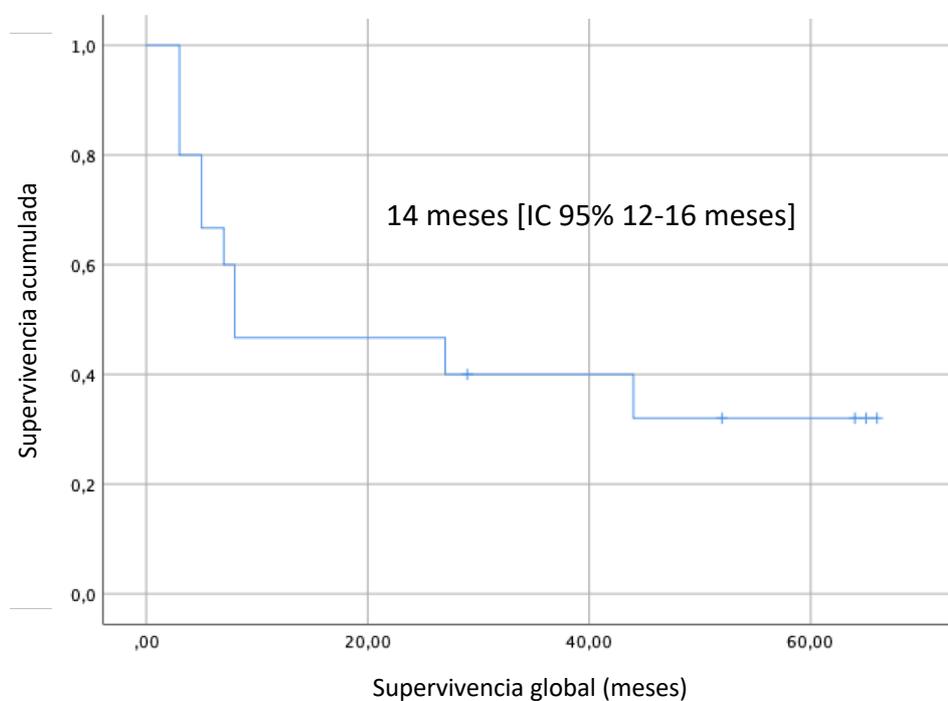


Figura 29. Supervivencia global en la muestra estudiada por secuenciación genética masiva.

**Tabla 8. – Características generales de la muestra estudiada mediante NGS.**

<i>Muestra</i>	<i>Características generales</i>
Número de pacientes	15 (n = 100%)
Edad	65 [49-80]
Sexo (Varón/Mujer)	10/5 (66.7 / 33.3%)
Media de dosis recibidas	9 [1-101]
Pacientes por grupo de respuesta	7 buena respuesta/ 8 mala respuesta (46.7 / 53.3%)
PD-L1	
• Negativo	7 (46.7%)
• Positivo	8 (53.3%)
Respuesta obtenida	
• Completa	1 (6.7%)
• Parcial	6 (40%)
• Estabilización	4 (26.7%)
• Progresión	4 (26.7%)

## ***2- RESULTADOS DEL ANÁLISIS POR INMUNOHISTOQUÍMICA***

De las 90 muestras tumorales de pacientes con CPNM avanzado y tratamiento de inmunoterapia en segunda línea se ha podido realizar la IHQ en 73 pacientes (81.1%).

### **Estudio de la expresión proteica de p53**

La expresión proteica de p53 por IHQ fue del 0% en 35 pacientes (Figura 30). En total 32 pacientes tenían una expresión  $< 5\%$  y en 41 pacientes fue  $\geq 5\%$ . De estos pacientes la expresión de PD-L1 fue negativa en 27 pacientes y  $\geq 1\%$  en 46 pacientes.

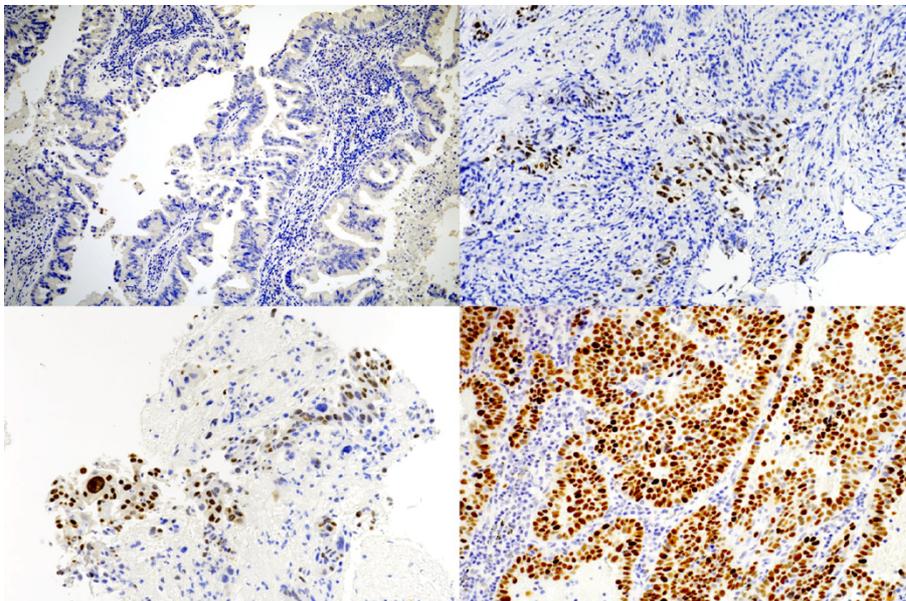


Figura 30. Expresión proteica de p53 mediante IHQ. Arriba a la izquierda 0% de expresión, arriba a la derecha 30%, abajo a la izquierda 50% y abajo a la derecha 100%.

Del análisis global de los 73 pacientes, la SG de la muestra fue de 13 meses [IC 95% 8.5-17.5] (Figura 31). La SLP fue de 5 meses [IC 95% 3.5-6.5] (Figura 32). La SG de la histología adenocarcinoma fue de 16 meses [IC 95% 3.5-28.5] con una SLP de 4 meses [IC 95% 2.5-5.5]. La SG de la histología escamosa fue de 12 meses [IC 95% 9-15] con una SLP de 5 meses [IC 95% 2-8]. La SLP del subgrupo con PD-L1 negativo fue de 4 meses [IC 95% 3-5] frente a 6 meses [IC 95% 3-9] en el subgrupo con PD-L1 positivo ( $p = .097$ ). La respuesta obtenida global fue de: (1) respuesta completa 4 pacientes (5,4%); (2) respuesta parcial 13 pacientes (17,8%); (3) estabilización 16 pacientes (21,9%); progresión 40 pacientes (54,8%). El número medio de dosis administradas fue de 7.

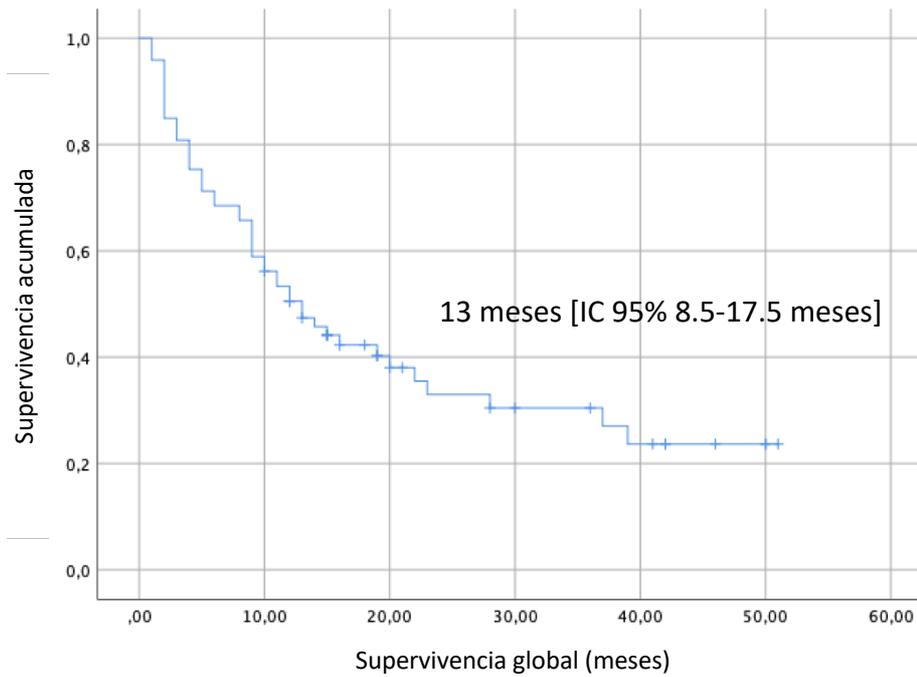


Figura 31. Gráfica de la SG de la muestra estudiada para la expresión de p53.

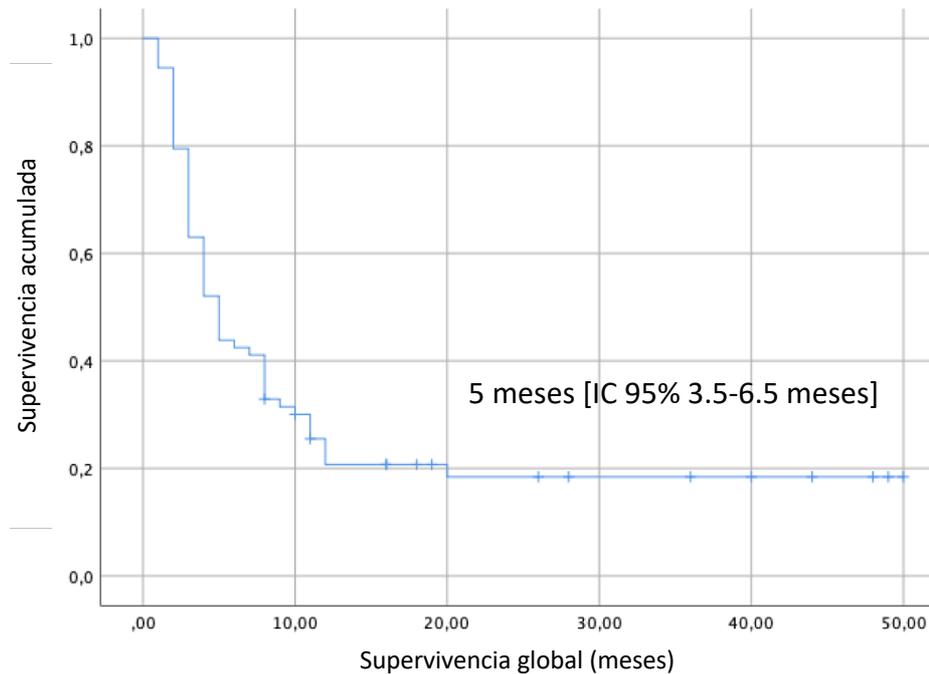


Figura 32. Gráfica de la SLP de la muestra estudiada para la expresión de p53.

En el análisis de supervivencia por expresión proteica de p53 la SG de p53 para un punto de corte de expresión proteica de  $< 5\%$  fue 12 meses [IC 95% 7.5-16.5] frente a 20 meses [IC 95% 3.5-36.5] (HR = 0.590 [CI 95% 0.327-1.064];  $p = .070$ ) en  $p53 \geq 5\%$  (Figura 33).

La SLP fue de 4 meses [IC 95% 3.0-5.0] frente 7 meses [IC 95% 3.5-10.5] (HR = 0.630 [CI 95% 0.370-1.072]; p =.064). En el análisis por histología, se observan diferencias estadísticamente significativas en la histología adenocarcinoma, no así para tumores escamosos. En adenocarcinomas la SG 8 meses [IC 95% 0.0-16.0] en p53 < 5% frente una mediana no alcanzada al momento del estudio en p53 ≥ 5% (HR = 0.173 [CI 95% 0.049-0.616]; p =.002) (Figura 34). La SLP fue de 3 meses [IC 95% 2-4] en p53 <5% frente a 8 meses [IC 95% 4.5-11.5] en p53 ≥ 5% (HR = 0.372 [CI 95% 0.155-0.894]; p =.013). En escamosos no se observaron diferencias en SG (p=.247) ni SLP (p=.860).

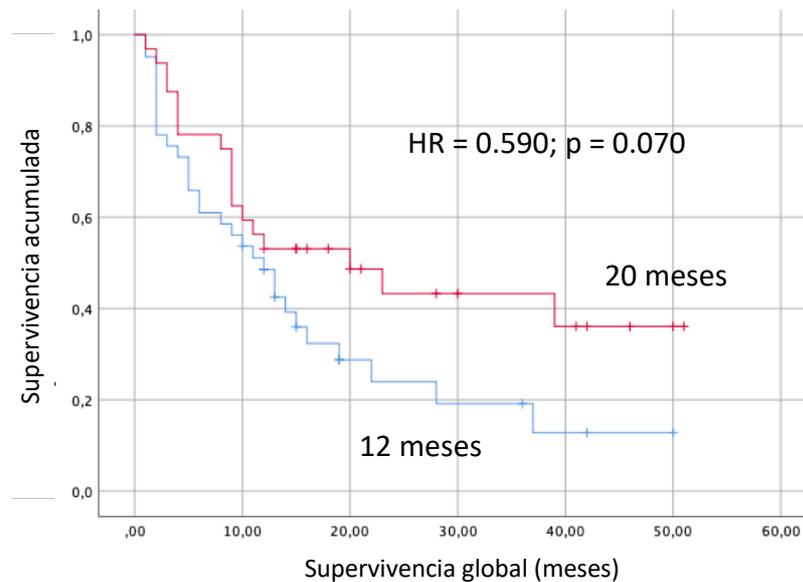


Figura 33. Curva de Kaplan-Meier que muestra la comparativa de SG en función de los valores de p53. En azul la expresión < 5% y en rojo la expresión ≥ 5%.

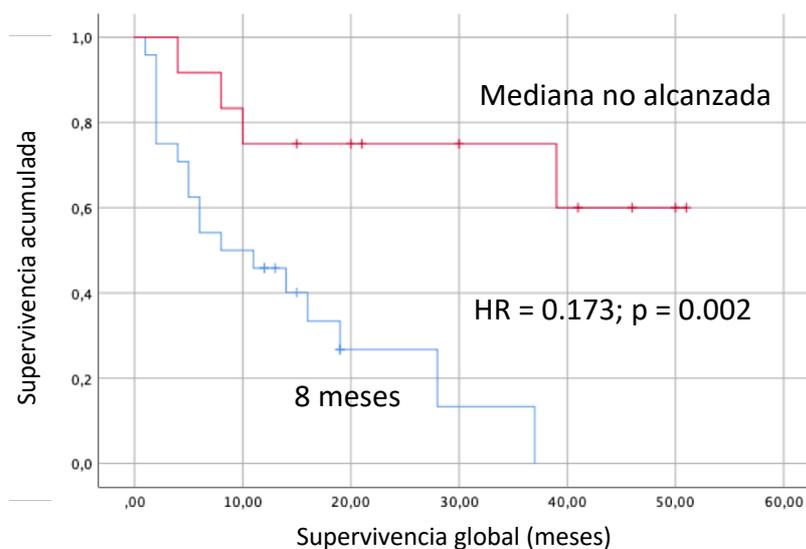


Figura 34. Curva de Kaplan-Meier que muestra la comparativa de SG en adenocarcinomas en función de los valores de p53. En azul la expresión < 5% y en rojo la expresión ≥ 5%.

Las únicas diferencias estadísticamente significativas en cuanto al sexo se observaron en la SLP en pacientes mujeres. La SLP fue de 3 meses [IC 95% 2-4] en  $p53 < 5\%$  frente a 5 meses [IC 95% 0.5-11.5] en  $p53 \geq 5\%$  (HR = 0.233 [CI 95% 0.056-0.975];  $p = .020$ ). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la SG ( $p = .123$ ). Tampoco se observaron diferencias en SG ( $p = .247$ ) o SLP ( $p = .239$ ) en pacientes varones. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el estudio por subgrupos en función de toxicidad o lugar de afectación metastásica.

El análisis de la respuesta asociada a la expresión de p53, se objetivó un mayor porcentaje de respuestas en aquellos pacientes con expresión proteica de  $p53 \geq 5\%$ . Todos los pacientes que presentaron respuesta completa pertenecían al subgrupo de expresión  $\geq 5\%$ . En contraste, los pacientes con progresión como mejor respuesta pertenecían en su mayoría al subgrupo con expresión  $< 5\%$  (61% de pacientes) frente al subgrupo con expresión  $\geq 5\%$  (46.9% de los pacientes). Estos hallazgos no fueron estadísticamente significativos por la prueba estadística de chi-cuadrado ( $p = .103$ ). Se muestran los resultados de manera gráfica en la Figura 35.

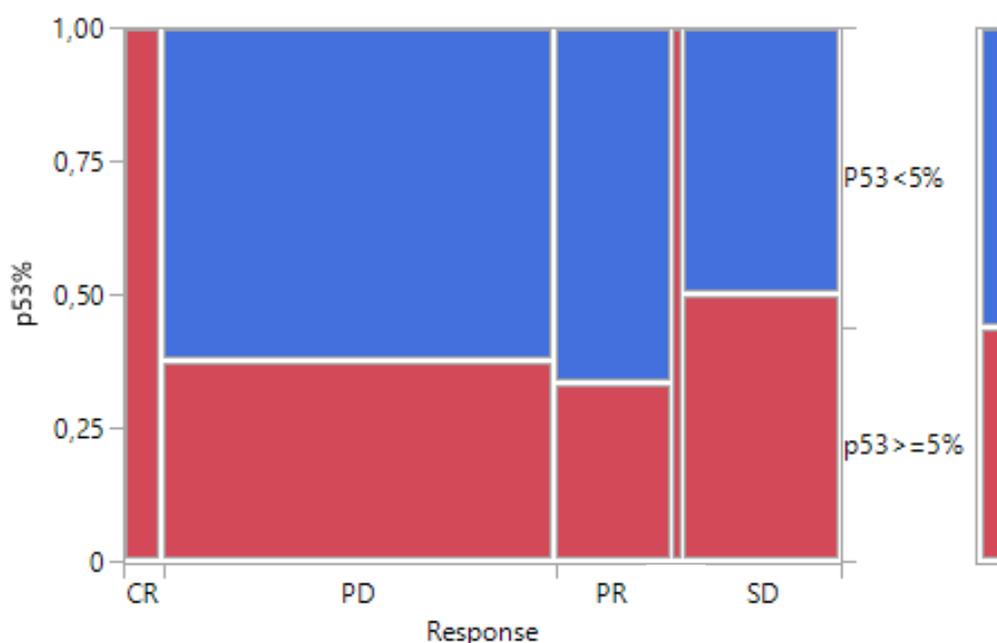


Figura 35. Porcentaje de respuestas en función de la expresión de p53.

\*CR: respuesta completa; PD: respuesta parcial; PR: progresión; SD: enfermedad estable, \*\*Response: respuesta

Cuando se ha realizado un análisis de la muestra en función de la positividad o negatividad de la expresión de PD-L1, las diferencias estadísticamente significativas se han hallado en el subgrupo de pacientes con PD-L1 negativo. Para este subgrupo de pacientes, la SG fue de 13 meses [IC 95% 11.0-15.0] en p53 < 5% frente 39 meses [IC 95% 0.0-78.5] en p53 ≥ 5% (HR = 0.298 [CI 95% 0.093-0.950]; p =.024) (Figura 36). La SLP fue de 3 meses [IC 95% 2-4] en p53 < 5% frente 7 meses [IC 95% 1.5-12.5] en p53 ≥ 5% (HR = 0.478 [CI 95% 0.186-1.231]; p =.070). En PD-L1 positivo no se hallaron diferencias ni en SG (p=.449) ni SLP (p=.525). Se realizaron análisis exploratorios con puntos de corte diferentes de PD-L1 (10%, 25% y 50%) sin hallarse diferencias de SG ni SLP entre las diferentes cohortes.

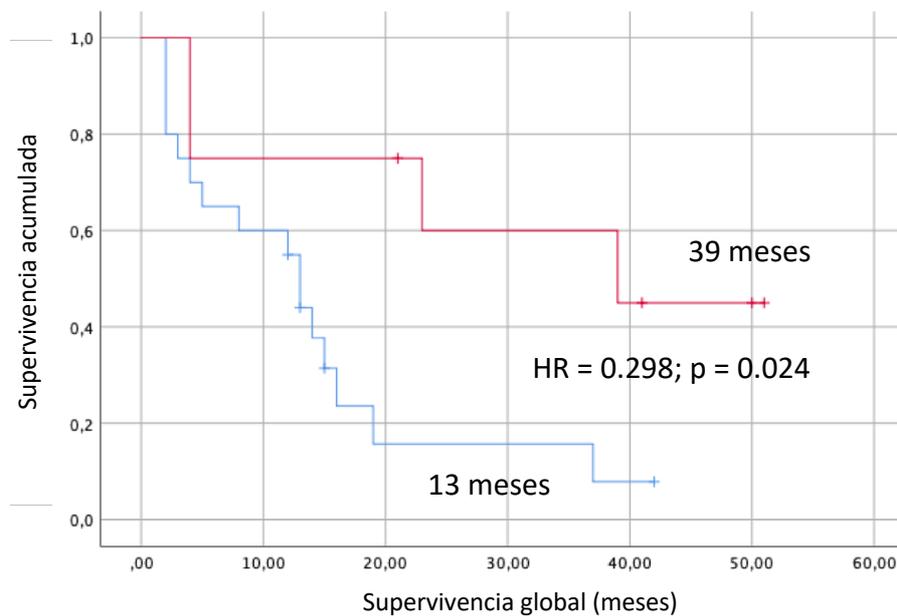


Figura 36. Curva de Kaplan-Meier que muestra la comparativa de SG en tumores PD-L1 negativo en función de p53. En azul la expresión < 5% y en rojo la expresión ≥ 5%.

Dentro del subgrupo de pacientes con adenocarcinoma y PD-L1 negativo, se observó que una SG de 14 meses [IC 95% 5-30] en p53 < 5% frente a una mediana no alcanzada de SG en p53 ≥ 5% (HR = 0.096 [CI 95% 0.011-0.806]; p =.010) (Figura 37). La SLP fue de 3 meses [IC 95% 2-4] en p53 < 5% frente a 7 meses [IC 95% 2-11] en p53 ≥ 5% (HR = 0.392 [CI 95% 0.122-1.262]; p =.078). En el subgrupo epidermoide y PD-L1 negativo, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas ni en SG (p=.894) ni SLP (p=.624).

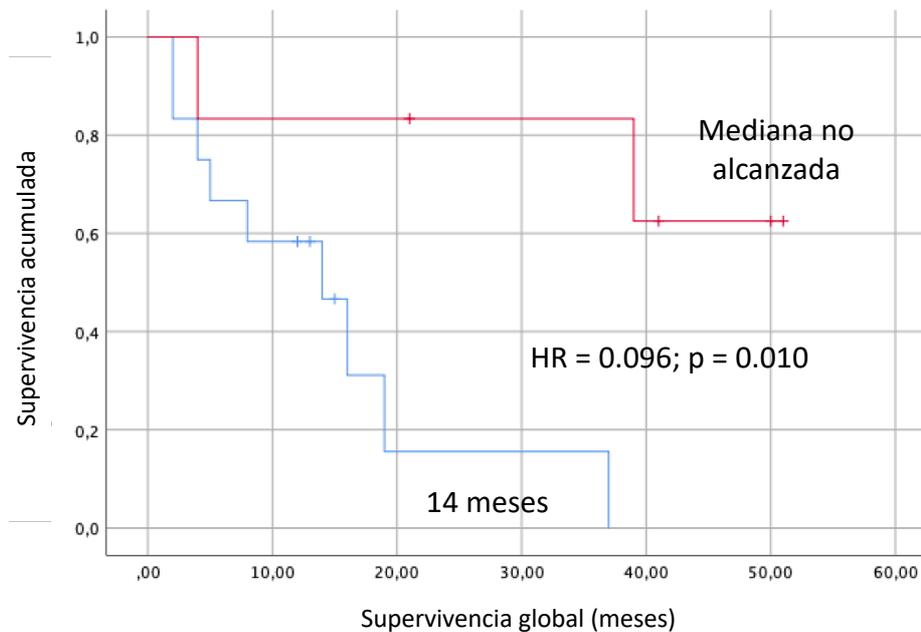


Figura 37. Curva de Kaplan-Meier que muestra la comparativa de SG en adenocarcinomas PD-L1 negativo en función de p53. En azul la expresión < 5% y en rojo la expresión ≥ 5%.

Para validar el punto de corte elegido, pese a lo mostrado previamente en la literatura, se ha realizado una curva ROC que muestre cual es el punto de corte de la expresión proteica de p53 con la sensibilidad y especificidad más homogénea. En la realización de esta se han dividido a los pacientes en dos subgrupos en función de la respuesta obtenida (véase material y métodos, punto 1), como un marcador subrogado de la SLP que ha marcado si existía una respuesta favorable o desfavorable. Se objetiva en la Figura 38 la gráfica de curva ROC donde el punto de corte del 5% es el que presenta la sensibilidad y especificidad más homogénea de toda la muestra.

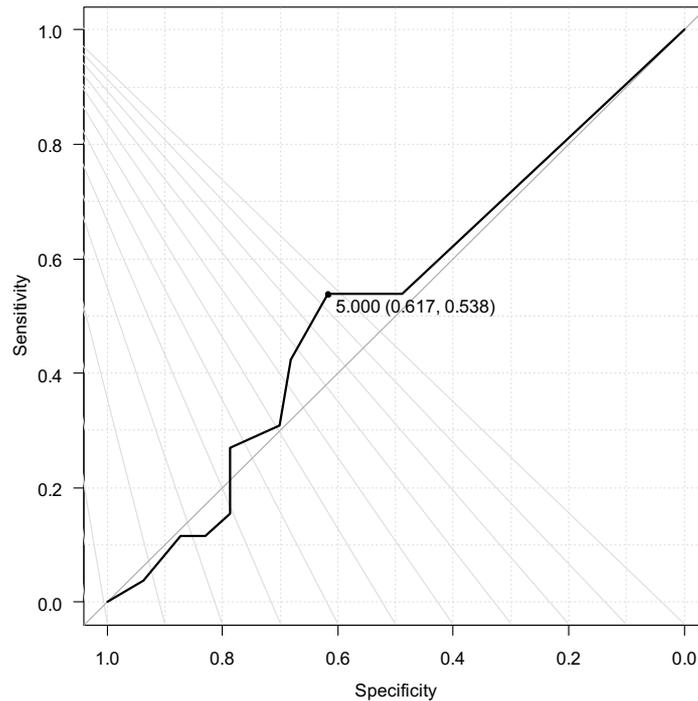


Figura 38. Curva ROC para la validación del punto de corte de p53 que subdivida los pacientes con buena respuesta frente a mala respuesta.

### **Estudio de expresión de los genes del sistema MMR**

Se estudió la expresión mediante IHQ de los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* (sistema MMR). Las muestras en las que se pudo analizar la expresión de los genes del sistema MMR fueron las mismas que las de p53 (73 de 90, 81.1%). En total se observó la pérdida de expresión de los genes reparadores en 6 pacientes de los 73 analizados (8.2%).

En los 6 pacientes en los que se observó pérdida de expresión el gen afecto fue *PMS2*. A mayores, en uno de los pacientes se observó doble pérdida de expresión, con déficit de *MLH1* y *PMS2*. Dado que los 73 pacientes que se estudiaron fueron los mismos que los del apartado anterior, la SG y la SLP fueron las que se indican en el punto previo. En la comparativa entre la SG de los pacientes con expresión conservada frente a pérdida se observó una SG de 12 meses frente a 14 meses respectivamente ( $p = 0.598$ ) (Figura 39). La SLP de los pacientes con expresión conservada del sistema MMR fue de 4 meses frente a 8 meses de los pacientes con pérdida de expresión ( $p = 0.661$ ) (Figura 40).

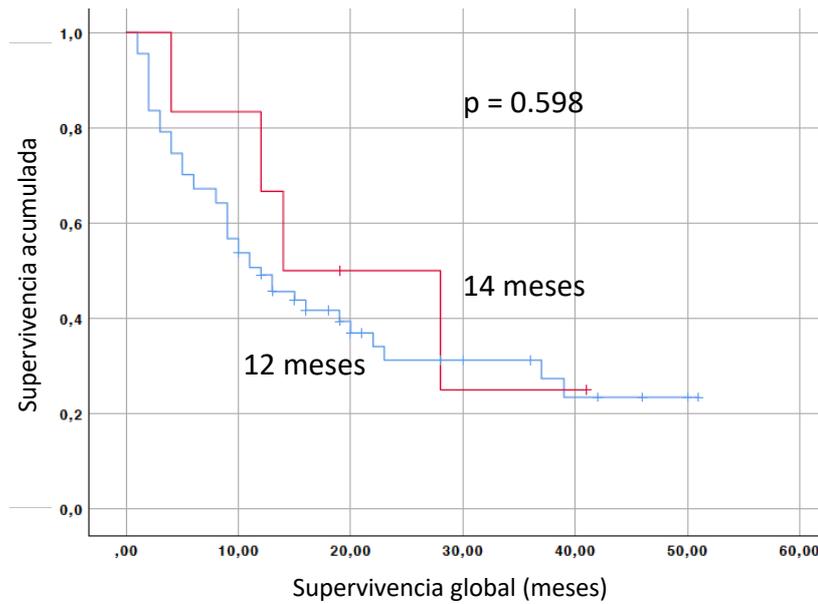


Figura 39. Curva de Kaplan-Meier que muestra la comparativa de SG entre pacientes con expresión de genes del sistema MMR perdida (rojo) frente conservada (azul).

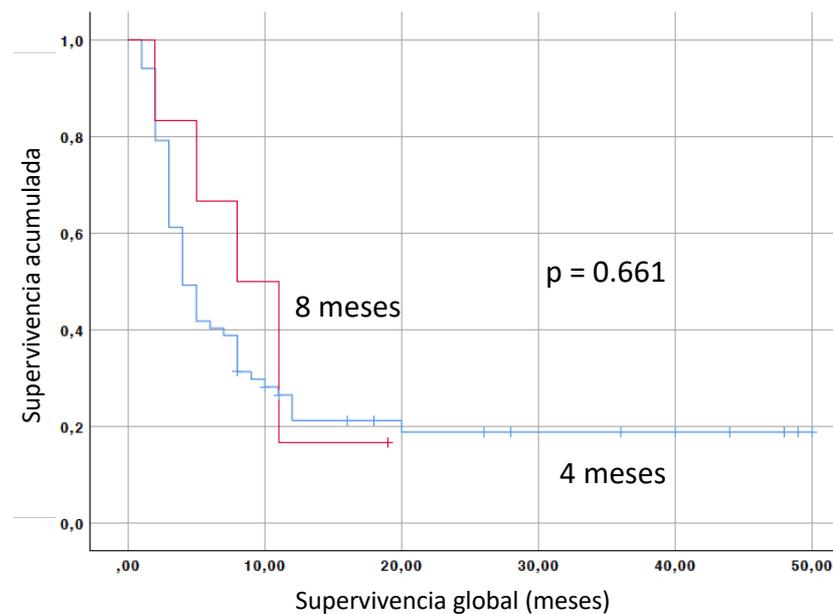


Figura 40. Curva de Kaplan-Meier que muestra la comparativa de SLP entre pacientes con expresión de genes del sistema MMR perdida (rojo) frente conservada (azul).

Se analizó la existencia de la relación entre la pérdida de expresión del sistema MMR y la mejor respuesta obtenida (4 grupos en función de criterios RECIST 1.1) con el tratamiento de inmunoterapia mediante una Chi-cuadrado de Pearson obteniéndose una significación de  $p = 0.045$  (Figura 41).

### Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
<b>Chi-cuadrado de Pearson</b>	<b>8,070<sup>a</sup></b>	<b>3</b>	<b>,045</b>
<b>Razón de verosimilitud</b>	<b>7,079</b>	<b>3</b>	<b>,069</b>
<b>Asociación lineal por lineal</b>	<b>,498</b>	<b>1</b>	<b>,480</b>
<b>N de casos válidos</b>	<b>73</b>		

Figura 41. Prueba de Chi-cuadrado entre las variables cualitativas de expresión del sistema MMR frente a la respuesta obtenida.

No se observaron diferentes estadísticas en SG en función de la expresión de MMR por factores como sexo (solo varones presentaron pérdida de expresión,  $p = 0.595$ ), histología (grupo adenocarcinoma  $p = 0.359$ , grupo epidermoide  $p = 0.271$ ) o positividad/negatividad de PD-L1 (grupo PD-L1 negativo  $p = 0.744$ , positivo  $p = 0.641$ ). Tampoco se observaron diferencias en SLP en grupos de conservación o expresión de MMR en función de factores como sexo ( $p = 0.668$ ), histología (adenocarcinoma  $p = 0.399$ , epidermoide  $p = 0.556$ ) o PD-L1 (grupo negativo  $p = 0.753$ , positivo  $p = 0.346$ ).

Se analizó si la presencia de una toxicidad grave (grado  $\geq 3$ ) se correlacionaba con la pérdida de expresión de los genes reparadores. Se realizó una comparativa mediante la prueba exacta de Fisher en donde se observó una  $p = 0.022$  (*Odds Ratio* = 10.167 [IC 95% 1.669-61.919]) (Figura 42). Por lo tanto, existió una asociación estadísticamente significativa entre toxicidad  $\geq 3$  y la pérdida de expresión de los genes del sistema MMR. Se ajustó posteriormente el calculo en función de la mejor respuesta obtenida como factor de confusión, dividiéndose los grupos de respuesta en función de respuesta si/no. Se observó como la asociación entre toxicidad e IHQ del sistema MMR se centraba en aquellos pacientes con respuesta favorable (estabilización, respuesta parcial o completa) (Figura 43).

### Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8,583 <sup>a</sup>	1	,003		
Corrección de continuidad <sup>b</sup>	5,206	1	,023		
Razón de verosimilitud	5,801	1	,016		
Prueba exacta de Fisher				,022	,022
Asociación lineal por lineal	8,465	1	,004		
N de casos válidos	73				

Figura 42. Prueba exacta de Fisher entre las variables IHQ del sistema MMR y la toxicidad presentada por los pacientes.

### Pruebas de chi-cuadrado

ORRSINO		Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
NO RESPUESTA	Chi-cuadrado de Pearson	,083 <sup>c</sup>	1	,773		
	Corrección de continuidad <sup>b</sup>	,000	1	1,000		
	Razón de verosimilitud	,158	1	,691		
	Prueba exacta de Fisher				1,000	,925
	Asociación lineal por lineal	,081	1	,776		
	N de casos válidos	40				
RESPUESTA	Chi-cuadrado de Pearson	6,927 <sup>d</sup>	1	,008		
	Corrección de continuidad <sup>b</sup>	4,010	1	,045		
	Razón de verosimilitud	5,495	1	,019		
	Prueba exacta de Fisher				,031	,031
	Asociación lineal por lineal	6,717	1	,010		
	N de casos válidos	33				
Total	Chi-cuadrado de Pearson	8,583 <sup>a</sup>	1	,003		
	Corrección de continuidad <sup>b</sup>	5,206	1	,023		
	Razón de verosimilitud	5,801	1	,016		
	Prueba exacta de Fisher				,022	,022
	Asociación lineal por lineal	8,465	1	,004		
	N de casos válidos	73				

Figura 43. Ajuste de la prueba exacta de Fisher en función del posible factor de confusión respuesta obtenida.

### ***3- RESULTADOS DEL ANÁLISIS POR SECUENCIACIÓN MASIVA***

Un total de 15 pacientes con CPNM que recibieron tratamiento con nivolumab en segunda línea se estudiaron mediante secuenciación masiva de su exoma tanto del tumor primario como del ctDNA extraído mediante biopsia líquida.

#### **Exoma del ADN extraído del tumor primario**

Al analizar el exoma del ADN del tumor primario se han hallado los resultados expuestos a continuación.

- **Estudio de las mutaciones genómicas por inserciones y deleciones.**
  - En el grupo de respuesta el número total de mutaciones INDEL halladas en el exoma fue de 3459 variantes, con una mediana de variantes por caso de 107. Estas alteraciones se han localizado en 2742 genes.
  - En el grupo de no respuesta el número total de mutaciones INDEL halladas en el exoma fue de 2342 variantes, con una mediana de variantes por caso de 60. Estas alteraciones se han localizado en 1875 genes.

El número de genes que se encuentran alterados y que son compartidos entre ambos grupos es de 458 (11%) (Figura 44).

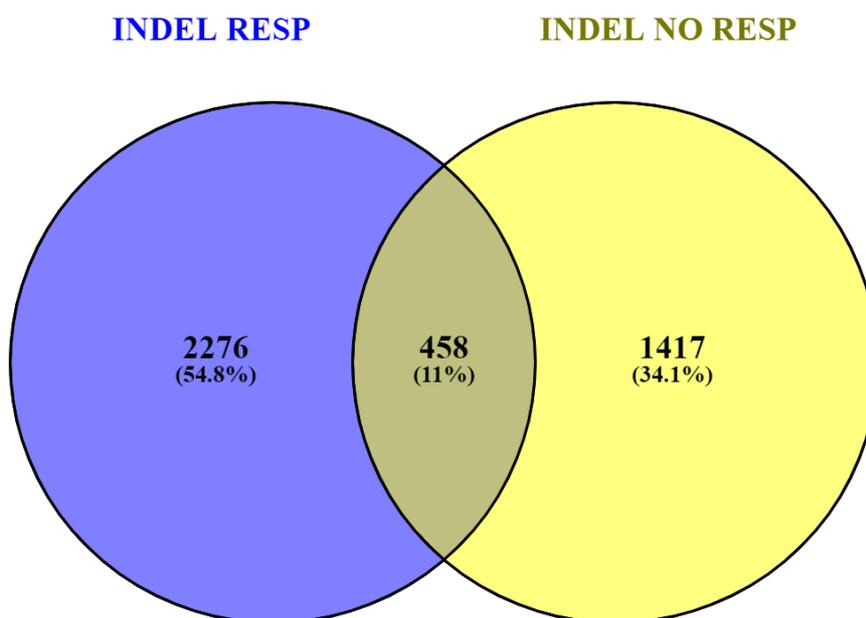


Figura 44. Número de genes con mutaciones tipo INDEL por grupos de respuesta (azul grupo de buena respuesta y amarillo grupo de no respuesta) en el tumor primario.

Cuando se han estudiado los genes compartidos entre ambos grupos de respuesta no se ha hallado ningún gen que se asocie de manera estadísticamente significativa con alguno de los dos grupos. El 11% de los genes que presentaban mutaciones INDEL y se encontraban en al menos alguno de los pacientes de los grupos de respuesta no han presentado ningún tipo de asociación estadística con algún grupo.

Para el grupo de respuesta, un total de 38 de los 2742 genes (1.4%) se encuentran con una frecuencia de al menos el 50% en los pacientes ( $p > 0.05$ ). Estos genes son los siguientes: *ADAMTS20*, *ANKAR*, *ATP2C1*, *C10orf90*, *CADMI*, *CASP10*, *COL27A1*, *CRIMI*, *DOCK1*, *DYNC2H1*, *ESRRG*, *FAT3*, *GK3P*, *GOLGA4*, *HERC1*, *HLTF*, *MCF2L*, *NAA35*, *NEDD4L*, *NRPI*, *NUP98*, *PDIA5*, *PIK3R3*, *RBM6*, *RNF128*, *SCN11A*, *SNHG14*, *SUSD1*, *TDRD6*, *TIAM2*, *TMEM161A*, *USP40*, *VKORC1*, *XPO4*, *ZNF117*, *ZNF638*, *ZNF644* y *ZZEF1*. Estos genes están relacionados con múltiples vías asociadas a procesos de carcinogénesis. Estas vías son las tocantes a PI3K-Akt-mTOR (*PIK3R3*, *ANKAR* y *COL27A1*), a la angiogénesis (*NRPI*), al ciclo celular y la apoptosis (*NUP98* y *CASP10*) y la reparación del daño al ADN (*TMEM161A* y *C10orf90*).

En el grupo de no respuesta, un único gen se ha presentado con una frecuencia mayor al 50% (57% de los pacientes,  $p > 0.05$ ) que es *TTN*. Los otros dos genes que le siguen en frecuencia son *MEDI13L* y *MUC16*, con una frecuencia del 43% para ambos dos ( $p > 0.05$ ).

#### - Estudio de las mutaciones genómicas por polimorfismos de un solo nucleótido

- Cuando se ha analizado el grupo de respuesta se observa que los pacientes presentaban un total de 46641 variantes, con una mediana de 3197.5 variantes por caso. Estas variantes se localizan en 15387 genes.
- En el grupo de no respuesta el número total de mutaciones por SNV fue de 27744, con una mediana de mutaciones por caso de 1292. Estas mutaciones se han localizado en 11613 genes.

Un total de 9489 genes (54.2%) con mutaciones tipo SNV son compartidos por ambos grupos de respuesta (Figura 45).

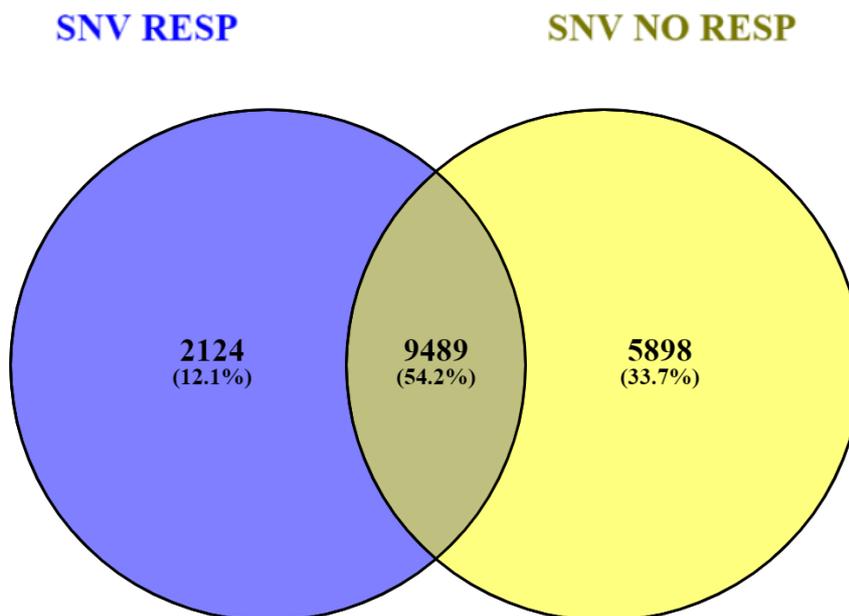


Figura 45. Número de genes con mutaciones tipo SNV por grupos de respuesta (azul grupo de buena respuesta y amarillo grupo de no respuesta) en el tumor primario.

Al igual que en el grupo de genes con mutaciones INDEL, en este grupo de genes mutados con SNV no se han encontrado entre los genes alterados de manera común ninguno que se asocie de manera estadísticamente significativa con alguno de los dos grupos. Para el grupo de respuesta se ha encontrado que en un total de 7 genes (0.035%) se han presentado mutaciones por SNV con una frecuencia del 100% en estos pacientes, siendo específicos de este grupo ( $p > 0.05$ ). Estos genes fueron *ANKRD36C*, *CCDC168*, *DLG5*, *FGD6*, *KMT2C*, *PIK3CA* y *SNHG14*. De estos genes, los tres últimos son los que se encuentran asociados a procesos oncogénicos a nivel de la vía de PI3K-Akt-mTOR (*PIK3CA*), en la remodelación de la cromatina (*KMT2C*) y en la transcripción de ARN no codificante (*SNHG14*).

En el grupo de no respuesta, no ha habido genes alterados que se presenten con una frecuencia del 100%. Un conjunto de 18 genes ha tenido una frecuencia del 71% ( $p > 0.05$ ). Estos genes fueron *AC024940.2*, *ADGRV1*, *ANKRD11*, *ANKRD36C*, *CENPF*, *HUWE1*, *LRP2*, *MUC12*, *MUC16*, *OBSCN*, *RYR2*, *SHROOM3*, *SRRM1*, *SYNE1*, *TCF20*, *TNRC18*, *TRIO*, *TTN* y *VPS13D*. Estos genes están implicados en diferentes rutas que controlan el ciclo celular (*CENPF*), el proteosoma (*HUWE1*), procesos de *splicing*

(*SRRMI*) o la facilitación de la aparición de metástasis (*MUC16*). En la Tabla 9 se adjunta un resumen de los genes alterados hallados en el tumor primario, así como los procesos celulares asociados a cáncer a los que se encuentran asociados.

**Tabla 9. – Resumen de las alteraciones oncogénicas encontradas en los genes mutados del tumor primario.**

<i>Grupo de respuesta</i>	<i>Tipo de mutación</i>	<i>Genes alterados</i>	<i>Rutas funcionales alteradas</i>
Buena respuesta a nivolumab	INDEL	<i>NRP1</i>	Angiogénesis
		<i>PIK3R3, ANKAR, COL27A1</i>	PI3K-Akt-mTOR
		<i>NUP98, CASP10</i>	Ciclo celular y apoptosis
	SNV	<i>TMEM161A, C10orf90</i>	Reparación del daño al ADN
		<i>PIK3CA</i>	PI3K-Akt-mTOR
		<i>KMT2C</i>	Remodelación de la cromatina
		<i>SNHG14</i>	Transcripción ARN no codificante
Mala respuesta a nivolumab	INDEL	<i>MUC16</i>	Señalización celular y desarrollo de metástasis
	SNV	<i>CENPF</i>	Ciclo celular
		<i>HUWE1</i>	Regulación del proteosoma
		<i>SRRMI</i>	<i>Splicing</i>
		<i>MUC16</i>	Señalización celular y desarrollo de metástasis

\*Los genes presentaron una asociación con su grupo de respuesta no estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

#### - Análisis global del exoma del tumor primario

Al realizar el análisis combinado de todas las mutaciones en el exoma por grupos de respuesta, lo primero que se ha realizado es la comparativa por número de mutaciones por caso. En los grupos de buena respuesta la mediana de mutaciones por caso ha sido de 107 en el para las mutaciones INDEL y de 3197.5 para las mutaciones SNV. Para el grupo

de mala respuesta la mediana fue de 60 mutaciones por caso en el grupo INDEL y de 1292 para el grupo SNV (Tabla 10).

**Tabla 10. – Análisis cuantitativo global de las mutaciones halladas en los grupos de respuesta en el tumor primario.**

<i>Grupo de respuesta</i>	<i>INDEL</i>	<i>SNV</i>
<i>Buena respuesta</i>	107 mutaciones/caso	3197.5 mutaciones/caso
<i>Mala respuesta</i>	60 mutaciones/caso	1292 mutaciones/caso

\*p > 0.05 (test exacto de Fisher) para la comparación entre los grupos de respuesta.

En el análisis integrativo de las mutaciones se pone de manifiesto que el 32.2% de los genes son exclusivos para el grupo de respuesta y el 11% del grupo de no respuesta. En total 643 genes han tenido mutaciones INDEL y SNV y son exclusivos del grupo de respuesta y 135 genes lo son para el grupo de no respuesta (Figura 46). En el análisis funcional de los genes hallados en cada grupo se ha encontrado que, en el grupo de respuesta, se localizan genes implicados en las vías de señalización y funcionamiento del receptor CTLA-4 y en la respuesta inflamatoria. Los genes asociados a CTLA-4 se implican fundamentalmente en el bloqueo de la señalización de este receptor (*CD80*, *PIK3CD*, *PIK3R2*, *PPP2CA*, *PTPN6*, *PIK3R3* y *PTPN11*). Por otra parte, los genes relacionados con la respuesta inflamatoria fueron *IL13*, *TGFBI*, *CD4*, *CSF3*, *CXCL1*, *CXCL2*, *IL12B*, *IL2*, *IL4*, *PDGFA* y *IL1A*. En el grupo de no respuesta ha existido un enriquecimiento de genes implicados en los receptores acoplados a proteínas G. Los genes implicados han sido *LINC01531*, *METTL17*, *NPY2R*, *RGPD3* y *ZNF160*.

Se ha analizado si dentro de los 643 genes exclusivos del grupo de respuesta o de los 135 genes del grupo de no respuesta existe algún gen que se asocie de manera estadísticamente significativa con alguno de los dos grupos y sea diferencial de la respuesta o la resistencia no evidenciándose ningún gen.

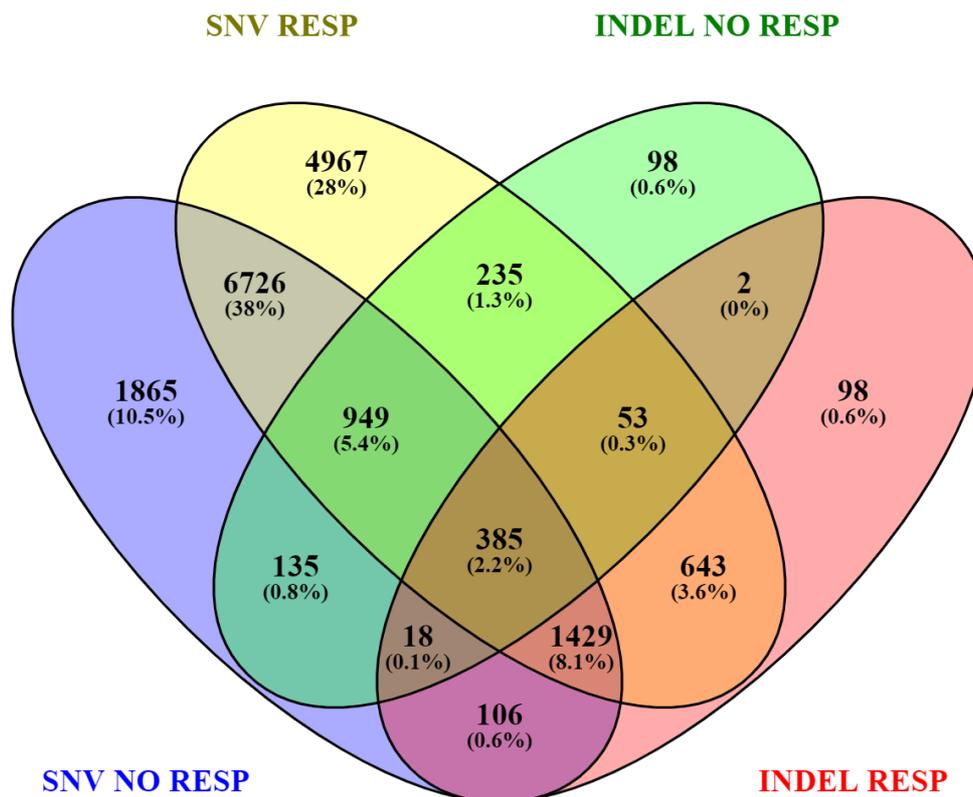


Figura 46. Análisis combinado de las alteraciones genómicas por INDEL y SNV en los dos grupos de estudio en el tumor primario.

### Exoma del ctDNA extraído por biopsia líquida

#### - Estudio de las mutaciones genómicas por inserciones y deleciones.

Al analizar los genes de la muestra que presentaron mutaciones por INDEL se han encontrado los siguientes datos:

- En aquellos pacientes que presentaron una buena respuesta a nivolumab el número de mutaciones INDEL halladas fueron de 12356, de las cuales 8675 fueron variantes no repetidas, con una mediana de 1351 variantes por caso. Estas variantes se localizan en un total de 3257 genes.
- En los pacientes con mala respuesta a nivolumab el número de variantes halladas fue de 19488, siendo únicas en 13499 (no repetidas). La mediana de variantes por caso fue de 1722 que se correspondieron con un total de 3751 genes alterados.

En total, se observó un conjunto de 2755 genes (64.8%) compartidos entre los dos grupos de respuesta (Figura 47).

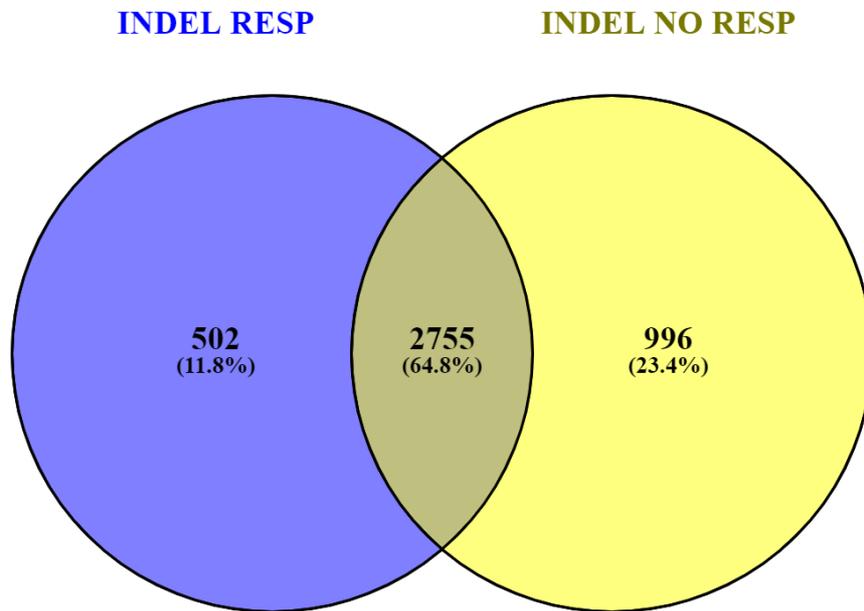


Figura 47. Número de genes con mutaciones tipo INDEL por grupos de respuesta (azul grupo de buena respuesta y amarillo grupo de no respuesta) en el ctDNA.

De los 2755 genes compartidos, 21 se asocian de manera estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) al grupo de no respuesta frente al grupo de respuesta (Tabla 11). Los análisis funcionales de estas alteraciones genéticas encontradas y diferenciales entre los dos subgrupos ponen de manifiesto la presencia de genes implicados en las vías de la autofagia y mitofagia como en el caso del gen *ATG9B* (presente en 11 pacientes de los 15, 3 con buena respuesta y 8 con mala respuesta), así como las vías de la apoptosis con genes como *TUBAL3* (presente en 10 pacientes, 2 con buena respuesta y 8 con mala respuesta) y *POLR2H* (11 pacientes, 3 con buena respuesta y 8 con mala respuesta).

**Tabla 11. – Genes asociados al grupo de no respuesta frente al de respuesta.**

<i>Gen alterado</i>	<i>Frecuencia en el grupo de no respuesta</i>	<i>Frecuencia en el grupo de respuesta</i>
<i>ATG9B</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>C1QTNF9B</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>CCDC167</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>CCDC42</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>CFAP52</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>CIDEA</i>	8 pacientes	2 pacientes
<i>CMAHP</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>CRLF1</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>DMTN</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>INE1</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>LOC646626</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>MTRNR2L6</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>NATB8</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>POLR2H</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>PSMA3-AS1</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>RPSAP58</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>SLC35C1</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>SP5</i>	8 pacientes	2 pacientes
<i>TUBAL3</i>	8 pacientes	2 pacientes
<i>ZNF202</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>ZNF57</i>	8 pacientes	3 pacientes

\*Todos los genes alterados se asocian de manera estadísticamente significativa al grupo de no respuesta ( $p < 0.05$ )

Cuando se realiza el análisis de los genes que se han encontrado en cada grupo podemos observar que en el caso del grupo de no respuesta (3751 genes), los genes implicados

pertencen en su mayoría a vías de señalización de PI3K-Akt-mTOR como en el caso del gen *MAP2K2* que se encuentra con una frecuencia del 50% en este grupo. A mayores, podemos observar mutaciones en genes implicados en las vías de Notch (*CDKN1A*, *DTX1* o *PIK3R1*), autofagia (*ATG9B*) y de la apoptosis (*NFKB1A*, *IGF2* o *RIPK1*). Con respecto al grupo de respuesta, las mutaciones INDEL detectadas, pertenecen a genes implicados en su mayoría a las vías asociadas con la respuesta al daño celular mediada por *ATM* (*WNT5A*, *BCL2L11*, *CCND1*, *MDM2*, *SMAD3*, *SOD2*), mTOR (*WNT5A*, *NPRL2*) y de la síntesis de proteínas ribosomales citosólicas (*RPL29*, *RPS11*, *RPS16*, *RPS6*, *RPS8*, *RPSA*).

Ambos grupos de respuesta comparten una elevada tasa de mutaciones en genes implicados en las vías de mTOR (Tabla 12), sin embargo, se puede observar una mayor frecuencia de estas en el grupo de no respuesta (asociación con  $p > 0.05$ ).

**Tabla 12. – Genes asociados a la vía de PI3K-Akt-mTOR por grupos de respuesta.**

<i>Gen alterado</i>	<i>Frecuencia en el grupo de no respuesta</i>	<i>Frecuencia en el grupo de respuesta</i>
<i>AKT2</i>	6 pacientes	3 pacientes
<i>CAB39L</i>	5 pacientes	3 pacientes
<i>EIF4E</i>	5 pacientes	2 pacientes
<i>MLST8</i>	2 pacientes	1 paciente
<i>PIK3R1</i>	1 paciente	0 pacientes
<i>STRADA</i>	1 paciente	2 pacientes
<i>ULK1</i>	2 pacientes	0 pacientes

Lo mismo sucede en el caso de los genes implicados en procesos de autofagia, donde su presencia es más importante en el grupo de no respuesta, siendo el principal gen implicado *ATG9B*.

También se ha estudiado la asociación de mutaciones INDEL en genes asociados a las vías que controlan los puntos de control del ciclo celular (*checkpoint genes*). Estas vías son sobre todo dependientes de la respuesta al daño celular en el ADN. Al igual que en

los estudios de las vías anteriores, la frecuencia de estas mutaciones es más frecuentes en el grupo de no respuesta ( $p > 0.05$ ) (Tabla 13).

**Tabla 13. – Genes asociados a vías de control del ciclo celular.**

<i>Gen alterado</i>	<i>Frecuencia en el grupo de no respuesta</i>	<i>Frecuencia en el grupo de respuesta</i>
<i>ATM</i>	7 pacientes	6 pacientes
<i>CDKN2A</i>	7 pacientes	7 pacientes
<i>TGFB1</i>	7 pacientes	5 pacientes
<i>ABL1</i>	6 pacientes	2 pacientes
<i>DHFR</i>	6 pacientes	3 pacientes
<i>TP53</i>	6 pacientes	6 pacientes
<i>CDKN1B</i>	3 pacientes	2 pacientes
<i>CDKN1A</i>	2 pacientes	0 pacientes
<i>SKP2</i>	1 paciente	0 pacientes
<i>TFDP1</i>	1 paciente	0 pacientes
<i>CCND1</i>	0 pacientes	1 paciente
<i>SMAD3</i>	0 pacientes	1 paciente

Además, podemos ver una mayor frecuencia de genes mutados que se asocian con la inmunidad antitumoral en el grupo de no respuesta frente al de respuesta. Estos genes principalmente fueron *ADAM8*, *CD53*, *ITGA4*, *LSP1*, *PTPRE*, *TGFβ1*.

#### **- Estudio de las mutaciones genómicas por polimorfismos de un solo nucleótido**

Al igual que se ha realizado el estudio de los INDEL, se ha realizado el estudio de las mutaciones por SNV que han conllevado alteraciones en la síntesis proteica por lo que han tenido una implicación funcional.

- En el grupo de pacientes que presentó respuesta a nivolumab el número de variantes SNV fue de 25355, con una mediana de 1846 variantes por caso. Estas

variantes fueron únicas en 11491. La cantidad de genes mutados detectados en este grupo fue de 4013.

- En el grupo de pacientes con ausencia de respuesta a nivolumab el número de variantes SNV encontradas fue de 28222, con una mediana por caso de 1791.5. De todas las variantes halladas, un total de 13412 fueron únicas. La cantidad de genes afectados mutados ha sido de 3951.

El número de genes mutados con SNV comunes a los dos grupos ha sido de 3139 (65.1%) (Figura 48).

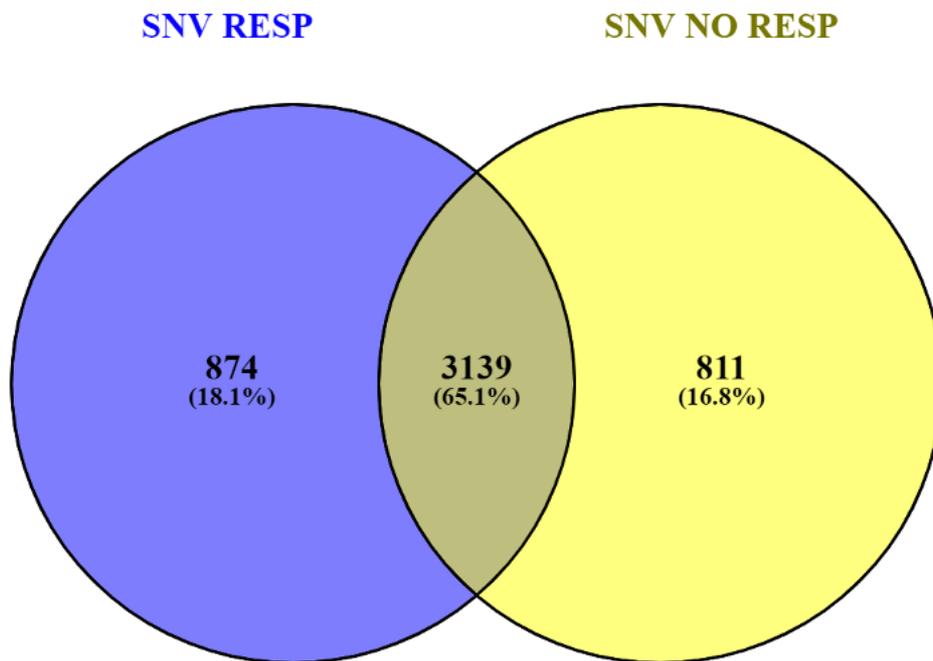


Figura 48. Número de genes con mutaciones tipo SNV por grupos de respuesta (azul grupo de buena respuesta y amarillo grupo de no respuesta) en el ctDNA.

Del total de 3139 genes alterados compartidos entre los dos grupos de respuesta, un total de 28 genes son compartidos entre los dos grupos y se presentan asociados al grupo de mala respuesta de manera estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), de los cuales 14 genes presentan SNVs con una frecuencia del 100% en el grupo de mala respuesta (*ARTN*, *ATG9B*, *CIQTNF9B-AS1*, *CCDC167*, *DEFA4*, *IL34*, *KIAA0087*, *LINC00905*, *LOC155060*, *SYNE2*, *CCDC42*, *CDH15*, *CIDEA*, *POLR2H*, *SP5*, *TCEA3*, *C2orf76*, *C7orf73*, *CCIN*, *LOC101926966*, *LYRM4-AS1*, *MDS2*, *MIR154*, *OPRM1*, *OR1F2P*, *SACS*, *SNORD114-9*, *WSB2*). Estos 14 genes se encuentran en la Tabla 14.

**Tabla 14. – Genes asociados al grupo de no respuesta frente al de respuesta.**

<i>Gen alterado</i>	<i>Frecuencia en el grupo de no respuesta</i>	<i>Frecuencia en el grupo de respuesta</i>
<i>ARTN</i>	8 pacientes	4 pacientes
<i>ATG9B</i>	8 pacientes	4 pacientes
<i>C1QTNF9B-ASI</i>	8 pacientes	4 pacientes
<i>CCDC167</i>	8 pacientes	4 pacientes
<i>DEFA4</i>	8 pacientes	4 pacientes
<i>IL34</i>	8 pacientes	4 pacientes
<i>KIAA0087</i>	8 pacientes	4 pacientes
<i>LINC00905</i>	8 pacientes	4 pacientes
<i>LOC155060</i>	8 pacientes	4 pacientes
<i>SYNE2</i>	8 pacientes	4 pacientes
<i>CCDC42</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>CDH15</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>CIDEA</i>	8 pacientes	3 pacientes
<i>POLR2H</i>	8 pacientes	3 pacientes

\*Todos los genes alterados se asocian de manera estadísticamente significativa al grupo de no respuesta ( $p < 0.05$ )

De los 874 genes con SNV específicos del grupo de respuesta a nivolumab, las principales vías a las que se asocian son a las de reparación del daño del ADN (*ALOX5*), señalización mediante RAS (*ARHGAP20*), vía de mTOR (*KATNB1*, *LOC101929415*), vía de MAPK (*LOC729970*) y las vías de síntesis de las proteínas ribosomales citoplasmáticas (*ZNF542P*). De los 811 genes alterados en el grupo sin respuesta las principales vías alteradas han sido las del control del ciclo celular (*CDKN1A*, *CREB3*, *POLE2*), vía de PI3K-Akt-mTOR (*LRP6*, *RRAGC*, *ULK1*, *SKP2*, *COL9AE*, *LAMC3*) y la vía de Notch (*CDKN1A*, *DTX1*, *SPEN*, *CIR1*, *FHL1*).

Cuando se han analizado las principales vías relacionadas con la carcinogénesis se han hallado las siguientes asociaciones:

- Vías de control sobre el receptor de PD-1: el principal gen encontrado en las muestras que se ha mostrado diferencial entre los grupos de respuesta fue HLA-DRB1. La frecuencia fue mayor en el grupo de respuesta frente al de no respuesta (42.9% frente a 12.5%). Esta relación no fue estadísticamente significativa.
- Vías de control del ciclo celular: se han hallado diferencias entre los dos grupos en dos genes que fueron *ABLI* y *CCND1*. El gen *ABLI* presentó una frecuencia mayor en el grupo de no respondedores (frecuencia del 75%) y el gen *CCND1* en el grupo respondedor (frecuencia del 42.9%). Ambas asociaciones no tuvieron significancia estadística.
- Vía de la autofagia: se han hallado tres genes que se han asociado de una manera mayor con el grupo de no respuesta frente al de respuesta. Estos genes fueron *ATG9B*, *ATG4D* y *ATG2B* (las frecuencias en el grupo no respuesta fueron 100%, 88% y 75% respectivamente). En el caso de *ATG9B* la asociación fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).
- Vía de reparación del daño al ADN (dependiente de *ATM*): el gen *CAT* fue el principal elemento diferencial entre ambos grupos, siendo más frecuente en el grupo de no respuesta (frecuencia 62.5% en grupo de no respuesta frente a 42.9% en grupo de respuesta). La asociación no fue estadísticamente significativa.
- Vía de PI3K-AKT-mTOR: el principal gen diferencial entre los dos grupos fue *EIF4E* que presentó una frecuencia del 62.5% en el grupo de no respuesta frente al 28.6% en el grupo de respuesta (no estadísticamente significativo).

A mayores del análisis diferencial de la presencia de genes mutados por subgrupos, se ha realizado un análisis funcional (*WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit*) de las alteraciones SNV entre los dos grupos de respuesta. En el análisis integrativo no se han encontrado diferencias entre los dos grupos. Sin embargo, el grupo de menor respuesta tiene una mayor presencia de alteraciones funcionales en las vías relacionadas con la resistencia a los inhibidores de *EGFR*, la vía de señalización de HIF-1 y del metabolismo de los glucocorticoides a través fundamentalmente de la mayor presencia de los genes *EIF4E*, *NLRX1* y *TUBAL3* en el grupo de no respuesta.

### - Análisis global del exoma del ctDNA

Al realizar el análisis combinado de las mutaciones genómicas globales (INDEL más SNV), se ha comparado en primer lugar la carga de mutaciones entre los dos grupos de respuesta. En el caso del grupo de respuesta se ha objetivado que la mediana de mutaciones INDEL fue de 1351 y para las SNV de 1846. Por otro lado, en el grupo de no respuesta se han hallado un total de 1722 mutaciones INDEL y de 1791.5 mutaciones por caso SNV (Tabla 15). Al realizar el análisis estadístico, no se ha encontrado que existan diferencias entre los dos grupos de manera estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ , test exacto de Fisher).

**Tabla 15. – Análisis cuantitativo global de las mutaciones halladas en los grupos de respuesta en el ctDNA.**

<i>Grupo de respuesta</i>	<i>INDEL</i>	<i>SNV</i>
<i>Buena respuesta</i>	1351 mutaciones/caso	1846 mutaciones/caso
<i>Mala respuesta</i>	1722 mutaciones/caso	1791.5 mutaciones/caso

\* $p > 0.05$  (test exacto de Fisher) para la comparación entre los grupos de respuesta.

Cuando se analizan los grupos por separado con sus alteraciones genómicas específicas, se han encontrado que un total de 712 genes se presentan únicamente en el grupo de no respuesta mediante mutaciones INDEL y SNV y que son específicos para este grupo. Asimismo, un total de 464 genes son exclusivos del grupo de respuesta y han tenido mutaciones tanto INDEL como SNV (Figura 49). Las principales rutas implicadas en ambos grupos de genes son las descritas previamente (vías de control del ciclo celular, vía de PI3K-Akt-mTOR, vías de reparación del ADN y vías de la autofagia y apoptosis).

En el análisis conjunto de los datos, se han observado como dos genes (dentro de los 712 específicos del grupo de no respuesta) se han asociado de manera estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con el grupo de no respuesta. Su presencia tanto en forma de INDEL como de SNV esta asociada con el grupo de resistencia a la inmunoterapia. Estos dos genes que fueron *COL9A3* y *LAMC3* no mostraron ningún tipo de alteración en los pacientes con buena respuesta a nivolumab. Por el contrario, se observó la presencia de mutaciones funcionales de estos dos genes en 7 de los 8 pacientes con mala respuesta.

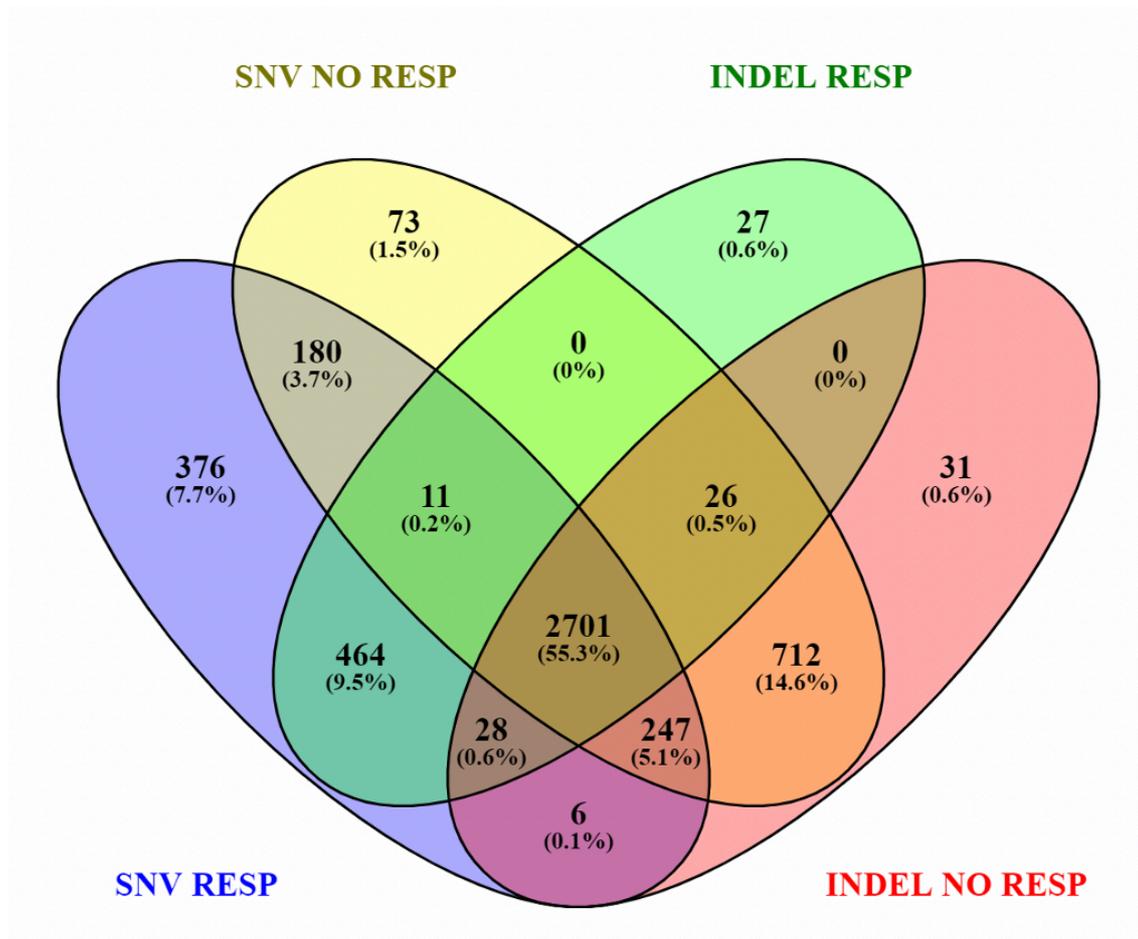


Figura 49. Análisis combinado de las alteraciones genómicas por INDEL y SNV en los dos grupos de estudio en el ctDNA.

### **Estudio comparativo entre el exoma tisular y del ctDNA**

La primera comparativa entre ambos exomas se basa en el análisis cuantitativo del número de mutaciones encontradas en el tumor primario y en el ctDNA por grupo de respuesta. El número de mutaciones es mayor en el grupo de respuesta en el caso del tumor primario, siendo al contrario en el ctDNA, en donde el número global de mutaciones fue mayor en el grupo de no respuesta (Tabla 16). De igual manera se puede observar en la mediana de mutaciones/caso por grupos de respuesta, siendo en el tumor primario el número de mutaciones/caso mayor en el grupo de respuesta y en el ctDNA mayor en el grupo de no respuesta (Tabla 17). Para ambos casos no se encontró asociación estadísticamente significativa en la comparativa de los grupos de respuesta ( $p > 0.05$ , test exacto de Fisher).

**Tabla 16 y 17. – La primera tabla muestra el análisis global cuantitativo del número de mutaciones encontradas en los grupos de respuesta (tumor primario y ctDNA). La segunda tabla muestra el análisis de las mutaciones/caso.**

<i>Exoma</i>	<i>Grupo de respuesta</i>	<i>Número de mutaciones</i>
<i>Tumor primario</i>	<i>Buena respuesta</i>	50100 mutaciones
	<i>Mala respuesta</i>	29619 mutaciones
<i>ctDNA</i>	<i>Buena respuesta</i>	37711 mutaciones
	<i>Mala respuesta</i>	47710 mutaciones

\*p > 0.05 (test exacto de Fisher) para la comparación entre los grupos de respuesta.

<i>Exoma</i>	<i>Grupo de respuesta</i>	<i>INDEL</i>	<i>SNV</i>
<i>Tumor primario</i>	<i>Buena respuesta</i>	107 mutaciones/caso	3197.5 mutaciones/caso
	<i>Mala respuesta</i>	60 mutaciones/caso	1292 mutaciones/caso
<i>ctDNA</i>	<i>Buena respuesta</i>	1351 mutaciones/caso	1846 mutaciones/caso
	<i>Mala respuesta</i>	1722 mutaciones/caso	1791.5 mutaciones/caso

\*p > 0.05 (test exacto de Fisher) para la comparación entre los grupos de respuesta.

Tras el global de mutaciones encontradas, se ha realizado una comparativa de las rutas funcionales alteradas y encontradas en los grupos de respuesta entre el tumor primario y el ctDNA. Se ha objetivado una presencia global de las mutaciones de PI3K-Akt-mTOR en ambas muestras e independiente del grupo de respuesta. Ningún gen de los implicados en las alteraciones en esta vía se ha encontrado como diferencial entre los grupos de respuesta, siendo su frecuencia similar entre los grupos tanto a nivel tisular como del ctDNA (p > 0.05).

El resto de las principales alteraciones funcionales encontradas difieren entre la muestra tisular y el ctDNA, sin embargo, no se ha encontrado ninguna ruta funcional que sea

diferencial entre alguno de los grupos de respuesta. Las vías alteradas en las diferentes muestras se resumen en la Tabla 18.

Al realizar el análisis global del exoma del ctDNA se han encontrado dos genes (*LAMC3* y *COL9A3*) los cuales presentaban una frecuencia del 87.5% en el grupo de no respuesta y del 0% en el grupo de respuesta ( $p < 0.05$ ). Se ha estudiado si existían las mismas mutaciones del ctDNA en el tumor primario, siendo la frecuencia de las mutaciones en *LAMC3* y *COL9A3* en la muestra tisular del 0% para ambos genes. Se hallaron diversas mutaciones en estos genes en el tumor primario, siendo la mayoría no funcionales, y las funcionales eran diferentes a las encontradas en el ctDNA. Por tanto, no se observó concordancia entre el ADN tisular y el ctDNA en estos genes ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 18. – Principales rutas funcionales alteradas implicadas en la carcinogénesis en tumor primario y ctDNA por grupos de respuesta.**

<i>Muestra</i>	<i>Grupo de respuesta</i>	<i>Genes alterados</i>	<i>Rutas funcionales alteradas</i>	
<i>Tumor primario</i>	<i>Buena respuesta</i>	<i>NRP1</i>	Angiogénesis	
		<i>PIK3R3, ANKAR, COL27A1</i>	PI3K-Akt-mTOR	
		<i>NUP98, CASP10</i>	Ciclo celular y apoptosis	
		<i>TMEM161A, C10orf90</i>	Reparación del daño al ADN	
	<i>Mala respuesta</i>	<i>MUC16</i>	Señalización celular y desarrollo de metástasis	
		<i>PIK3CA</i>	PI3K-Akt-mTOR	
		<i>KMT2C</i>	Remodelación de la cromatina	
		<i>SNHG14</i>	Transcripción ARN no codificante	
		<i>CENPF</i>	Ciclo celular	
		<i>HUWE1</i>	Regulación del proteosoma	
		<i>SRRM1</i>	<i>Splicing</i>	
		<i>MUC16</i>	Señalización celular y desarrollo de metástasis	
		<i>Buena respuesta</i>	<i>SMAD3, BCL2L11, CCND1, MDM2, ALOX5</i>	Reparación del daño al ADN
			<i>WNT5A, NPRL2</i>	PI3K-Akt-mTOR
<i>RLP29, RPS11, RPS16, RPSA</i>	Síntesis proteínas ribosomales			
<i>ARHGAP20</i>	Vía de señalización de RAS			
<i>ATG9B</i>	Autofagia y mitofagia			
<i>Mala respuesta</i>	<i>TUBAL3, POLR2H, NFKBIA</i>	Apoptosis		
	<i>MAP2K2, LRP6, RRAGC</i>	PI3K-Akt-mTOR		
	<i>CDKN1A, DTX1 o PIK3R1</i>	Vía de Notch		
	<i>CDKN1A, CREB3, POLE2</i>	Ciclo celular		

## **DISCVSIÓN**



## ***DISCVSIÓN***

### ***Diagnóstico molecular en oncología (IHQ frente NGS)***

Actualmente, las técnicas de diagnóstico molecular han sufrido una revolución en los últimos diez años gracias a la introducción de las técnicas de secuenciación masiva del ADN (NGS). La IHQ introducida en los años 40 para el diagnóstico tumoral fue implementada por Albert Coons<sup>238</sup>. Desde ese momento, se han ido mejorando las técnicas de diagnóstico hasta que hoy en día gran parte del diagnóstico molecular en Oncología Médica se basa en las diferentes técnicas de IHQ. Desde el diagnóstico de tumores de origen desconocido hasta la valoración de la inestabilidad de microsatélites a través de la expresión de los genes del sistema MMR, la IHQ ha permitido afinar los tratamientos en Oncología para un aumento de las respuesta y supervivencia de los pacientes oncológicos<sup>217</sup>.

El bajo coste de las técnicas de IHQ permite que sea un procedimiento asequible en cualquier centro hospitalario y país, pudiéndose aplicar tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo<sup>239</sup>. El desarrollo de nuevos marcadores subrogados mediante IHQ permite que una gran cantidad de centros posean técnicas de diagnóstico molecular con una sensibilidad y especificidad elevada a un bajo coste. Esto es de especial importancia en los tratamientos de inmunoterapia, en donde como se indica en el apartado introductorio, el descubrimiento de marcadores predictores de respuesta puede ser clave en el futuro de la aplicación de estos tratamientos<sup>240</sup>.

Junto con lo anterior, el análisis de las mutaciones somáticas o germinales de los tumores o de los pacientes es el nuevo paradigma de diagnóstico. El coste de estas técnicas se ha disminuido hasta que en el presente se puede realizar una secuenciación del exoma de un tumor o del ADN de un paciente por un precio entre 300 y 500 euros<sup>241</sup>. Ello permite que en la mayoría de los centros de investigación u hospitales de los países occidentales se puedan aplicar estas técnicas. Aunque se encuentran en su mayor parte en vías de investigación, sus aplicaciones clínicas son cada vez mayores con el estudio de por ejemplo las mutaciones somáticas del tumor para la realización de diagnóstico dirigidos. Múltiples genes se asocian con la respuesta o resistencia a los fármacos oncológicos, sin embargo, en inmunoterapia estas asociaciones son desconocidas en prácticamente su mayoría. La detección de factores de resistencia y respuesta a la inmunoterapia en

tumores sólidos permitirá en el futuro un tratamiento más preciso de multitud de tumores como el cáncer de pulmón<sup>242</sup>.

En este proyecto se ha intentado hacer una comparativa de las dos técnicas de diagnóstico molecular actuales en Oncología, como son la IHQ y la secuenciación genética masiva, en esta última realizada con el análisis del exoma de muestra de tumor primario y de ctDNA<sup>243</sup>. Ambas técnicas tienen sus ventajas y desventajas y por ello es clave comprenderlas en profundidad. La primera de ellas es el paradigma actual del diagnóstico, sin embargo, la implementación del análisis del exoma y de los paneles genómicos en la práctica clínica habitual es posible que se realice en los próximos 5-10 años. Es por ello, que actualmente estas dos técnicas de diagnóstico deben convivir, una en la clínica como es la IHQ y otra a nivel investigacional como la secuenciación genómica masiva, aunque cada vez con mayores implicaciones clínicas. Esta por definir cuales serán los campos en los que el análisis del exoma llega a la clínica habitual, aunque mediante esta investigación se intentará hacer una aproximación a este punto<sup>244</sup>.

Es muy posible que la IHQ nunca llegue a ser sustituida por otras técnicas a corto plazo, dado su bajo coste, accesibilidad y facilidad de análisis. Por ello, este trabajo es un intento de hacer visible la compatibilidad de ambas técnicas y de como es posible detectar mecanismos de respuesta a los tratamientos de inmunoterapia mediante el uso de lo ya conocido y las técnicas de investigación.

### ***Características generales de la muestra estudiada por IHQ***

La muestra utilizada tanto para el estudio por IHQ como por NGS, ha intentado ante todo mostrar una homogeneidad, siendo todos los pacientes de similares características (100% de los pacientes presentaban tumores de pulmón no microcítico avanzado o irresecable y tratados en segunda línea con un fármaco anti-PD1). Preservar este hecho ha permitido una mayor validez de los resultados dado el escaso número de pacientes que se ha podido estudiar sobretodo por NGS. La obtención de las muestras requería una cantidad importante de tejido para analizar la expresión proteica de p53 y los genes reparadores, y ello implicaba que solo se pudieron utilizar muestras que fueran obtenidas mediante cirugía, biopsia con aguja gruesa o con gran cantidad de material obtenido por punción con aguja fina. De las 90 muestras iniciales que se validaron para el estudio, únicamente

en 73 se pudo realizar la IHQ. Además, el 83.3% recibieron el tratamiento tras una progresión a platino por lo que la homogeneidad de la muestra era todavía mayor. Debido a esta razón, el análisis de los datos de las características generales de la muestra se realizó sobre los 90 pacientes en vez de sobre los 73 (ver punto 1 de resultados), dado que la representatividad de la muestra es mayor sobre el grupo completo de pacientes con cáncer de pulmón tratados con nivolumab en el Hospital de Salamanca.

La práctica mitad de los pacientes eran de estirpe adenocarcinoma y la otra mitad de estirpe epidermoide, siendo las características entre ambos grupos similares. Es por lo que no existían diferencias entre las características epidemiológicas y tumorales de los pacientes de la muestra estudiada por IHQ.

Como corresponde a un estudio en cáncer de pulmón, la mayoría de los pacientes eran varones, frente a una minoría de mujeres que a su vez pertenecían mayoritariamente al subgrupo de adenocarcinoma<sup>245</sup>. La expresión de PD-L1 y de p53 también estuvo repartida a partes iguales entre toda la muestra, siendo la división más importante para PD-L1 la que diferenciaba los pacientes entre positivos o negativos de PD-L1. Esta división se realizó en función de los ensayos clínicos realizados en CPNM en segunda línea, que en su mayoría realizan esta división, a diferencia de los ensayos en primera línea que utilizan otros puntos de corte como 10% o 50%<sup>193,246</sup>.

La muestra es acorde con la evidencia científica actual, la cual muestra una mayor respuesta a inmunoterapia en pacientes con PD-L1 más elevado<sup>247</sup>. Ello se ve en el hecho de que la SLP fue mayor en pacientes con PD-L1 positivo que en PD-L1 negativo, y todo ello de una manera estadísticamente significativa. En la muestra de IHQ también se puede observar como en la SLP los pacientes con histología escamosa tienen una supervivencia mayor que aquellos con histología de adenocarcinoma. Aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos, esto se explica en el hecho de ser un tamaño muestral menor al de los ensayos clínicos en este campo. Sin embargo, estos valores de 6 meses de SLP en tumores escamosos frente a 4 meses en adenocarcinomas es acorde con la literatura actual, en donde la inmunoterapia muestra una mayor respuesta en tumores con una alta carga mutacional como son los escamosos (que se asocian más frecuentemente al hábito tabáquico)<sup>248</sup>. Tampoco se observaron diferencias entre los grupos subdivididos por la línea en que se pautó la inmunoterapia, lo cual indica que la homogeneidad de la muestra se mantuvo independiente de la línea en que se trató al paciente.

### ***Características generales de la muestra estudiada por NGS***

Para conservar la homogeneidad de la muestra, el estudio se ha realizado sobre los mismos pacientes sobre los que se ha realizado la IHQ de p53 y los genes MMR. En total 15 pacientes han sido incluidos para el estudio por NGS. Estos pacientes tenían que cumplir dos particularidades que han hecho conllevado un tamaño muestra pequeño, como son en primer lugar que se pudiera extraer muestra de sangre periférica para estudio de biopsia líquida y en segundo lugar que de estos mismos pacientes se pudiera obtener ADN de su muestra de tumor primario. A mayores, si se realiza una comparativa con la literatura actual, los estudios llevados a cabo sobre exoma tumoral son de un tamaño muestral más limitado al llevado a cabo por nuestro laboratorio, por tanto, la significancia clínica y estadística que puedan tener los resultados para la comunidad científica parece ser elevado<sup>249,250</sup>.

Las características generales de la muestra pese a ser un subgrupo de 15 pacientes, son similares a las de los estudios publicados en la literatura sobre este tipo de pacientes<sup>251</sup>. La edad de los participantes, la distribución por sexos, el porcentaje de respuestas y las supervivencias observadas son comparables a las de los ensayos pivotaes que dieron la aprobación a los esquemas de tratamiento<sup>113,114</sup>. Para el análisis estadístico, con una finalidad práctica, se subdividió a los pacientes dos grupos en función de la respuesta y supervivencia obtenida (ver material y métodos, punto 1). La distribución entre estos pacientes es completamente balanceada, observándose en 7 pacientes buena respuesta y en 8 pacientes ausencia de respuesta.

A mayores, el resto de las toxicidades observadas, así como su porcentaje es similar al descrito tanto en los ensayos clínicos con en los datos de vida real. Por último, en el análisis de supervivencia de la muestra, se observa una SG y una SLP ligeramente superior a la de los ensayos clínicos en este campo, aunque sin mostrar grandes diferencias respecto a los estudios descritos en la literatura posteriores a la comercialización de los fármacos de inmunoterapia para cáncer de pulmón<sup>252</sup>.

### ***Expresión proteica de p53 por IHQ como biomarcador predictivo a inmunoterapia***

El primer hecho a resaltar en el estudio de la expresión proteica de p53 es el hecho de que según la literatura actual únicamente un 5% con expresión *wild type* presenta mutación en *TP53* (Figura 50)<sup>253</sup>. Es por ello por lo que la expresión de p53 como marcador subrogado de mutaciones en *TP53* es fiable a un 95%, siendo la mayoría de las mutaciones en este gen de tipo *missense*<sup>254</sup>. Para que existiera una mayor consistencia en el estudio se ha elegido una cohorte homogénea de pacientes, los cuales todos ellos han sido tratados con nivolumab en segunda línea tras progresión a platino en CPNM. La expresión de p53 (punto de corte del 5%, véase punto 4 de la sección material y métodos) fue  $\geq 5\%$  en 41 pacientes y  $< 5\%$  en 32 pacientes. Lo anterior es acorde con la literatura donde se calcula que alrededor del 50% de los CPNM presentan mutaciones en *TP53*<sup>204</sup>.

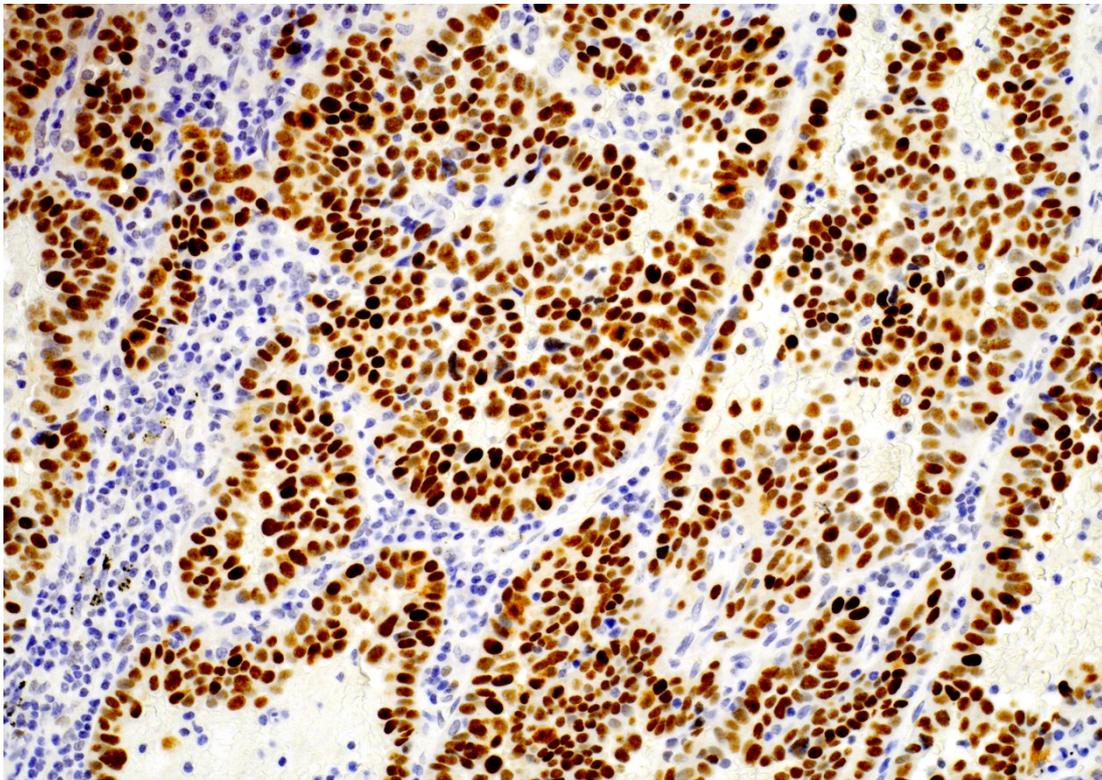


Figura 50. Ejemplo de paciente de nuestra muestra con una expresión por IHQ de p53 del 100%.

El primer punto que se debe considerar es el análisis de la SG de la muestra. La SG de los pacientes con expresión elevada de p53 fue de 20 meses frente a 12 meses en una expresión baja. Aunque la p en este punto fue de 0.070 es clave reconocer la importante del tamaño muestral en este caso. La Figura 31 muestra como existe una clara diferencia de SG en los pacientes en función de la expresión de p53. Este primer análisis sin factores

de estratificación muestra como existe ya una clara diferencia de supervivencia entre pacientes en función de la expresión de p53, que si se aumentara el tamaño muestral posiblemente los resultados fueron estadísticamente significativos. Y no solo si se aumentara el tamaño muestra, sino si se aumentara la cantidad de pacientes con adenocarcinoma por razones que se expresarán más adelante. En la SLP se objetivó unos valores de 4 meses en expresión baja frente a 7 meses en expresión elevada. Estos resultados al igual que los anteriores fueron no estadísticamente significativos ( $p = .064$ ). Los resultados en SLP tienen las mismas peculiaridades que en el caso de la SG, siendo el tamaño muestral la principal limitación que tiene el estudio. Estas diferencias en supervivencia observadas son acordes como otros estudios realizados como el de Assoun et al.<sup>206</sup> en CPNM o el de Michel et al.<sup>255</sup> en otros tumores sólidos como el cáncer colorrectal. La hipótesis teórica que explica estas diferencias se halla en el hecho de que las mutaciones de *TP53* pueden producir una liberación de antígenos por la acumulación de mutaciones, lo cual facilita el reconocimiento inmune, así como ayuda a la acción de la inmunoterapia mediante un aumento de la carga mutacional del tumor.

Estas diferencias de supervivencia se han observado en los tumores del subtipo adenocarcinoma, no habiendo diferencias en escamosos. También se han observado estas diferencias en mujeres, posiblemente siendo el sexo femenino un factor de confusión debido al hecho de que los adenocarcinomas son mucho más frecuentes en mujeres que los tumores escamosos. Es probable que el hecho de que los tumores escamosos tengan una carga mutacional más elevada por el hábito tabáquico influya en el peso que pueda tener las mutaciones de *TP53* en la respuesta a la inmunoterapia, y por ello en tumores adenocarcinoma es clave la existencia de mutaciones de *TP53* para una mejor respuesta a inmunoterapia. Estos resultados son similares a los del estudio de Sun et al.<sup>256</sup> el cual reporta la influencia de las mutaciones de *TP53* en la respuesta a la inmunoterapia en pacientes con CPNM y subtipo adenocarcinoma. Por ello, podría ser importante en el presente valorar las mutaciones de *TP53* mediante secuenciación genética o la expresión de p53 por IHQ en pacientes con subtipo adenocarcinoma antes del inicio de un tratamiento de inmunoterapia. Esto sería clave para los pacientes con CPNM metastásico y expresión de PD-L1  $\geq 50\%$ . En los pacientes con tumores con estas características el tratamiento es de inmunoterapia con pembrolizumab en monoterapia, sin embargo, en aquellos casos sin expresión proteica de p53 o *TP53* no mutado su respuesta a inmunoterapia podría ser más deficiente por lo que en estos casos podría ser conveniente

la asociación de quimioterapia (la cual a mayores tiene mayor respuesta en tumores con *TP53* no mutado).

En el estudio no solo se ha analizado la supervivencia sino también la respuesta. En la Figura 35 se observa como las respuestas completas son únicas de pacientes con expresión proteica  $\geq 5\%$ . Sin embargo, el porcentaje de progresiones es mayor en expresión  $< 5\%$  (61% frente a 46.9%). Todo ello nos da reflejo de que no solo la supervivencia refleja las diferencias en la expresión proteica de p53, sino también en las respuestas obtenidas por criterios RECIST. Aunque en el estudio no ha habido una significancia estadística, el porcentaje de progresiones con una diferencia de 14.1% da muestra de como la expresión proteica influye de manera clara en las respuestas obtenidas con la inmunoterapia.

Otro punto importante y difícil de definir es la influencia que pueda tener la expresión de PD-L1 de manera conjunta con las mutaciones en *TP53* en CPNM para la respuesta a inmunoterapia. En el análisis de resultados se puede ver como los pacientes con baja expresión de PD-L1 son los que se benefician de valorar p53. Las diferencias por el contrario no se observan en pacientes con PD-L1 positivo. Estas diferencias, se pueden deber a que la influencia de las mutaciones es menor en pacientes con elevada expresión del sistema inmune. En estos pacientes con PD-L1 elevado, el hecho de tener su sistema inmune ya activo hace que la influencia de las mutaciones de *TP53* sobre la inmunoterapia sean menores, y por tanto, su efecto es más notable en PD-L1 negativo. También es importante tener en cuenta la influencia del microambiente en todo este análisis. Los cambios producidos en el microambiente por las mutaciones de *TP53* tienen una mayor influencia en tumores con PD-L1 negativo y por tanto sería importante tener esto en cuenta en pacientes con CPNM y expresión de PD-L1 negativa<sup>257</sup>.

Para finalizar, se ha realizado una curva ROC para analizar cual es el punto de corte de p53 que mejor discrimina entre *TP53* mutado y no mutado. En la literatura es claro el punto en 5%, sin embargo, algún estudio también valora puntos de corte como 1 o 10%<sup>258,259</sup>. Es por ello por lo que también se ha querido valorar el punto de corte en la muestra. Tras la realización de la curva ROC con la comparativa entre los puntos de corte de manera cuantitativa frente a la respuesta obtenida dividida de manera binaria en pacientes con buena y mala respuesta a inmunoterapia se observó un mejor punto de corte del 5%. En este punto de corte se observa la especificidad y sensibilidad más homogénea

por lo que se confirma lo dicho en otros estudios, en donde se utiliza 5% como punto de corte que separa las muestras con *TP53* mutado frente no mutado.

### ***Expresión del sistema MMR como biomarcador predictivo a inmunoterapia***

La expresión del sistema de reparación es un punto poco estudiado hasta el momento actual y por tanto no se conoce de manera clara sus implicaciones en el tratamiento de los pacientes y la prevalencia de estas alteraciones. Diferentes estudios calculan que la prevalencia de mutaciones en los genes del sistema MMR en cáncer de pulmón es del 4-5%<sup>214</sup>. Sin embargo, se calcula que la reducción en la expresión de estos genes podría ser incluso mayor, de hasta el 50% en diferentes series (Xinarianos G et al. y Hsu et al.)<sup>260,261</sup>. En nuestra serie la pérdida de expresión de los genes reparadores fue del 8.2%, superior al mostrado en otros estudios. A mayores, los estudios hasta la fecha muestran que el gen más alterado en estos casos es *MSH2*, por el contrario de nuestro estudio que no mostró que existiera alteraciones en ninguno de los pacientes en este gen, siendo el más frecuente en *PMS2*.

Las supervivencias evaluadas en el proyecto han sido claramente diferentes en los casos de la SG y la SLP. En el caso de la SG no se han hallado diferencias entre los dos grupos evaluados. Por el contrario, la SLP ha sido el doble en pacientes con pérdida de expresión de los genes reparadores (8 meses) frente a los que tenían expresión conservado (4 meses). Pese a que los resultados no son estadísticamente significativos, se observa una tendencia clara a una mayor SLP en pacientes con pérdida de expresión. Esto es acorde a los diferentes estudios realizados en este ámbito en otros tumores sólidos. El estudio KEYNOTE-177<sup>177</sup>, realizado en pacientes con cáncer de colon metastásico e inestabilidad de microsatélites, muestra una SLP de 16.5 meses en pacientes tratados con inmunoterapia frente a 8.2 meses en los tratados con quimioterapia y esquemas basados en capecitabina (Figura 51). Este estudio ha marcado el inicio de los tratamientos de inmunoterapia en tumores sólidos con alteraciones del sistema MMR y es posible que en pacientes con CPNM también se demuestre en el futuro este beneficio. Es por ello por lo que pese a la principal limitación del estudio que es la baja prevalencia de mutaciones en el sistema MMR en CPNM los resultados ya muestran una clara tendencia a una mejor respuesta a la inmunoterapia en estos pacientes. Las implicaciones de los genes del sistema MMR en CPNM se podrían valorar en pacientes con expresión de PD-L1 <50%

en los cuales el tratamiento actual está basado en la combinación de quimioterapia basada en platinos más inmunoterapia. En estos pacientes, se podría valorar en un futuro un tratamiento de inmunoterapia en monoterapia en aquellos casos en los que el tumor presente alteraciones del sistema MMR, evitando una toxicidad asociada a la quimioterapia innecesaria.

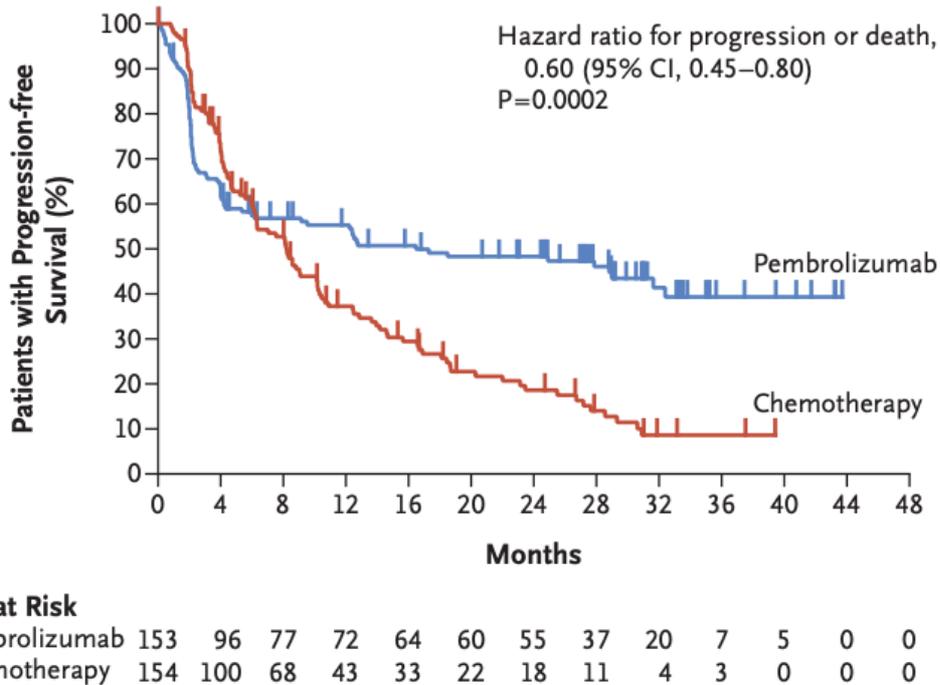


Figura 51. Resultados en términos de SLP del estudio KEYNOTE-77. André T et al., 2020<sup>177</sup>.

Debido a la limitación del tamaño muestral, se ha evaluado la asociación entre la pérdida de expresión y la mejor respuesta con inmunoterapia. Cuando se ha evaluado la asociación entre las dos variables cualitativas se ha observado como existe una relación estadísticamente significativa mediante la prueba estadística de Chi-cuadrado. Esta relación muestra como aquellos casos con pérdida de expresión de los genes reparadores presentan una mayor respuesta, a expensas fundamentalmente de los pacientes con respuestas parciales. Estas observaciones a diferencia de las que sucedieron en la expresión de p53 no se vieron influenciadas por otros factores como la edad, el sexo o el subtipo histológico. Es por ello, que aun con la baja prevalencia que presenta la pérdida de expresión de genes reparadores en CPNM, se debería valorar la realización de estos genes de rutina en pacientes con CPNM metastásico o avanzado mediante un estudio de coste-eficiencia. Su realización mediante IHQ presenta un bajo coste y es posible una

gran cantidad de pacientes se beneficien gracias a una prevalencia de alrededor del 5%, que incluso según algunas series podría ser incluso mayor.

También se analizó si la presencia de una mayor toxicidad estaba en relación con una pérdida de expresión de los genes reparadores. Se observó que una mayor toxicidad (dividida en dos subgrupos en función de presentar toxicidad grado  $\geq 3$  o grave) se relaciona con una pérdida de expresión de los genes reparadores. Sin embargo, pese a esta asociación, se comprobó si existía un factor de confusión como era la respuesta obtenida y se vio como la respuesta era la que se asociaba a la toxicidad y ésta a su vez con la pérdida de expresión de los genes reparadores. Por tanto, esto abre una nueva puerta de estudio como es la asociación de la respuesta a la inmunoterapia con la toxicidad. Múltiples estudios hasta la fecha valoran la más que probable existencia de una asociación causal entre una mayor respuesta y una toxicidad grave  $\geq 2$  o 3<sup>262</sup>. Hasta el momento actual no existe un estudio que claramente defina esta fuerza de asociación, sin embargo, es probable que una mayor actividad del sistema inmune contra el tumor conduzca a una mayor respuesta antitumoral con la consecuente toxicidad inmunorrelacionada secundaria a esta activación inmune a expensas de linfocitos T<sup>263</sup>.

Para finalizar este punto es importante valorar si este tipo de tumores se debería incluir en la esfera del síndrome de Lynch. Posiblemente la clara asociación del tabaco con el CPNM haya hecho que las causas genéticas del cáncer de pulmón hayan pasado a segundo plano. Sin embargo, en el futuro ese 10% de pacientes con CPNM no fumadores se deberían incluir en diferentes estudios moleculares los cuales nos mostraran su origen a mayores de los ya conocidos como *EGFR*, *ALK* o *ROS1*.

### ***Análisis del exoma del ADN del tumor primario***

Con el objetivo de realizar un estudio más exhaustivo y facilitar el análisis informático, se han dividido los resultados en dos partes en función del tipo de mutaciones que presentaban los genes. El primer punto al que prestar atención en el ADN del tumor primario es el número de mutaciones por caso en los grupos de respuesta. Como se puede ver en los resultados, el número de mutaciones/caso y de mutaciones globales es mayor en el grupo de respuesta que en el grupo de no respuesta. Aunque esta asociación no es estadísticamente significativa existe una concordancia con lo descrito en la literatura y en

los ensayos clínicos en este campo, en donde un mayor TMB se asocia con una mayor respuesta a la inmunoterapia.

En los diferentes datos de los ensayos clínicos y estudios en la literatura (si bien en nuestra muestra no se ha analizado el TMB) se habla de una relación ya conocida entre la alta carga mutacional y la respuesta a la inmunoterapia<sup>170,264</sup>. En el ensayo clínico CheckMate 227 se comparó el tratamiento de la combinación de nivolumab e ipilimumab frente a quimioterapia en pacientes con CPNM y elevado TMB<sup>265</sup>. En los resultados se objetivó una mejor SG en los pacientes con alto TMB de la combinación de inmunoterapia frente a quimioterapia (17.1 frente 14.9 meses;  $p = 0.007$ ), así como una mayor duración de la respuesta (al año de seguimiento el 68% de los pacientes con inmunoterapia mantenían respuesta frente al 25% de la quimioterapia) (Figura 52). Otros artículos publicados sobre el mismo campo como los de Forde et al<sup>100</sup>. o Banchereau et al.<sup>266</sup>, muestran datos similares. En la muestra de este proyecto, los resultados deben tomarse con precaución debido a lo limitado del tamaño muestral en la muestra analizada por NGS, sin embargo, parecen mostrar en el caso del tumor primario una concordancia con la literatura.

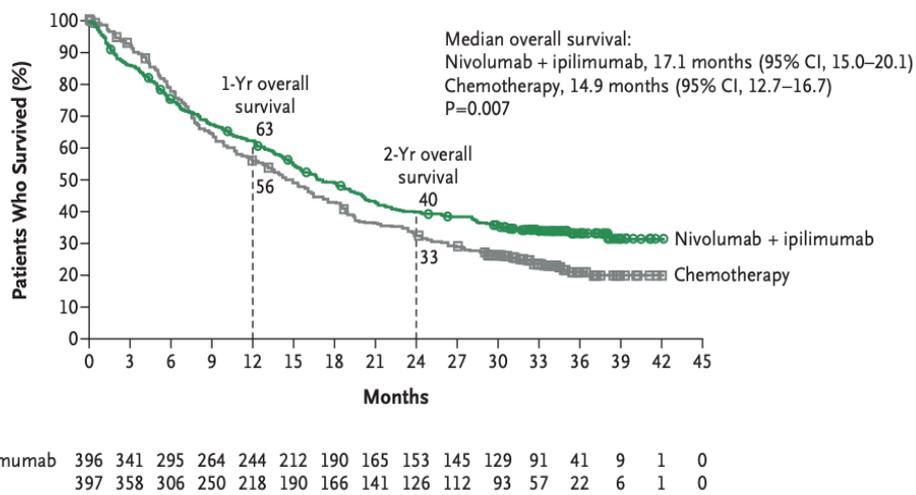


Figura 52. Resultados en términos de SG del estudio CheckMate 227 en pacientes con elevado TMB.  
Hellmann MD et al., 2020<sup>265</sup>.

- Genes mutados por INDEL en el ADN del tumor primario

Dentro de este apartado, se puede observar como la vía de PI3K-Akt-mTOR tiene una implicación primordial en ambos grupos de respuesta, con una mayor frecuencia en los pacientes con buena respuesta. Como se puede ver a lo largo de todos los resultados, la

vía de PI3K-Akt-mTOR tiene una gran implicación en los pacientes con CPNM, y por ello su repercusión puede que sea mayor a lo descrito hasta ahora en la literatura<sup>267</sup>. Dentro de los genes específicos con mutaciones INDEL, la que parece más interesante es la del gen *MUC16*. Además de la proteína que produce *MUC16* que es un marcador tumoral de sobra conocido (CA125)<sup>268,269</sup>, diferentes investigaciones han relacionado las mutaciones del gen *MUC16* con la respuesta a los tratamientos oncológicos y su implicación con el desarrollo de las metástasis<sup>270</sup>. Ningún estudio ha validado si *MUC16* se correlaciona con la respuesta a la inmunoterapia, en cambio, si que los estudios preliminares sugieren que las mutaciones en *MUC16* puedan asociarse con una mejor respuesta a inmunoterapia y a la resistencia a la quimioterapia<sup>271</sup>. El artículo más grande en este campo es el realizado por Zhang et al.<sup>272</sup>, que en una muestra global de tumores sólidos muestra una posible asociación entre la buena respuesta a inmunoterapia y *MUC16*. En nuestra muestra esta asociación no parece observarse y *MUC16* tiene una mayor frecuencia en pacientes con mala respuesta. Esta asociación que no es estadísticamente significativa es posible que exponga la necesidad de más estudios en este gen en su relación con la inmunoterapia.

- Genes mutados por SNV en el ADN del tumor primario

Al observar las rutas funcionales alteradas en este punto, se han extraído unas vías que no se observan en el resto de los resultados y que pueden tener interés terapéutico en CPNM. Estas rutas que no se han mostrado tan presentes en el ctDNA son tales como las que implican la remodelación de la cromatina, la transcripción de ARN no codificante y las alteraciones en el *splicing*. Estos genes encontrados, que, aunque no han tenido significancia estadística para ninguno de los dos grupos, enseñan como la resistencia o la respuesta a la inmunoterapia va mucho mas allá de lo conocido o descrito actualmente.

De todas estas vías la que posiblemente sea más interesante de desarrollar es la de la remodelación de la cromatina debido al desarrollo en ensayos clínicos que tienen los fármacos que regulan la epigenética. El gen *KMT2C* que en la muestra se presenta en el grupo de respuesta, en la literatura también se asocia con mejores resultados con inmunoterapia, aunque como en la mayoría de estos casos sin estudios de validación<sup>273</sup>. El estudio de Liu et al.<sup>274</sup>, muestra que los tumores con *KMT2C* mutado tiene un TMB y PD-L1 mayor, así como más asociación a la deficiencia del sistema MMR. Por tanto, parece que *KMT2C* mutado podría mejorar los resultados de la inmunoterapia. Diferentes

ensayos clínicos evalúan la combinación de los anti-PD(L)-1 con fármacos que regulan la epigenética<sup>275</sup>. El principal ensayo clínico de este campo es el ENCORE 601 (fase 2 que evaluaba pembrolizumab más entinostat en cáncer de colon), en donde una cohorte expandida de pacientes con CPNM fue evaluada<sup>276</sup>. En esta cohorte, aunque la tasa de respuestas objetivas fue del 9%, la SG fue de 11.7 meses. Esta SG es muy prometedora considerando que eran pacientes pretratados con varias líneas y habían recibido tratamiento de inmunoterapia previamente. Por tanto, en nuestro estudio parece que también el gen *KMT2C* puede tener un papel importante en la respuesta a nivolumab (Figura 53).

Las otras rutas nuevas que se han encontrado, aunque no están tan desarrolladas y conocidas en cáncer, serán de gran interés futuro. Los genes que regulan la formación de ARN no codificante como *SNHG14* y que en la muestra están asociados a la buena respuesta a nivolumab, son un campo por descubrir en oncología. Los estudios que evalúan el ARN no codificante en su respuesta a la inmunoterapia son inciertos, pareciendo que es un biomarcador de respuesta al igual que en nuestra muestra<sup>277,278</sup>, sin embargo, estas conclusiones deberán ser validadas en el futuro con más claridad.

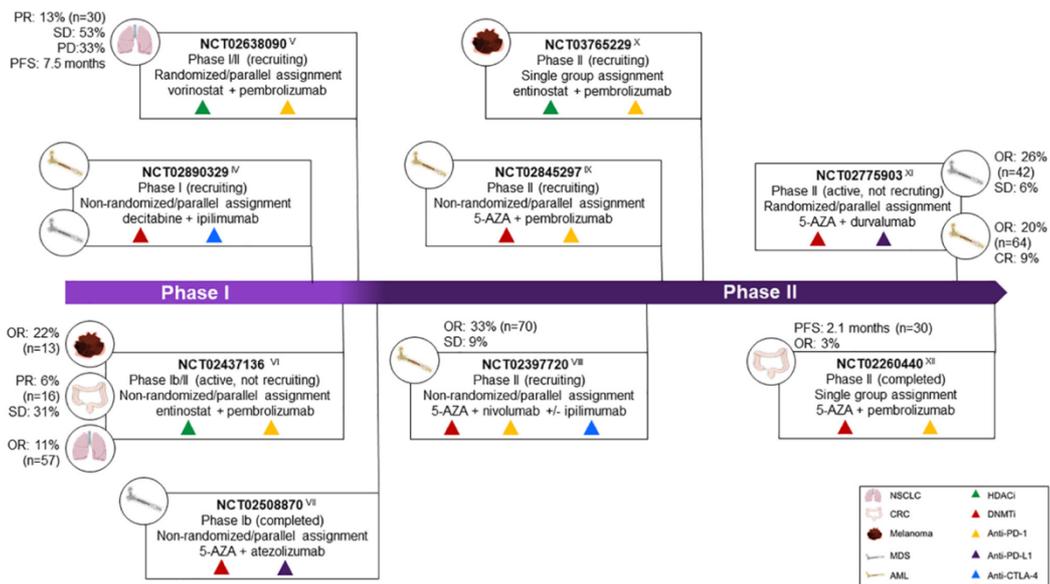


Figura 53. Gráfica que muestra el desarrollo de los principales ensayos clínicos que combinan inmunoterapia con fármacos que regulan la epigenética. Villanueva L et al., 2020<sup>275</sup>.

- Análisis global de los genes mutados en el ADN del tumor primario

Los datos más interesantes en el tumor primario se encuentran en el análisis integral de todo el exoma, donde se han puesto en escena las alteraciones en una serie de rutas funcionales que tienen una gran implicación en CPNM.

Aunque no ha habido genes específicos que se asocien a un grupo de respuesta en el análisis global del ADN del tumor primario, si que existen una serie de rutas funcionales que claramente diferencian a los grupos de respuesta. En el grupo de buena respuesta a nivolumab podemos objetivar que existen múltiples alteraciones de genes que se encargan de bloquear la señalización de CTLA-4 y de aumentar la respuesta inflamatoria. Este hallazgo es acorde a lo ya conocido<sup>127</sup> y estos pacientes con buenas respuestas, obtienen esta buena respuesta mediante un sistema inmune más activo contra el tumor, por lo que este hallazgo no hace sino confirmarnos la importancia de la inmunidad en la defensa anti-tumoral<sup>279</sup>.

Por el contrario, un hallazgo que no está tan descrito y que si que se ha aparecido en el grupo de no respuesta son las alteraciones en los genes implicados en la señalización a través de proteínas G. Estas proteínas que se localizan en la superficie celular reconocen sustancias extracelulares y transmiten señales a través de la membrana celular, como la señalización por proteína G. Este receptor una vez activado cataliza el intercambio de GDP/GTP en la subunidad G( $\alpha$ ) de una proteína G heterotrimérica. Esta señalización está implicada en multitud de procesos oncológicos fundamentales para el desarrollo tumoral<sup>280</sup>. A nivel preclínico diversas investigaciones valoran las proteínas G como *target* en los tratamientos de inmunoterapia para mejorar sus resultados<sup>281</sup>. Estos estudios se encuentran en fases muy preliminares, aunque parecen prometedores<sup>282</sup>. Por tanto, debe ser otro punto para tener en cuenta en los próximos años.

***Análisis del exoma del ctDNA extraído con biopsia líquida***

Las actuales implicaciones de la biopsia líquida en oncología están cambiando dados los avances en esta materia en los últimos años. La posibilidad de realizar un estudio a nivel genómico de las células tumorales mediante una extracción de sangre periférica está permitiendo aplicar esta técnica en la práctica clínica en múltiples campos. Sus aplicaciones van desde la monitorización de la respuesta a los tratamientos, a la detección

de la enfermedad mínima residual en pacientes con tumores resecaados, el diagnóstico molecular de la tumoración, la prevención de diferentes tumores mediante técnicas de *screening* población hasta la detección de mecanismos de resistencia a fármacos<sup>283</sup>. En esta última aplicación es donde se ha intentado valorar la utilidad de la biopsia líquida en pacientes con CPNM y tratados con inmunoterapia, realizando un análisis de biomarcadores genómicos que permitan predecir respuesta o resistencia a inmunoterapia.

Cuando se han analizado globalmente las mutaciones encontradas, la mediana de mutaciones por caso en las INDEL ha sido superior en el grupo de no respuesta frente al de respuesta. En el caso de las mutaciones SNV la mediana ha sido superior en el caso de respuesta frente al de no respuesta. Al realizar el análisis estadístico no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas. En este caso los resultados parecen diferir con los resultados de la literatura<sup>265</sup>, sin embargo, parece mostrar la limitación del tamaño muestral debido a tratarse de un análisis cuantitativo de 15 pacientes. Por tanto, al igual que en las muestras tisulares se deben tomar estos resultados con precaución debido al tamaño muestral.

#### - Genes mutados por INDEL en el ctDNA

Cuando se valoran los resultados del análisis de las mutaciones INDEL, se puede ver como un total de 21 genes se asocian de manera estadísticamente significativa al grupo de no respuesta frente al de respuesta. De estos 21 genes, la mayoría se encuentran asociados a rutas funcionales implicadas en la autofagia, mitofagia y apoptosis. No se encuentra nada descrito en la literatura que relacione estos procesos celulares en el tumor primario o ctDNA con la respuesta o resistencia a la inmunoterapia. A nivel biológico, la autofagia<sup>284</sup> y la mitofagia<sup>285</sup> son procesos celulares muy conservados evolutivamente en las células eucariotas, que permiten en muchos casos la defensa celular frente a agentes externos o internos. Estos procesos (sobre todo la autofagia) juegan un papel esencial en la adaptación a condiciones externa cambiantes, como la desnutrición o los cambios ambientales, así como a condiciones internas como la hipoxia o la defensa inmune antitumoral en el caso de las células cancerosas. Por tanto, aunque no se haya descrito hasta la fecha ninguna asociación entre estos procesos y la respuesta o la resistencia a la inmunoterapia, a nivel teórico, las células tumorales pueden aprovechar estos procesos biológicos para la defensa contra el sistema inmune, conduciendo a una resistencia a la inmunoterapia.

En estos casos, genes como *ATG9B* que están asociados a procesos de autofagia<sup>286,287</sup>, pueden tener un papel importante en el futuro como biomarcadores predictores de resistencia a la inmunoterapia. Y aunque este gen ya se haya asociado con la carcinogénesis y la historia natural de muchos tumores, es posible que sus alteraciones puedan ir más allá y ser importantes en la resistencia a fármacos de inmunoterapia.

Cuando nos vamos a analizar los genes y las rutas funcionales específicas de cada grupo de respuesta, las alteraciones de la vía de PI3K-Akt-mTOR se encuentran presentes en ambos grupos. Las mutaciones en genes asociados a esta vía son una constante tanto en genes alterados con INDEL como por SNV o en ambas como se verá a continuación. Las alteraciones en esta vía de PI3K-Akt-mTOR y su implicación en el cáncer de pulmón tanto de células pequeña como en el CPNM está muy descrito en la literatura<sup>288</sup>. Se estima que la prevalencia de mutaciones en esta vía en CPNM es del 3-4%, siendo más frecuente en tumores escamosos (8-10%) frente a los adenocarcinomas (2-3%) debido a su asociación con el hábito tabáquico<sup>289</sup>. Además, parece que las mutaciones en esta vía parecen coexistir con otras mutaciones diana como las de *EGFR*, *ALK*, *KRAS* o *B-RAF*.

Diferentes moléculas inhibitoras de esta vía se están desarrollando en CPNM. Actualmente no se encuentra entre las dianas terapéuticas en CPNM, sin embargo, en un futuro próximo se encontrarán desarrolladas para estos tumores<sup>290</sup>. Por tanto, los resultados que conciernen a esta vía funcional son acordes a la literatura actual y no muestran diferencias entre los grupos de respuesta estudiados, por lo que no parece que pueda esta vía tener una implicación directa en nuestro estudio en la resistencia o respuesta a la inmunoterapia.

En el análisis de las rutas funcionales más asociadas al grupo de no respuesta, se encuentra que existe una implicación más clara de la vía de Notch en este grupo (asociación no estadísticamente significativa). Las alteraciones en la vía de Notch están asociadas, al contrario de nuestros resultados, a nivel preclínico a una mejor respuesta a la inmunoterapia<sup>291</sup>. Las alteraciones de los genes relacionados con la vía de Notch se asocian con un estado proinflamatorio tumoral a nivel del microambiente, con la consecuente mayor respuesta inmune antitumoral y mejor respuesta a la inmunoterapia<sup>292</sup>. Estos datos se han observado en estudios preclínicos y no existen estudios de validación. En el caso de los resultados de este proyecto, es probable que esta interacción entre la vía de Notch y el grupo de no respuesta pueda ser debida al azar, aunque como indican los

estudios descritos hasta la fecha se necesita una validación prospectiva de las investigaciones que relacionan Notch con la respuesta o resistencia a la inmunoterapia.

Al contrario que sucede con la vía de Notch, las mutaciones en el gen *TGFBI* se asocian con resistencia a los tratamientos de inmunoterapia a través de la vía de *TGF-B*<sup>293</sup>. Actualmente, se encuentran en investigación tratamientos con doble bloque de la vía de *TGF-B* con fármacos anti-PD1, debido a la peor respuesta a la inmunoterapia en tumores con alteraciones de la vía de *TGF-B* (existe en desarrollo un ensayo clínico fase 3 en CPNM avanzado con alta expresión de PD-L1, NCT03631706)<sup>294</sup>. Esta asociación es debida a que los procesos tumorales de escape al control inmunológico y la evasión a las señales de inhibición del crecimiento celular son compartidos tanto por las alteraciones de la vía de PD-1/PD-L1 como a la vía de *TGF-B* (Figura 54). En el caso de nuestra muestra, se ha objetivado una mayor frecuencia de las mutaciones en el gen *TGFBI* con el grupo de no respuesta (no estadísticamente significativo), y por tanto parece que está asociación es acorde a los estudios actuales.



Figura 54. Mecanismos de evasión de la acción del sistema inmune frente al tumor. Gulley JL et al., 2022<sup>294</sup>.

Por último, los genes implicados en la síntesis de proteínas ribosomales citosólicas también se han visto relacionados con los grupos de respuesta de la muestra. Sin embargo,

estas vías genómicas no se han estudiado como biomarcadores predictores de resistencia o respuesta a inmunoterapia. Algunos de los genes implicados en esta ruta son conocidos como implicados en la carcinogénesis de diferentes tumores, sin embargo, no se conoce su implicación con los tratamientos con inmunoterapia<sup>295</sup>. En el caso de la muestra del estudio, se ha objetivado una asociación con el grupo de buena respuesta a nivolumab (no estadísticamente significativa), aunque serán necesarios estudios futuros que validen esta asociación.

- Genes mutados por SNV en el ctDNA

Al examinar las rutas funcionales que se presentan mediante SNV entre los dos grupos de respuesta, se objetivó que la mayoría de las rutas funcionales asociadas a la carcinogénesis se encuentran más presentes en el grupo de no respuesta que en el de respuesta. Al igual que en el grupo de las mutaciones INDEL, la vía de la autofagia se encuentra más asociada con la no respuesta a inmunoterapia a través de diferentes genes, el principal *ATG9B* ( $p < 0.05$ )<sup>286,287</sup>. La presencia de este gen de manera constante en el grupo de no respuesta tanto en forma de mutaciones INDEL como SNV indica su posible valor futuro como biomarcador predictivo de resistencia a inmunoterapia.

Además de la vía de la autofagia, las otras vías asociadas con la no respuesta fueron la vía de PI3K-Akt-mTOR (ya conocida), las vías de control del ciclo celular y la vía de reparación del daño al ADN (dependiente de *ATM*). Estas dos últimas vías tienen una gran importancia en CPNM y los tratamientos de inmunoterapia a nivel investigacional. Los fármacos inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina (CDK) 4/6 son moléculas estandarizadas en el tratamiento de los tumores de mama luminales y su eficacia se está estudiando en otros tumores con en CPNM<sup>296</sup>. La combinación de los inhibidores de CDK4/6 con inmunoterapia es un campo de futuro en el tratamiento del CPNM. La eficacia de esta combinación se basa en el hecho de que los inhibidores de CDK4/6 conducen a un estado proinflamatorio en el microambiente tumoral con el consecuente aumento de la efectividad de la inmunoterapia a través de la infiltración tumoral por linfocitos T<sup>297</sup>. Por ende, es importante observar como la alteración de genes que controlan el ciclo celular se asocia a la no respuesta a la inmunoterapia debido a que se puede revertir esta asociación mediante el uso combinado de inhibidores de CDK4/6 con inmunoterapia.

La otra vía de gran interés en CPNM y con un desarrollo mayor que la anterior a nivel clínico e investigacional es la de la reparación del ADN. La combinación del tratamiento con inhibidores de la poli-ADP ribosa polimerasa (iPARP) con inmunoterapia está en desarrollo mediante diferentes ensayos clínicos<sup>298</sup>. La inestabilidad genómica producida por las mutaciones en genes asociados a la recombinación homóloga como *ATM* conllevan la liberación de neoantígenos con un aumento de la respuesta a la inmunoterapia<sup>210</sup>. El principal ensayo clínico en este campo es el estudio fase 3 KEYLYNK-008 que evalúa la eficacia de pembrolizumab con olaparib (iPARP) en el mantenimiento de la respuesta tras tratamiento con quimioterapia y pembrolizumab en CPNM escamoso<sup>299</sup>. Los resultados del estudio se esperan para 2024.

Dentro de los genes alterados y específicos para unos de los dos grupos de respuesta, existen dos alteraciones que son llamativas. La primera es la vía de Notch asociada al grupo de no respuesta. Al igual que cuando se analizan los genes mutaciones por INDEL, la vía de Notch parece asociada al grupo de no respuesta. Este punto es importante debido a que se confirman los resultados previamente hallados y parece indicar que la vía de Notch juega un papel importante en la resistencia a la inmunoterapia. La otra vía que juega un papel importante es la de *RAS*. Se ha objetivado que las alteraciones en la señalización de las vías de *RAS* se asocian al grupo de respuesta frente al de no respuesta (no estadísticamente significativo). Esto conlleva un gran valor a nivel clínico debido a que existen diferentes estudios que asocian en CPNM las mutaciones de *RAS* con la mejor respuesta a inmunoterapia<sup>300</sup>. En nuestro estudio, pese a que la asociación no es estadísticamente significativa, se confirma esta asociación y ello puede tener una gran importancia a nivel clínico debido a que la combinación de los inhibidores de *RAS* con inmunoterapia puede ser un estándar en el tratamiento del CPNM a corto plazo<sup>301</sup>.

- Análisis global de los genes mutados en el ctDNA

Al realizar el análisis combinado de los genes mutados tanto por INDEL y SNV, es decir, aquellos genes que presentaron mutaciones de ambos tipos, se observó la presencia de 712 genes que eran específicos del grupo de no respuesta frente a 464 genes que lo eran del grupo de respuesta. De este conjunto de genes, únicamente 2 genes se mostraron asociados a su grupo de manera estadísticamente significativa. Estos dos genes que fueron *COL9A3* y *LAMC3* se encontraban en el grupo de no respuesta. El hecho de que estos genes se presentaran asociados de manera estadísticamente significativa en el grupo de

resistencia a inmunoterapia nos muestra que nos encontramos ante dos posibles biomarcadores predictivos de respuesta/resistencia a inmunoterapia. Las mutaciones en la muestra en estos dos genes han sido tanto en forma de INDEL como SNV y su implicación en el grupo sin respuesta en prácticamente todos los pacientes, y por el contrario su ausencia en el grupo de buena respuesta hace que su papel pueda ser fundamental en la respuesta a los inhibidores de los puntos de control inmune.

Al realizar una revisión bibliográfica de lo descrito en la literatura sobre ambos genes, el gen de mayor implicación en los procesos tumorales es *LAMC3*. El gen *LAMC3* se localiza en el cromosoma 9, en la posición 9p34.12 (Figura 55)<sup>302</sup>. Este gen se encarga de codificar la isoforma gamma 3 de la cadena gamma de la laminina. Las lamininas, son una familia de glicoproteínas de la matriz extracelular, siendo el principal constituyente más allá del colágeno en la formación de la membrana basal. Las lamininas están compuestas por 3 cadenas (alfa, beta y gamma), siendo el gen *LAMC3* clave en la síntesis de la cadena gamma. La expresión de este gen es muy elevada en la placenta, siendo fundamental en su formación. Fuera de este proceso, su expresión es elevada en pulmón, testículos y glándulas suprarrenales<sup>303</sup>.

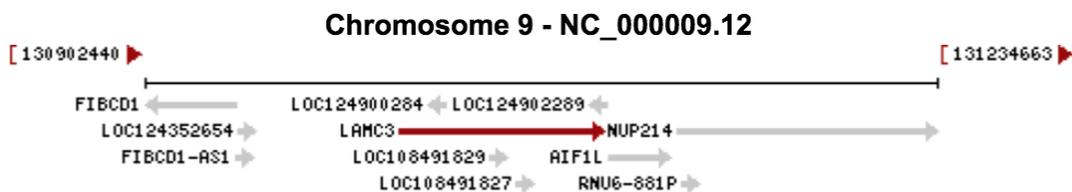


Figura 55. Localización cromosómica del gen *LAMC3*. Imagen extraída de la *National Library of Medicine (NIH)*.

Las alteraciones en este gen se han implicado en una gran variedad de procesos biológicos celulares asociados al cáncer que incluyen la adhesión, la diferenciación, la migración, la señalización y la aparición de metástasis (Figura 56). Las mutaciones del gen *LAMC3* son clave en la alteración de la membrana basal y en la falta de adhesión de las células epiteliales del pulmón, ovario y testículo. Su distribución en las superficies de las células epiteliales hace que también sean parte importante en la morfogénesis y estabilidad estructural de los procesos ciliados de las células epiteliales de los órganos mencionados<sup>304</sup>. Junto con las alteraciones de la matriz extracelular y de la adhesión celular, se ha demostrado la implicación de las alteraciones del gen *LAMC3* en las rutas

funcionales de la vía de *PI3K-Akt-mTOR*, donde es parte fundamental con la consecuente carcinogénesis dependiente de esta vía<sup>305</sup>.

El estudio realizado por Lei et al.<sup>306</sup>, muestra como las mutaciones en *LAMC3* que conducen a una menor expresión de la proteína se asocian con un peor pronóstico y una mayor progresión de los carcinomas de ovario. Se objetivó en el estudio que la baja expresión de la proteína se encuentra más extendida en los cánceres de ovario con resistencia a los platinos de manera estadísticamente significativa. Asimismo, la supervivencia fue menor en estas pacientes tanto en términos de SLP como de SG. Otro estudio realizado por Lesseur et al.<sup>307</sup>, ha relacionado las mutaciones en *LAMC3* con la carcinogénesis del cáncer de cavidad oral. En este estudio no se asocian los resultados con la supervivencia o la respuesta a la quimioterapia. Por tanto, parece que su implicación en la carcinogénesis de diferentes tumores es clave. No se han encontrado estudios que hayan valorado su asociación con la modulación del sistema inmune en la respuesta antitumoral.

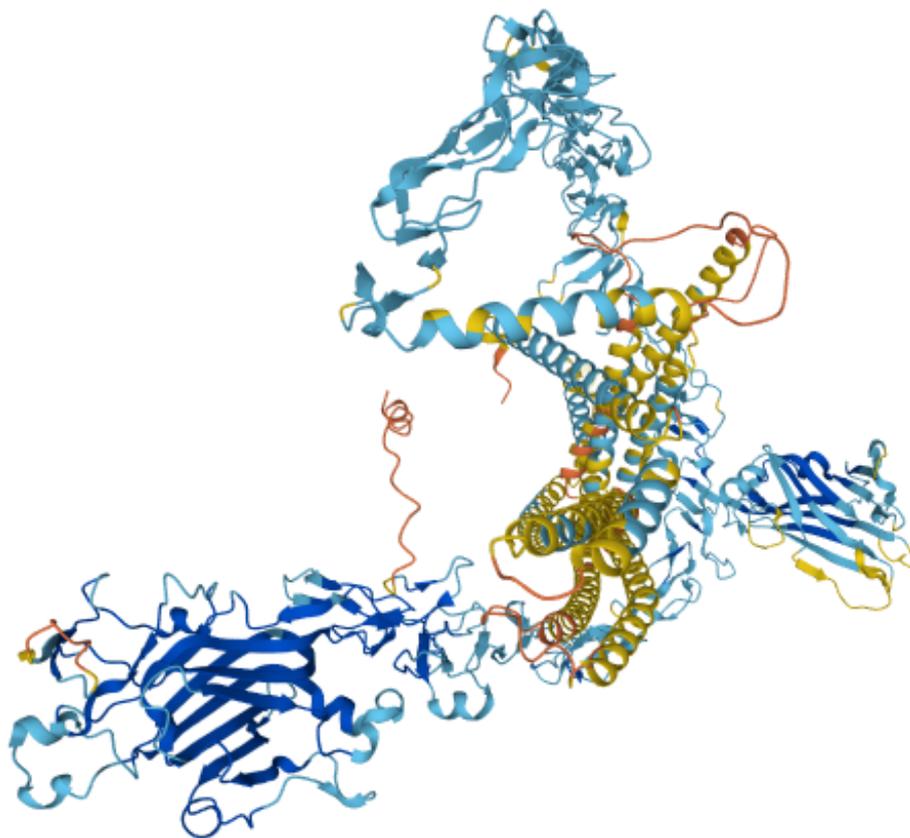


Figura 56. Estructura tridimensional de la proteína codificada por el gen *LAMC3*. Imagen extraída de la página web UniProt.

Por tanto, las mutaciones en *LAMC3* conllevan una alteración de la membrana basal y de la matriz extracelular que facilitan la aparición de la transición epitelio-mesénquima (TEM). La TEM en diferentes estudios ha sido demostrada como causante de un estado de inmunosupresión a nivel del microambiente tumoral secundariamente a la infiltración del tumor por linfocitos T reguladores y células mieloides supresoras<sup>308</sup>. Además, también se ha mostrado en la literatura como la TEM modifica la expresión de PD-L1 en los tumores con lo que aumenta la inmunosupresión tumoral<sup>309</sup>. El proceso mediante el cual la TEM facilita la inmunosupresión del microambiente es dinámico, debido a que los mecanismos de evasión tumoral al sistema inmune también facilitan la aparición de la TEM en otras células, por lo que es un círculo vicioso a través del cual los tumores pueden evadirse de los mecanismos de defensa antitumoral por parte del sistema inmune<sup>310</sup>. Por todo lo anterior, el gen *LAMC3* tiene a nivel teórico una implicación en la resistencia a la inmunoterapia. Además, los resultados establecen como este papel teórico también parece existir a nivel clínico, por lo que este gen parece mostrarse como un nuevo biomarcador predictivo con inmunoterapia (Figura 57).

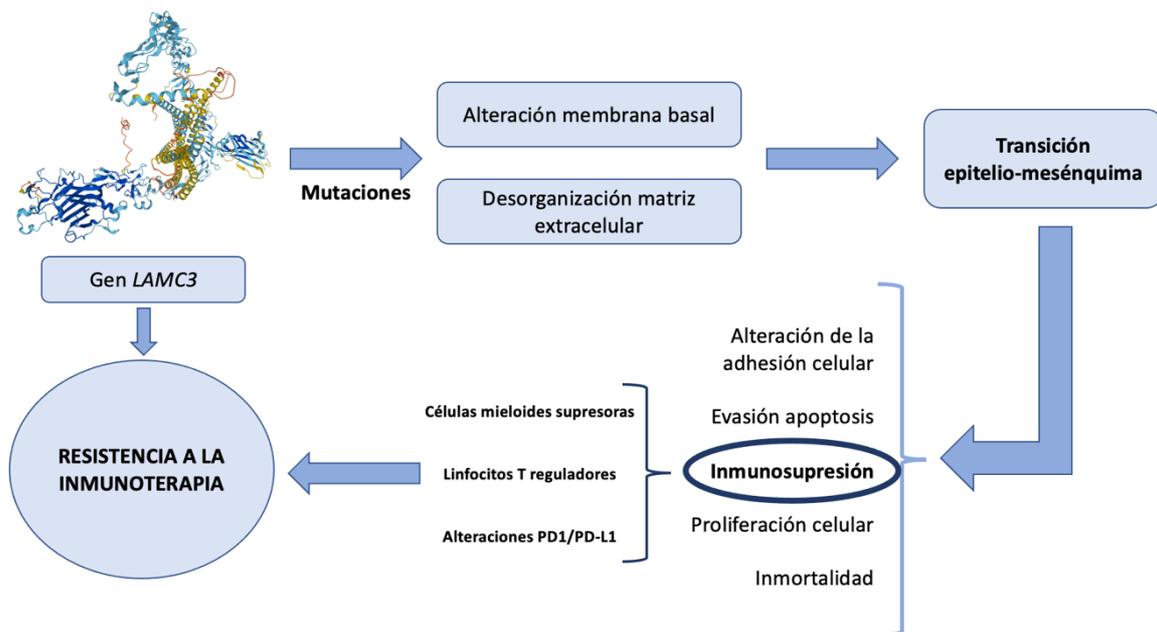


Figura 57. Mecanismos de producción de resistencia a la inmunoterapia por parte del gen *LAMC3*.

Las implicaciones que este gen podría tener en la práctica clínica podrían ser esenciales en el futuro del tratamiento del CPNM. En lo que respecta al estándar de tratamiento hoy en día, su aplicación puede devenir por ejemplo en la necesidad de uso de la combinación

de quimioterapia con inmunoterapia en CPNM con expresión de PD-L1  $\geq 50\%$ . En estos pacientes el estándar es la inmunoterapia en monoterapia, sin embargo, si está presente la expresión de este marcador puede que la combinación de quimio-inmunoterapia sea más eficaz que la inmunoterapia sola. Otro ejemplo sería para aquellos pacientes que han progresado a una primera línea sin inmunoterapia y que se plantea una segunda línea de inmunoterapia o quimioterapia. En estos casos y en tumores que presenten *LAMC3* mutado es posible que el uso de quimioterapia sea más eficaz que el de inmunoterapia. Por tanto, aunque es necesario estudios que confirmen este hallazgo, *LAMC3* se muestra como un biomarcador predictor a inmunoterapia que podría tener un papel fundamental en un futuro.

Junto con *LAMC3*, el otro gen que se encuentra asociado a la resistencia a inmunoterapia es *COL9A3*. Se trata de un gen localizado en el cromosoma 20, en la región 20q13.33 (Figura 58)<sup>311</sup>. Este gen codifica una de las tres cadenas alfa del colágeno tipo IX, el principal componente de colágeno en el cartílago hialino (Figura 59).

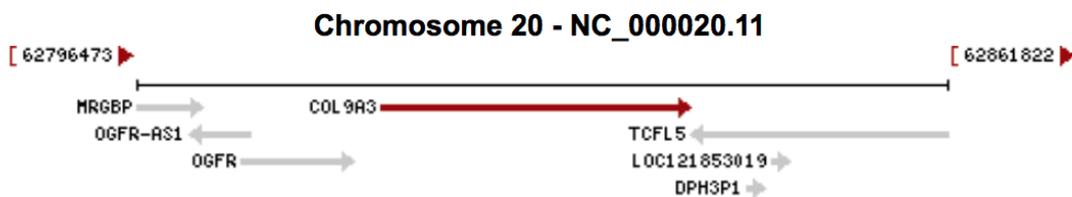


Figura 58. Localización cromosómica del gen *COL9A3*. Imagen extraída de la NIH.

Las mutaciones en este gen se asocian con enfermedades congénitas con afectación del hueso y el cartílago. Las enfermedades descritas por mutaciones congénitas de este gen incluyen patologías como la displasia epifisaria tipo 3, las enfermedades relacionadas con los discos intervertebrales y alteraciones vítreas. El principal síndrome hereditario asociado a este gen es el síndrome de Stickler, caracterizado por alteraciones en la visión (miopía, alteraciones vítreas y desprendimientos de retina), audición (sordera neurosensorial) y articulaciones (displasia epifisaria, artrosis prematura y anomalías de la columna vertebral)<sup>312</sup>.

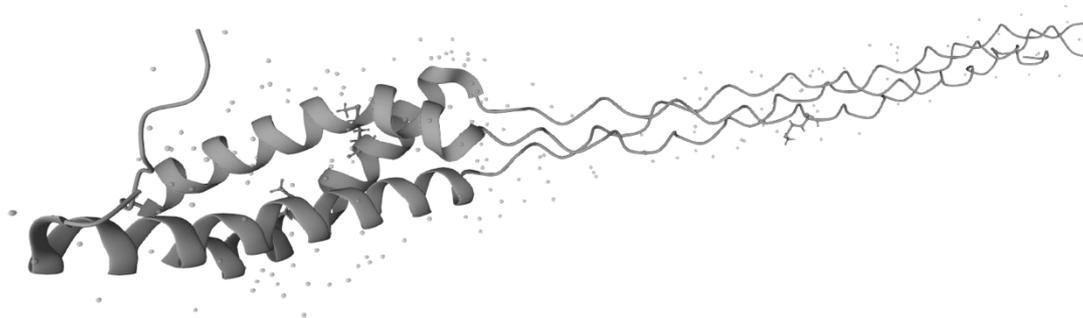


Figura 59. Estructura tridimensional de la proteína codificada por el gen *COL9A3*. Imagen extraída de la página web UniProt.

La expresión de este gen se localiza preferentemente en cerebro, glándulas salivales, testículos y tiroides<sup>313</sup>. Se ha descrito la asociación de este gen con la carcinogénesis a través de la vía de PI3K-Akt-mTOR en general y en cáncer gástrico en particular. Las mutaciones en *COL9A3* conducen a alteraciones de la matriz extracelular que conllevan problemas en la adhesión celular. Estas alteraciones a su vez pueden alterar la vía de *PI3KCA* con la consecuente carcinogénesis, en particular en cáncer gástrico, en donde los mecanismos de adhesión celular están particularmente alterados<sup>314</sup>. Además, otros estudios han asociado este gen con la carcinogénesis en cáncer de mama subtipo triple negativo y con el cáncer de esófago<sup>315</sup>. En este último tumor, el estudio realizado por Liu et al.<sup>316</sup>, relacionó las mutaciones en *COL9A3* con las alteraciones en el microambiente tumoral y consecuentemente con la infiltración linfocitaria. Hasta la fecha es el único estudio que ha relacionado este gen con la regulación del sistema inmune. Por tanto, se deberá evaluar este gen en nuevos estudios dado que parece mostrarse como un prometedor biomarcador predictor de resistencia a la inmunoterapia, aunque su posible implicación como biomarcador no es tan clara como en el caso del gen *LAMC3*, y se deberán valorar con precaución.

#### ***Análisis comparativo entre el exoma del ADN tisular y ctDNA***

En el primer punto del análisis, lo que impresiona es la diferencia en el global de mutaciones entre los dos grupos de respuesta en función de si el análisis se hace en la muestra tisular o en el ctDNA. En el ADN tisular, al contrario que en el ctDNA, se observa

una mediana de mutaciones por caso acorde a lo descrito en la literatura<sup>264,265</sup>, en donde el número de mutaciones es mayor en el grupo de respuesta frente al de no respuesta. Todos estos hallazgos es muy posible que sean debidos al azar, y dado que no se ha encontrado significación estadística ni en el tumor primario ni en el ctDNA, las diferencias en el global cuantitativo de las mutaciones halladas necesite de un aumento del tamaño muestral para poder sacar conclusiones correctas.

Asimismo, sin tener en cuenta tipos de mutaciones o los grupos de respuesta, en la muestra tisular se han encontrado un total de 79719 mutaciones y en el ctDNA 85421 mutaciones funcionales en total. Por tanto, han existido 5702 mutaciones más en el tumor primario que en ctDNA. Que el número de mutaciones difiera considerablemente entre el tumor primario y el ctDNA muestra la dinámica tumoral y como se suceden los cambios en el tumor a lo largo del tiempo<sup>317</sup>. Estos cambios dan reflejo de como los tumores se adaptan a las condiciones cambiantes internas y externas (modelo de Hanahan y Weinberg, Figura 60<sup>318</sup>), haciéndose resistente a los tratamientos oncológicos. Es importante tener en cuenta que las muestras de tumor primario se recogieron al momento del diagnóstico y el ctDNA durante el tratamiento con inmunoterapia, por lo que estos cambios reflejan entre otras cosas la adaptación del tumor a las diferentes circunstancias.

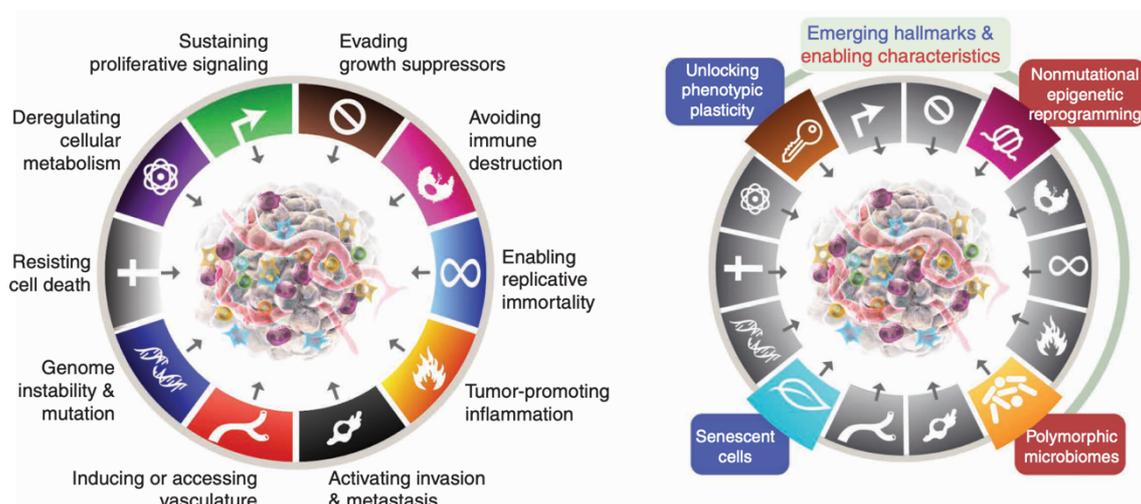


Figura 60. *Hallmarks* de Hanahan y Weinberg. Hanahan et al., 2022<sup>318</sup>.

Conocer la heterogeneidad tumoral es un pilar presente y futuro para adaptar los tratamientos oncológicos en función de las alteraciones moleculares en el tumor en un momento determinado. Este punto es donde radica parte del funcionamiento de la biopsia

líquida<sup>319</sup>, permitiendo conocer la biología molecular del tumor en tiempo real. Por este motivo, este primer análisis cuantitativo del número de mutaciones globales halladas en el exoma vuelve a confirmar un dato ya conocido pero esencial en la medicina de precisión como es el papel de la biopsia líquida en el diagnóstico molecular en tiempo real debido a la dinámica tumoral.

El segundo punto importante son las diferentes alteraciones de rutas oncogénicas entre el tumor primario y el ctDNA, así como entre los grupos de respuesta. La única ruta funcional que aparece sistemáticamente en ambas muestras y en todos los grupos de respuesta es la vía de PI3K-Akt-mTOR la cual parece tener una implicación fundamental en la carcinogénesis en CPNM en los pacientes de la muestra. Como se indica en el punto anterior, PI3K-Akt-mTOR es una ruta conocida y descrita en cáncer de pulmón, sin embargo<sup>288</sup>, todavía no se han desarrollado fármacos que actúen a este nivel<sup>289</sup>. Algunos estudios evalúan la combinación de anti-PD1 con inhibidores de PI3K como el de Isoyama et al.<sup>320</sup>, sin embargo, no se han iniciado ensayos clínicos aún en cáncer de pulmón. Por tanto, debe ser una vía a tener en cuenta en los próximos años en CPNM.

El resto de las rutas encontradas difieren en función de la muestra analizada. Lógicamente, se han encontrado genes mutados que se implican en la mayoría de las rutas conocidas en la carcinogénesis, sin embargo, únicamente se han descrito en los resultados aquellos genes que presentan diferencias de frecuencia entre los grupos de respuesta. De esta manera, una vía que está alterada en el tumor primario en ambos grupos de respuesta y en el ctDNA únicamente en el grupo de mala respuesta es la vía del ciclo celular<sup>296</sup>. Las mutaciones en los genes que se encargan del control del ciclo celular se encuentran menos presentes en el grupo de buena respuesta del ctDNA. Es posible que en aquellos tumores en donde los genes del ciclo celular no se encuentren alterados presenten una mejor respuesta a la inmunoterapia. Las desregulaciones en el ciclo celular son conocidas como promotoras de resistencia a los tratamientos oncológicos de quimioterapia, siendo probable que esta asociación también esté presente con la inmunoterapia<sup>297</sup>. Por ello y como también se indica previamente, la asociación de inhibidores de CDK con inmunoterapia podrá ser un estándar en el futuro.

El resto de vías se presentan muy inconexas entre los exomas por muestras y por grupos de respuesta. Existen vías muy interesantes por sus implicaciones terapéuticas, aunque no existe una asociación entre tejido tisular y ctDNA que permita hacer inferencias. El único

gen del que se puede extraer una reflexión interesante es *ATG9B*<sup>286</sup>, el cual solo se ha encontrado presente en el grupo de mala respuesta a nivolumab del ctDNA, no estando presente ni en el grupo de buena respuesta ni en ninguno de los grupos del tumor primario. Este gen que, si que presenta significancia estadística cuando se analizan INDEL y SNV por separado, pero no en el análisis global del exoma, podría ser un biomarcador predictivo a inmunoterapia futuro. Este gen que está implicado en los procesos de autofagia y mitofagia podría producir resistencia a la inmunoterapia a través de sus mutaciones en el proceso de desarrollo tumoral<sup>287</sup>. Se deberán valorar sus implicaciones en estudios venideros.

Por último, el dato más importante encontrado en este trabajo es la presencia de dos genes asociados a resistencia a inmunoterapia de manera estadísticamente significativa en el ctDNA que son *LAMC3* y *COL9A3*. Estos genes alterados que han tenido una frecuencia cercana al 100% en el grupo de no respuesta del ctDNA, no se han observado mutados en el ADN del tumor primario. La existencia de la dinámica celular y la adaptación de las células tumorales a los condicionantes internos y externos, han podido condicionar que estos genes se hayan ido alterando a medida del desarrollo tumoral y en algunos casos iniciarse antes o durante el tratamiento con inmunoterapia<sup>308</sup>. Es por lo que parece que podemos encontrarnos ante dos nuevos biomarcadores predictores de resistencia a inmunoterapia en CPNM, sobretodo *LAMC3* que ha demostrado ser un gen con grandes implicaciones en la proliferación de los tumores y en la aparición de los fenómenos de TEM<sup>309</sup>.

Sería crucial que con el tiempo se desarrollasen estudios dirigidos a validar de manera independiente estos biomarcadores predictivos de resistencia a la inmunoterapia, sobretodo en CPNM. Estos estudios deberían realizar una vigilancia del tumor en diferentes tiempos desde el diagnóstico del tumor y durante el tratamiento con inmunoterapia para comprobar como se desarrolla este biomarcador para su caracterización.

Para concluir el apartado de discusión, hay que decir que todos los hallazgos encontrados tanto en el ctDNA como en ADN del tumor primario han sido posibles gracias a la conjunción de las diferentes pruebas diagnósticas utilizadas (IHQ, exoma de ctDNA extraído mediante biopsia líquida y exoma del ADN del tumor primario). El hallazgo de diferentes biomarcadores predictivos de respuesta o resistencia a inmunoterapia como los

genes *TP53*, el sistema MMR o el gen *LAMC3* permitirán en el futuro el desarrollo de terapias con inmunoterapia enfocadas en una medicina de precisión en oncología.

## **CONCLUSIONES**



## ***CONCLUSIONES***

El análisis de los resultados de esta tesis doctoral junto con la posterior discusión ha permitido la inferencia de las conclusiones que se exponen a continuación:

1. En nuestro estudio los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico y tratados con inmunoterapia en segunda línea en el Hospital Clínico Universitario de Salamanca presentan unas características en términos epidemiológicos y clínicos similares a la de los ensayos clínicos y estudios en vida real. La muestra analizada cumple con la representatividad requerida para la realización de estudios clínicos y moleculares sobre ella.
2. Los resultados de nuestro estudio muestran que el gen *TP53*, los genes del sistema MMR, *LAMC3* o *COL9A3* se presentan como biomarcadores predictores de respuesta a inmunoterapia.
3. Los resultados de nuestro estudio indican que la presencia de alteraciones en diferentes rutas funcionales tales como las de la remodelación de la cromatina, la regulación del proteosoma o de los mecanismos de *splicing* son predictoras de respuesta o resistencia a inmunoterapia en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.
4. Los resultados de nuestro estudio ponen de manifiesto que los genes mutados detectados en ctDNA mediante biopsia líquida *ATG9B*, *COL9A3* y *LAMC3* se presentan como prometedores biomarcadores predictores de resistencia a inmunoterapia. En especial el gen *LAMC3* tiene una base biológica que permite considerarlo un gen muy prometedor en la detección de la resistencia a inmunoterapia en cáncer de pulmón.
5. Los resultados de nuestro estudio reflejan que la conjunción de inmunohistoquímica y secuenciación genética masiva ha permitido el análisis genómico en los tumores de los pacientes de la muestra. El uso combinado de ambas técnicas es esencial para el diagnóstico molecular de los tumores sólidos en oncología.



## **BIBLIOGRAFÍA**



## ***BIBLIOGRAFÍA***

1. Mattiuzzi C, Lippi G. Cancer statistics: a comparison between World Health Organization (WHO) and Global Burden of Disease (GBD). *Eur J Public Health*. 2020;30(5):1026-1027.
2. Global Burden of Disease Cancer Collaboration, Fitzmaurice C, Abate D, Abbasi N, Abbastabar H, Abd-Allah F, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*. 2019;5(12):1749-1768.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
5. World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. WHO; 2020. [who.int/data/gho/data/themes/mortality-andglobal-health-estimates/gh-leadingcauses-of-death](http://who.int/data/gho/data/themes/mortality-andglobal-health-estimates/gh-leadingcauses-of-death)
6. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer*. 2018;103:356-387.
7. Dyba T, Randi G, Bray F, Martos C, Giusti F, Nicholson N, et al. The European cancer burden in 2020: Incidence and mortality estimates for 40 countries and 25 major cancers. *Eur J Cancer*. 2021;157:308-347.
8. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Las cifras del cáncer en España, 2022. [último acceso en 10/10/22]. Disponible en: [https://seom.org/images/Cifras\\_del\\_cancer\\_en\\_Espana\\_2022.pdf](https://seom.org/images/Cifras_del_cancer_en_Espana_2022.pdf)
9. REDECAN. Red Española de Registros de Cáncer. [último acceso el 11/12/21]. Disponible en: <http://redecn.org>.

10. Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Rojas D, Alemán A. et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol.* 2017;19(7):799-825.
11. Hammond SK. Global patterns of nicotine and tobacco consumption. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(192):3-28.
12. Wang Q, Li M, Yang M, Yang Y, Song F, Zhang W, et al. Analysis of immune-related signatures of lung adenocarcinoma identified two distinct subtypes: implications for immune checkpoint blockade therapy. *Aging (Albany NY).* 2020;12(4):3312-3339.
13. MacRosty CR, Rivera MP. Lung Cancer in Women: A Modern Epidemic. *Clin Chest Med.* 2020;41(1):53-65.
14. Ahsan A, Wiyono NH, Veruswati M, Adani N, Kusuma D, Amalia N. Comparison of tobacco import and tobacco control in five countries: lessons learned for Indonesia. *Global Health.* 2020;16(1):65.
15. Thrasher JF, Chaloupka F, Hammond D, Fong G, Borland R, Hastings G, et al. Evaluating tobacco control policy in Latin American countries during the era of the Framework Convention on Tobacco Control. *Salud Publica Mex.* 2006;Suppl 1:S155-66.
16. Khorrami Z, Pourkhosravani M, Rezapour M, Etemad K, Taghavi-Shahri SM, Künzli N, et al. Multiple air pollutant exposure and lung cancer in Tehran, Iran. *Sci Rep.* 2021;11(1):9239.
17. Jung KJ, Jeon C, Jee SH. The effect of smoking on lung cancer: ethnic differences and the smoking paradox. *Epidemiol Health.* 2016;38:e2016060.
18. Jazieh AR, Algwaiz G, Errihani H, Elghissassi I, Mula-Hussain L, Bawazir AA, et al. Lung Cancer in the Middle East and North Africa Region. *J Thorac Oncol.* 2019;14(11):1884-1891.
19. Manners D, Dawkins P, Pascoe D, Crengle S, Bartholomew K, Leong TL. Lung cancer screening in Australia and New Zealand: the evidence and the challenge. *Intern Med J.* 2021;51(3):436-441.
20. Mao Y, Yang D, He J, Krasna MJ. Epidemiology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2016 Jul;25(3):439-45. doi: 10.1016/j.soc.2016.02.001. PMID: 27261907.
21. Candal-Pedreira C, Ruano-Ravina A, Carcereny E, Rodríguez-Abreu D, Guirado-Risueño M, López-Castro R, et al. Representativeness of the Spanish Thoracic Tumour Registry. Comparison of sociodemographic data with other national registries. *Gac Sanit.* 2022:S0213-9111(22)00101-7.

22. Rafiemanesh H, Mehtarpour M, Khani F, Hesami SM, Shamlou R, Towhidi F, et al. Epidemiology, incidence and mortality of lung cancer and their relationship with the development index in the world. *J Thorac Dis.* 2016;8(6):1094-102.
23. Ministerio de Sanidad y Consumo. La situación del cáncer en España. [último acceso en 01/07/2022]. Disponible en: <https://www.sanidad.gob.es/en/ciudadanos/enfLesiones/enfNoTransmisibles/docs/situacionCancer.pdf>
24. Stapelfeld C, Dammann C, Maser E. Sex-specificity in lung cancer risk. *Int J Cancer.* 2020;146(9):2376-2382.
25. Wynder EL, Muscat JE. The changing epidemiology of smoking and lung cancer histology. *Environ Health Perspect.* 1995;103 Suppl 8(Suppl 8):143-8.
26. Daff ME, Doll R, Kennaway EL. Cancer of the lung in relation to tobacco. *Br J Cancer.* 1951;5(1):1-20.
27. Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J.* 1950;2(4682):739-48.
28. Sadowsky DA, Gilliam AG, Cornfield J. The statistical association between smoking and carcinoma of the lung. *J Natl Cancer Inst.* 1953;13(5):1237-58.
29. Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J.* 2016;48(3):889-902.
30. Bade BC, De la Cruz CS. Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med.* 2020;41(1):1-24.
31. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(5):584-94.
32. Akhtar N, Bansal JG. Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker. *Curr Probl Cancer.* 2017;41(5):328-339.
33. Rivera GA, Wakelee H. Lung Cancer in Never Smokers. *Adv Exp Med Biol.* 2016;893:43-57.
34. Klebe S, Leigh J, Henderson DW, Nurminen M. Asbestos, Smoking and Lung Cancer: An Update. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;17(1):258.
35. Wadowski B, De Rienzo A, Bueno R. The Molecular Basis of Malignant Pleural Mesothelioma. *Thorac Surg Clin.* 2020;30(4):383-393.
36. Lorenzo-González M, Torres-Durán M, Barbosa-Lorenzo R, Provencio-Pulla M, Barros-Dios JM, Ruano-Ravina A. Radon exposure: a major cause of lung cancer. *Expert Rev Respir Med.* 2019;13(9):839-850.

37. Vogeltanz-Holm N, Schwartz GG. Radon and lung cancer: What does the public really know? *J Environ Radioact.* 2018;192:26-31.
38. Ramos Hernández C, Mouronte-Roibás C, Barros-Dios JM, Fernández-Villar A, Ruano-Ravina A. Deletion of GSTM1 and GSTT1 genes and lung cancer survival: a systematic review. *Tumori.* 2017;103(4):338-344.
39. Zhu K, Xu A, Xia W, Li P, Zhang B, Jiang H, et al. Association Between NAT2 Polymorphism and Lung Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2021;11:567762.
40. Mouronte-Roibás C, Leiro-Fernández V, Fernández-Villar A, Botana-Rial M, Ramos-Hernández C, Ruano-Ravina A. COPD, emphysema and the onset of lung cancer. A systematic review. *Cancer Lett.* 2016;382(2):240-244.
41. Tzouvelekis A, Gomatou G, Bouros E, Trigidou R, Tzilas V, Bouros D. Common Pathogenic Mechanisms Between Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lung Cancer. *Chest.* 2019;156(2):383-391.
42. Kinoshita T, Goto T. Molecular Mechanisms of Pulmonary Fibrogenesis and Its Progression to Lung Cancer: A Review. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1461.
43. Wei X, Zhu C, Ji M, Fan J, Xie J, Huang Y, et al. Diet and Risk of Incident Lung Cancer: A Large Prospective Cohort Study in UK Biobank. *Am J Clin Nutr.* 2021;114(6):2043-2051.
44. Krusinska B, Hawrysz I, Wadolowska L, Slowinska MA, Biernacki M, Czerwinska A, et al. Associations of Mediterranean Diet and a Posteriori Derived Dietary Patterns with Breast and Lung Cancer Risk: A Case-Control Study. *Nutrients.* 2018;10(4):470.
45. Osmani L, Askin F, Gabrielson E, Li QK. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. *Semin Cancer Biol.* 2018;52(Pt 1):103-109.
46. Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, Giroux DJ, Rami-Porta R, Goldstraw P; Members of IASLC Staging Committee. The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009;4(5):568-77.
47. Inamura K. Clinicopathological Characteristics and Mutations Driving Development of Early Lung Adenocarcinoma: Tumor Initiation and Progression. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):1259.

48. Cersosimo RJ. Lung cancer: a review. *Am J Health Syst Pharm.* 2002;59(7):611-42.
49. Inamura K. Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol.* 2017;7:193.
50. Duffy MJ, O'Byrne K. Tissue and Blood Biomarkers in Lung Cancer: A Review. *Adv Clin Chem.* 2018;86:1-21.
51. Yatabe Y, Dacic S, Borczuk AC, Warth A, Russell PA, Lantuejoul S, et al. Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2019;14(3):377-407.
52. Qian HH, Xu TS, Cai XQ, Ji TL, Guo HX. Prognostic value of TTF-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Clin Chim Acta.* 2015;451(Pt B):208-14.
53. Wu J, Zhang Y, Ding T, Cheng R, Gong W, Guo Y, et al. Napsin A Expression in Subtypes of Thyroid Tumors: Comparison with Lung Adenocarcinomas. *Endocr Pathol.* 2020;31(1):39-45.
54. Buccheri G, Ferrigno D. Cytokeratin-derived markers of lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 2001;1(3):315-22.
55. Zheng M. Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surg Oncol Clin N Am.* 2016;25(3):447-68.
56. Samet JM. Carcinogenesis and lung cancer: 70 years of progress and more to come. *Carcinogenesis.* 2020;41(10):1309-1317.
57. Alberg AJ, Brock MV, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncol.* 2005;23(14):3175-85.
58. Benusiglio PR, Fallet V, Sanchis-Borja M, Coulet F, Cadranet J. Lung cancer is also a hereditary disease. *Eur Respir Rev.* 2021;30(162):210045.
59. Rammal S, Kourie HR, Jalkh N, Mehawej C, Chouery E, Moujaess E, et al. Molecular pathogenesis of hereditary lung cancer: a literature review. *Pharmacogenomics.* 2021;22(12):791-803.
60. Hsu YC, Chang YH, Chang GC, Ho BC, Yuan SS, Li YC, et al. Tumor mutation burden and recurrent tumors in hereditary lung cancer. *Cancer Med.* 2019;8(5):2179-2187.
61. Castellanos E, Feld E, Horn L. Driven by Mutations: The Predictive Value of Mutation Subtype in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2017;12(4):612-623.

62. Tan AC, Tan DSW. Targeted Therapies for Lung Cancer Patients With Oncogenic Driver Molecular Alterations. *J Clin Oncol*. 2022;40(6):611-625.
63. Wu SG, Shih JY. Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):38.
64. Nguyen KS, Kobayashi S, Costa DB. Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin Lung Cancer*. 2009;10(4):281-9.
65. Jia Y, Yun CH, Park E, Ercan D, Manuia M, Juarez J, et al. Overcoming EGFR(T790M) and EGFR(C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors. *Nature*. 2016;534(7605):129-32.
66. Wen F, Zheng H, Zhang P, Hutton D, Li Q. OPTIMAL and ENSURE trials-based combined cost-effectiveness analysis of erlotinib versus chemotherapy for the first-line treatment of Asian patients with non-squamous non-small-cell lung cancer. *BMJ Open*. 2018;8(4):e020128.
67. Lin JJ, Cardarella S, Lydon CA, Dahlberg SE, Jackman DM, Jänne PA, Johnson BE. Five-Year Survival in EGFR-Mutant Metastatic Lung Adenocarcinoma Treated with EGFR-TKIs. *J Thorac Oncol*. 2016;11(4):556-65.
68. Takeuchi K, Soda M, Togashi Y, Suzuki R, Sakata S, Hatano S, et al. RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med*. 2012;18(3):378-81.
69. Leonetti A, Sharma S, Minari R, Perego P, Giovannetti E, Tiseo M. Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2019;121(9):725-737.
70. Imyanitov EN, Iyevleva AG, Levchenko EV. Molecular testing and targeted therapy for non-small cell lung cancer: Current status and perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;157:103194.
71. Mosele F, Remon J, Mateo J, Westphalen CB, Barlesi F, Lolkema MP, et al. Recommendations for the use of next-generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol*. 2020;31(11):1491-1505.
72. Gosain R, Miller K. Symptoms and symptom management in long-term cancer survivors. *Cancer J*. 2013;19(5):405-9.
73. Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE. Lung cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2007;75(1):56-63.

74. Dai J, Yang P, Cox A, Jiang G. Lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease: From a clinical perspective. *Oncotarget*. 2017;8(11):18513-18524.
75. Riihimäki M, Hemminki A, Fallah M, Thomsen H, Sundquist K, Sundquist J, et al. Metastatic sites and survival in lung cancer. *Lung Cancer*. 2014;86(1):78-84.
76. Rami-Porta R. Future Perspectives on the TNM Staging for Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(8):1940.
77. Detterbeck FC, Boffa DJ, Kim AW, Tanoue LT. The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. *Chest*. 2017;151(1):193-203.
78. Detterbeck FC, Chansky K, Groome P, Bolejack V, Crowley J, Shemanski L, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Methodology and Validation Used in the Development of Proposals for Revision of the Stage Classification of NSCLC in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2016;11(9):1433-46.
79. Chansky K, Detterbeck FC, Nicholson AG, Rusch VW, Vallières E, Groome P, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: External Validation of the Revision of the TNM Stage Groupings in the Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2017;12(7):1109-1121.
80. Abdel-Rahman O. Validation of the prognostic value of new sub-stages within the AJCC 8th edition of non-small cell lung cancer. *Clin Transl Oncol*. 2017;19(11):1414-1420.
81. Abdel-Rahman O. Assessment of the prognostic value of the 8th AJCC staging system for patients with clinically staged prostate cancer; A time to sub-classify stage IV? *PLoS One*. 2017;12(11):e0188450.
82. Tandberg DJ, Tong BC, Ackerson BG, Kelsey CR. Surgery versus stereotactic body radiation therapy for stage I non-small cell lung cancer: A comprehensive review. *Cancer*. 2018;124(4):667-678.
83. Ackerson BG, Tong BC, Hong JC, Gu L, Chino J, Trotter JW, et al. Stereotactic body radiation therapy versus sublobar resection for stage I NSCLC. *Lung Cancer*. 2018;125:185-191.
84. Koike T, Koike T, Yoshiya K, Tsuchida M, Toyabe S. Risk factor analysis of locoregional recurrence after sublobar resection in patients with clinical stage IA non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013;146(2):372-8.
85. Postmus PE, Kerr KM, Oudkerk M, Senan S, Waller DA, Vansteenkiste J, et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical

- Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28(suppl\_4):iv1-iv21.
86. PORT Meta-analysis Trialists Group. Postoperative radiotherapy in non-small-cell lung cancer: systematic review and meta-analysis of individual patient data from nine randomised controlled trials. PORT Meta-analysis Trialists Group. *Lancet*. 1998;352(9124):257-63.
  87. Kato H, Tsuboi M, Kato Y, Ikeda N, Okunaka T, Hamada C. Postoperative adjuvant therapy for completely resected early-stage non-small cell lung cancer. *Int J Clin Oncol*. 2005;10(3):157-64.
  88. Noda K, Nishiwaki Y, Kawahara M, Negoro S, Sugiura T, Yokoyama A, et al. Irinotecan plus cisplatin compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2002;346(2):85-91.
  89. Kenmotsu H, Yamamoto N, Yamanaka T, Yoshiya K, Takahashi T, Ueno T, et al. Randomized Phase III Study of Pemetrexed Plus Cisplatin Versus Vinorelbine Plus Cisplatin for Completely Resected Stage II to IIIA Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2020;38(19):2187-2196.
  90. Dai J, Jin K, Jiang G. Adjuvant Chemotherapy in Patients With Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 2021;7(4):636-637.
  91. Felip E, Altorki N, Zhou C, Csőszi T, Vynnychenko I, Goloborodko O, et al. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2021;398(10308):1344-1357.
  92. Romesser PB, Bardash Y, Buonocore D, Chaft JE, Huang J, Jones DR, et al. Outcomes of Stage III NSCLC with occult primary vs. known primary lesions. *Lung Cancer*. 2019;127:34-36.
  93. Watanabe SI, Nakagawa K, Suzuki K, Takamochi K, Ito H, Okami J, et al. Neoadjuvant and adjuvant therapy for Stage III non-small cell lung cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2017;47(12):1112-1118.
  94. Andre F, Grunenwald D, Pignon JP, Dujon A, Pujol JL, Brichon PY, et al. Survival of patients with resected N2 non-small-cell lung cancer: evidence for a subclassification and implications. *J Clin Oncol*. 2000;18(16):2981-9.
  95. Budak E, Yanarateş A, Akgün A. The prognostic role of PET/CT in small-cell lung cancer. *Rev Esp Med Nucl Imagen Mol (Engl Ed)*. 2020;39(1):9-13.

96. Jazieh AR, Zeitouni M, Alghamdi M, Alrujaib M, Lotfi S, Abu Daff S, et al. Management guidelines for stage III non-small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;157:103144.
97. Rusch VW. Stage III Non-small Cell Lung Cancer. *Semin Respir Crit Care Med*. 2016;37(5):727-735.
98. Myall NJ, Das M. Advances in the Treatment of Stage III Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Chest Med*. 2020;41(2):211-222
99. Sepesi B, Swisher SG. Role of neoadjuvant chemoimmunotherapy for resectable NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol*. 2022;19(8):497-498.
100. Forde PM, Spicer J, Lu S, Provencio M, Mitsudomi T, Awad MM, et al. Neoadjuvant Nivolumab plus Chemotherapy in Resectable Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2022;386(21):1973-1985.
101. Vokes EE, Green MR. Clinical studies in non-small cell lung cancer: the CALGB experience. *Cancer Invest*. 1998;16(2):72-9.
102. Yuen AR, Zou G, Turrisi AT, Sause W, Komaki R, Wagner H, et al. Similar outcome of elderly patients in intergroup trial 0096: Cisplatin, etoposide, and thoracic radiotherapy administered once or twice daily in limited stage small cell lung carcinoma. *Cancer*. 2000;89(9):1953-60.
103. Le Chevalier T, Arriagada R, Quoix E, Ruffie P, Martin M, Tarayre M, et al. Radiotherapy alone versus combined chemotherapy and radiotherapy in nonresectable non-small-cell lung cancer: first analysis of a randomized trial in 353 patients. *J Natl Cancer Inst*. 1991;83(6):417-23.
104. Hung MS, Wu YF, Chen YC. Efficacy of chemoradiotherapy versus radiation alone in patients with inoperable locally advanced non-small-cell lung cancer: A meta-analysis and systematic review. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(27):e16167.
105. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2017;377(20):1919-1929.
106. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1823-1833.
107. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based

- Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater. *J Clin Oncol.* 2019;37(7):537-546.
108. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;378(22):2078-2092.
109. Gadgeel S, Rodríguez-Abreu D, Speranza G, Esteban E, Felip E, Dómine M, et al. Updated Analysis From KEYNOTE-189: Pembrolizumab or Placebo Plus Pemetrexed and Platinum for Previously Untreated Metastatic Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 2020;38(14):1505-1517.
110. Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, Tafreshi A, Gümüş M, Mazières J, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(21):2040-2051.
111. Paz-Ares L, Vicente D, Tafreshi A, Robinson A, Soto Parra H, Mazières J, et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Pembrolizumab Plus Chemotherapy in Patients With Metastatic Squamous NSCLC: Protocol-Specified Final Analysis of KEYNOTE-407. *J Thorac Oncol.* 2020;15(10):1657-1669.
112. Weiss JM, Stinchcombe TE. Second-Line Therapy for Advanced NSCLC. *Oncologist.* 2013;18(8):947-53.
113. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(17):1627-39.
114. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373(2):123-35.
115. McCarthy EF. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J.* 2006;26:154-8.
116. Candeias SM, Gaipal US. The Immune System in Cancer Prevention, Development and Therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2016;16(1):101-7.
117. Becker Y. Molecular immunological approaches to biotherapy of human cancers-- a review, hypothesis and implications. *Anticancer Res.* 2006;26(2A):1113-34.
118. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;3(11):991-8.

119. Ishimura M, Ohga S. Cancer predisposition in inherited bone marrow failure syndromes and primary immunodeficiency diseases. *Rinsho Ketsueki*. 2019;60(6):702-707.
120. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol*. 2006;90:1-50.
121. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol*. 2006;90:51-81.
122. Rondon-Mercado R, Mogollon N, Bonfante-Cabarcas R, Perez-Aguilar MC, et al. Antígenos parasitarios de O-glicosilación incompleta: un enfoque inmunoterapéutico contra el cáncer. *Bol Mal Salud Amb*. 2014;54(1):8-19.
123. O'Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(3):151-167.
124. Saleh R, Elkord E. Acquired resistance to cancer immunotherapy: Role of tumor-mediated immunosuppression. *Semin Cancer Biol*. 2020;65:13-27.
125. Seliger B, Massa C. Immune Therapy Resistance and Immune Escape of Tumors. *Cancers (Basel)*. 2021;13(3):551.
126. Olivares-Hernández A, Figuero-Pérez L, Terán-Brage E, López-Gutiérrez Á, Velasco ÁT, Sarmiento RG, et al. Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors Secondary to Myeloid-Derived Suppressor Cells: A New Therapeutic Targeting of Haematological Malignancies. *J Clin Med*. 2021;10(9):1919.
127. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood*. 2018;131(1):58-67.
128. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res*. 2020;10(3):727-742.
129. Hosseini A, Gharibi T, Marofi F, Babaloo Z, Baradaran B. CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy. *Int Immunopharmacol*. 2020;80:106221.
130. Funt SA, Page DB, Wolchok JD, Postow MA. CTLA-4 antibodies: new directions, new combinations. *Oncology (Williston Park)*. 2014;28 Suppl 3:6-14.
131. Marangoni F, Zhakyp A, Corsini M, Geels SN, Carrizosa E, Thelen M, et al. Expansion of tumor-associated Treg cells upon disruption of a CTLA-4-dependent feedback loop. *Cell*. 2021;184(15):3998-4015.e19.
132. Yamaguchi T, Kishi A, Osaki M, Morikawa H, Prieto-Martin P, Wing K, et al. Construction of self-recognizing regulatory T cells from conventional T cells by

- controlling CTLA-4 and IL-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(23):E2116-25.
133. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(2):116-26.
134. Sury K, Perazella MA, Shirali AC. Cardiorenal complications of immune checkpoint inhibitors. *Nat Rev Nephrol*. 2018;14(9):571-588.
135. Ohue Y, Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci*. 2019;110(7):2080-2089.
136. Van Coillie S, Wiernicki B, Xu J. Molecular and Cellular Functions of CTLA-4. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1248:7-32.
137. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016;39(1):98-106.
138. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 1996;271(5256):1734-6.
139. Chen L, Ashe S, Brady WA, Hellström I, Hellström KE, Ledbetter JA, et al. Costimulation of antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. *Cell*. 1992;71(7):1093-102.
140. Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, et al. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med*. 1992;176(6):1595-604.
141. Kern R, Panis C. CTLA-4 Expression and Its Clinical Significance in Breast Cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2021;69(1):16.
142. Ribas A, Wolchok JD. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*. 2018;359(6382):1350-1355.
143. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol*. 2015;33(17):1974-82.
144. Arru C, De Miglio MR, Cossu A, Muroli MR, Carru C, Zinellu A, et al. Durvalumab Plus Tremelimumab in Solid Tumors: A Systematic Review. *Adv Ther*. 2021;38(7):3674-3693.
145. Ishida Y. PD-1: Its Discovery, Involvement in Cancer Immunotherapy, and Beyond. *Cells*. 2020;9(6):1376.
146. Ai L, Xu A, Xu J. Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1248:33-59.

147. Jiang Y, Chen M, Nie H, Yuan Y. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. *Hum Vaccin Immunother.* 2019;15(5):1111-1122.
148. Rotman J, den Otter LAS, Bleeker MCG, Samuels SS, Heeren AM, Roemer MGM, et al. PD-L1 and PD-L2 Expression in Cervical Cancer: Regulation and Biomarker Potential. *Front Immunol.* 2020;11:596825.
149. Kamada T, Togashi Y, Tay C, Ha D, Sasaki A, Nakamura Y, et al. PD-1+ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(20):9999-10008.
150. Bellmunt J, Powles T, Vogelzang NJ. A review on the evolution of PD-1/PD-L1 immunotherapy for bladder cancer: The future is now. *Cancer Treat Rev.* 2017;54:58-67.
151. Barclay J, Creswell J, León J. Cancer immunotherapy and the PD-1/PD-L1 checkpoint pathway. *Arch Esp Urol.* 2018;71(4):393-399.
152. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.* 2014;515(7528):568-71.
153. Wu X, Gu Z, Chen Y, Chen B, Chen W, Weng L, et al. Application of PD-1 Blockade in Cancer Immunotherapy. *Comput Struct Biotechnol J.* 2019;17:661-674.
154. Canavan M, Floudas A, Veale DJ, Fearon U. The PD-1:PD-L1 axis in Inflammatory Arthritis. *BMC Rheumatol.* 2021;5(1):1.
155. Im SJ, Hashimoto M, Gerner MY, Lee J, Kissick HT, Burger MC, et al. Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. *Nature.* 2016;537(7620):417-421.
156. Qin S, Xu L, Yi M, Yu S, Wu K, Luo S. Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Mol Cancer.* 2019;18(1):155.
157. Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity.* 2018;48(3):434-452.
158. Finkelmeier F, Waidmann O, Trojan J. Nivolumab for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2018;18(12):1169-1175.
159. Akinleye A, Rasool Z. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):92.

160. Sullivan RJ, Weber JS. Immune-related toxicities of checkpoint inhibitors: mechanisms and mitigation strategies. *Nat Rev Drug Discov.* 2022;21(7):495-508.
161. Mojsak D, Kuklińska B, Dębczyński M, Mróz RM. Immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer with ECOG PS 2. *Contemp Oncol (Pozn).* 2021;25(1):53-56.
162. Yang F, Markovic SN, Molina JR, Halfdanarson TR, Pagliaro LC, Chintakuntlawar AV, et al. Association of Sex, Age, and Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status With Survival Benefit of Cancer Immunotherapy in Randomized Clinical Trials: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Netw Open.* 2020;3(8):e2012534.
163. Mojsak D, Kuklińska B, Minarowski Ł, Mróz RM. Current state of knowledge on immunotherapy in ECOG PS 2 patients. A systematic review. *Adv Med Sci.* 2021;66(2):381-387.
164. Peng L, Wang Y, Liu F, Qiu X, Zhang X, Fang C, et al. Peripheral blood markers predictive of outcome and immune-related adverse events in advanced non-small cell lung cancer treated with PD-1 inhibitors. *Cancer Immunol Immunother.* 2020;69(9):1813-1822.
165. Pavan A, Calvetti L, Dal Maso A, Attili I, Del Bianco P, Pasello G, et al. Peripheral Blood Markers Identify Risk of Immune-Related Toxicity in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Immune-Checkpoint Inhibitors. *Oncologist.* 2019;24(8):1128-1136.
166. Zhou CB, Zhou YL, Fang JY. Gut Microbiota in Cancer Immune Response and Immunotherapy. *Trends Cancer.* 2021;7(7):647-660.
167. Lurienne L, Cervesi J, Duhalde L, de Gunzburg J, Andreumont A, Zalcman G, et al. NSCLC Immunotherapy Efficacy and Antibiotic Use: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Thorac Oncol.* 2020;15(7):1147-1159.
168. Lu PH, Tsai TC, Chang JW, Deng ST, Cheng CY. Association of prior fluoroquinolone treatment with survival outcomes of immune checkpoint inhibitors in Asia. *J Clin Pharm Ther.* 2021;46(2):408-414.
169. Dai Z, Zhang J, Wu Q, Fang H, Shi C, Li Z, et al. Intestinal microbiota: a new force in cancer immunotherapy. *Cell Commun Signal.* 2020;18(1):90.
170. Cristescu R, Mogg R, Ayers M, Albright A, Murphy E, Yearley J, et al. Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science.* 2018;362(6411):eaar3593.

- 171.Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, Swanton C, Quezada SA, Stenzinger A, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann Oncol.* 2019;30(1):44-56.
- 172.Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science.* 2015;348(6230):69-74.
- 173.Boyiadzis MM, Kirkwood JM, Marshall JL, Pritchard CC, Azad NS, Gulley JL. Significance and implications of FDA approval of pembrolizumab for biomarker-defined disease. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):35.
- 174.Chalabi M, Fanchi LF, Dijkstra KK, Van den Berg JG, Aalbers AG, Sikorska K, et al. Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers. *Nat Med.* 2020;26(4):566-576.
- 175.Li Z, Pearlman AH, Hsieh P. DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA Repair (Amst).* 2016;38:94-101.
- 176.Baretti M, Le DT. DNA mismatch repair in cancer. *Pharmacol Ther.* 2018;189:45-62.
- 177.André T, Shiu KK, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, et al. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 2020;383(23):2207-2218.
- 178.Kuol N, Stojanovska L, Nurgali K, Apostolopoulos V. PD-1/PD-L1 in disease. *Immunotherapy.* 2018;10(2):149-160.
- 179.Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, Abiko K, Baba T, Konishi I. PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. *Int J Clin Oncol.* 2016;21(3):462-73.
- 180.Shen X, Zhao B. Efficacy of PD-1 or PD-L1 inhibitors and PD-L1 expression status in cancer: meta-analysis. *BMJ.* 2018;362:k3529.
- 181.Doroshov DB, Bhalla S, Beasley MB, Sholl LM, Kerr KM, Gnjatic S, et al. PD-L1 as a biomarker of response to immune-checkpoint inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021;18(6):345-362
- 182.Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley MB, Borczuk AC, Botling J, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol.* 2018;13(9):1302-1311.
- 183.Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell.* 2015;27(4):450-61.

184. Pajens ST, Vledder A, de Bruyn M, Nijman HW. Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era. *Cell Mol Immunol*. 2021;18(4):842-859.
185. Wang S, Sun J, Chen K, Ma P, Lei Q, Xing S, et al. Perspectives of tumor-infiltrating lymphocyte treatment in solid tumors. *BMC Med*. 2021;19(1):140.
186. Zhao Y, Deng J, Rao S, Guo S, Shen J, Du F, et al. Tumor Infiltrating Lymphocyte (TIL) Therapy for Solid Tumor Treatment: Progressions and Challenges. *Cancers (Basel)*. 2022;14(17):4160.
187. Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, Rosenberg SA. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *J Immunother*. 2003;26(4):332-42.
188. Steven A, Fisher SA, Robinson BW. Immunotherapy for lung cancer. *Respirology*. 2016;21(5):821-33.
189. Kinoshita T, Terai H, Yaguchi T. Clinical Efficacy and Future Prospects of Immunotherapy in Lung Cancer. *Life (Basel)*. 2021;11(10):1029.
190. Liu F, Yuan X, Jiang J, Chu Q. Immunotherapy in advanced non-small-cell lung cancer with EGFR mutations. *Immunotherapy*. 2020;12(16):1195-1207.
191. Sankar K, Nagrath S, Ramnath N. Immunotherapy for ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer: Challenges Inform Promising Approaches. *Cancers (Basel)*. 2021;13(6):1476.
192. O'Donnell JS, Massi D, Teng MWL, Mandala M. PI3K-AKT-mTOR inhibition in cancer immunotherapy, redux. *Semin Cancer Biol*. 2018;48:91-103.
193. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10027):1540-1550.
194. Osmani L, Askin F, Gabrielson E, Li QK. Current WHO guidelines and the critical role of immunohistochemical markers in the subclassification of non-small cell lung carcinoma (NSCLC): Moving from targeted therapy to immunotherapy. *Semin Cancer Biol*. 2018;52(Pt 1):103-109.
195. Halvorsen AR, Silwal-Pandit L, Meza-Zepeda LA, Vodak D, Vu P, Sagerup C, et al. TP53 Mutation Spectrum in Smokers and Never Smoking Lung Cancer Patients. *Front Genet*. 2016;7:85.

196. Chapman AM, Sun KY, Ruestow P, Cowan DM, Madl AK. Lung cancer mutation profile of EGFR, ALK, and KRAS: Meta-analysis and comparison of never and ever smokers. *Lung Cancer*. 2016;102:122-134.
197. Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, Hellmann MD, Awad MM, Gainor JF, et al. STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer Discov*. 2018;8(7):822-835.
198. Nagano T, Tachihara M, Nishimura Y. Molecular Mechanisms and Targeted Therapies Including Immunotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2019;19(8):595-630.
199. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, Besse B, Helland Å, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017;18(10):1307-1316.
200. Pons-Tostivint E, Lugat A, Fontenau JF, Denis MG, Bennouna J. STK11/LKB1 Modulation of the Immune Response in Lung Cancer: From Biology to Therapeutic Impact. *Cells*. 2021;10(11):3129.
201. Pérez-Ramírez C, Cañadas-Garre M, Molina MÁ, Faus-Dáder MJ, Calleja-Hernández MÁ. PTEN and PI3K/AKT in non-small-cell lung cancer. *Pharmacogenomics*. 2015;16(16):1843-62.
202. Olivares-Hernández A, Del Barco Morillo E, Parra Pérez C, Miramontes-González JP, Figuero-Pérez L, Martín-Gómez T, et al. Influence of DNA Mismatch Repair (MMR) System in Survival and Response to Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs) in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Retrospective Analysis. *Biomedicines*. 2022;10(2):360.
203. Chae YK, Rhee K, Park LC, Cho A, Ko T, Chang S, et al. Immunologic and clinical implications of harboring mutations in mismatch repair (MMR) genes in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Cancer Res*. 2018;78(13\_Suppl):4608.
204. Mogi A, Kuwano H. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:583929.
205. Dong ZY, Zhong WZ, Zhang XC, Su J, Xie Z, Liu SY, et al. Potential Predictive Value of TP53 and KRAS Mutation Status for Response to PD-1 Blockade Immunotherapy in Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2017;23(12):3012-3024.

206. Assoun S, Theou-Anton N, Nguenang M, Cazes A, Danel C, Abbar B, et al. Association of TP53 mutations with response and longer survival under immune checkpoint inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2019;132:65-71.
207. Öjlert ÅK, Halvorsen AR, Nebdal D, Lund-Iversen M, Solberg S, Brustugun OT, et al. The immune microenvironment in non-small cell lung cancer is predictive of prognosis after surgery. *Mol Oncol*. 2019;13(5):1166-1179.
208. Xu C, Zhang ZH. Correlation between Programmed Death-1 Ligand-1 and p53 in Patients with Lung Adenocarcinoma. *Chin Med J (Engl)*. 2018;131(8):990-993.
209. Blagih J, Buck MD, Vousden KH. p53, cancer and the immune response. *J Cell Sci*. 2020;133(5):jcs237453.
210. Jiang M, Jia K, Wang L, Li W, Chen B, Liu Y, et al. Alterations of DNA damage response pathway: Biomarker and therapeutic strategy for cancer immunotherapy. *Acta Pharm Sin B*. 2021;11(10):2983-2994.
211. Maccaroni E, Lenci E, Agostinelli V, Cognigni V, Giampieri R, Mazzanti P, et al. Lynch syndrome-associated lung cancer: pitfalls of an immunotherapy-based treatment strategy in an unusual tumor type. *Explor Target Antitumor Ther*. 2021;2(3):240-248.
212. Yanagawa N, Yamada N, Sugimoto R, Osakabe M, Uesugi N, Shiono S, et al. The Frequency of DNA Mismatch Repair Deficiency Is Very Low in Surgically Resected Lung Carcinoma. *Front Oncol*. 2021;11:752005.
213. Viale G, Trapani D, Curigliano G. Mismatch Repair Deficiency as a Predictive Biomarker for Immunotherapy Efficacy. *Biomed Res Int*. 2017;2017:4719194.
214. Zhao P, Li L, Jiang X, Li Q. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. *J Hematol Oncol*. 2019;12(1):54.
215. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-24.
216. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. 2007;446(7132):153-8.
217. Tan WCC, Nerurkar SN, Cai HY, Ng HHM, Wu D, Wee YTF, et al. Overview of multiplex immunohistochemistry/immunofluorescence techniques in the era of cancer immunotherapy. *Cancer Commun (Lond)*. 2020;40(4):135-153.

218. Verma M, Kulshrestha S, Puri A. Genome Sequencing. *Methods Mol Biol.* 2017;1525:3-33.
219. Kumar KR, Cowley MJ, Davis RL. Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Semin Thromb Hemost.* 2019;45(7):661-673.
220. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 2005;42(4):405-26.
221. De Smet F, Antoranz Martinez A, Bosisio FM. Next-Generation Pathology by Multiplexed Immunohistochemistry. *Trends Biochem Sci.* 2021;46(1):80-82.
222. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol.* 2019;1897:299-311.
223. Shia J, Klimstra DS, Li AR, Qin J, Saltz L, Teruya-Feldstein J, et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Mod Pathol.* 2005;18(10):1350-6.
224. Yu H, Boyle TA, Zhou C, Rimm DL, Hirsch FR. PD-L1 Expression in Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2016;11(7):964-75.
225. Zheng Q, Gan G, Gao X, Luo Q, Chen F. Targeting the IDO-BCL2A1-Cytochrome c Pathway Promotes Apoptosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Onco Targets Ther.* 2021;14:1673-1687.
226. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013;98(6):236-8.
227. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018;122(1):e59.
228. van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 2014;30(9):418-26.
229. Filippini SE, Vega A. Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2013;18(4):1358-72.
230. Jelin AC, Vora N. Whole Exome Sequencing: Applications in Prenatal Genetics. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2018;45(1):69-81.
231. Ng PC, Kirkness EF. Whole genome sequencing. *Methods Mol Biol.* 2010;628:215-26.
232. Owens NDL, De Domenico E, Gilchrist MJ. An RNA-Seq Protocol for Differential Expression Analysis. *Cold Spring Harb Protoc.* 2019;2019(6).

233. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-20.
234. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010;26(5):589-95.
235. Van der Auwera GA & O'Connor BD. (2020). *Genomics in the Cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra* (1st Edition). O'Reilly Media.
236. Geoffroy V, Pizot C, Redin C, Piton A, Vasli N, Stoetzel C, et al. VaRank: a simple and powerful tool for ranking genetic variants. *PeerJ*. 2015;3:e796.
237. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in humans. *Nature*. 2020;581(7809):434-443.
238. Ortiz Hidalgo C. Immunohistochemistry in Historical Perspective: Knowing the Past to Understand the Present. *Methods Mol Biol*. 2022;2422:17-31.
239. Sukswai N, Khoury JD. Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection. *Curr Hematol Malig Rep*. 2019;14(5):368-375.
240. Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol*. 2016;17(12):e542-e551.
241. Tan AC, Lai GGY, Tan GS, Poon SY, Doble B, Lim TH, et al. Utility of incorporating next-generation sequencing (NGS) in an Asian non-small cell lung cancer (NSCLC) population: Incremental yield of actionable alterations and cost-effectiveness analysis. *Lung Cancer*. 2020;139:207-215.
242. Lin C, Liu X, Zheng B, Ke R, Tzeng CM. Liquid Biopsy, ctDNA Diagnosis through NGS. *Life (Basel)*. 2021;11(9):890.
243. Lin C, Shi X, Yang S, Zhao J, He Q, Jin Y, et al. Comparison of ALK detection by FISH, IHC and NGS to predict benefit from crizotinib in advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2019;131:62-68.
244. Niu X, Chuang JC, Berry GJ, Wakelee HA. Anaplastic Lymphoma Kinase Testing: IHC vs. FISH vs. NGS. *Curr Treat Options Oncol*. 2017;18(12):71.
245. Mederos N, Friedlaender A, Peters S, Addeo A. Gender-specific aspects of epidemiology, molecular genetics and outcome: lung cancer. *ESMO Open*. 2020;5(Suppl 4):e000796.
246. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell

- lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2017;389(10066):255-265.
247. Brody R, Zhang Y, Ballas M, Siddiqui MK, Gupta P, Barker C, et al. PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. *Lung Cancer*. 2017;112:200-215.
248. Socinski MA, Obasaju C, Gandara D, Hirsch FR, Bonomi P, Bunn PA Jr, et al. Current and Emergent Therapy Options for Advanced Squamous Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol*. 2018;13(2):165-183.
249. Tlemsani C, Takahashi N, Pongor L, Rajapakse VN, Tyagi M, Wen X, et al. Whole-exome sequencing reveals germline-mutated small cell lung cancer subtype with favorable response to DNA repair-targeted therapies. *Sci Transl Med*. 2021;13(578):eabc7488.
250. Newell F, Kong Y, Wilmott JS, Johansson PA, Ferguson PM, Cui C, et al. Whole-genome landscape of mucosal melanoma reveals diverse drivers and therapeutic targets. *Nat Commun*. 2019;10(1):3163.
251. Haratani K, Hayashi H, Chiba Y, Kudo K, Yonesaka K, Kato R, et al. Association of Immune-Related Adverse Events With Nivolumab Efficacy in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 2018;4(3):374-378.
252. Horn L, Spigel DR, Vokes EE, Holgado E, Ready N, Steins M, et al. Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: Two-Year Outcomes From Two Randomized, Open-Label, Phase III Trials (CheckMate 017 and CheckMate 057). *J Clin Oncol*. 2017;35(35):3924-3933.
253. Köbel M, Ronnett BM, Singh N, Soslow RA, Gilks CB, McCluggage WG. Interpretation of P53 Immunohistochemistry in Endometrial Carcinomas: toward Increased Reproducibility. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2019; 38:S123–S131.
254. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih IM, et al. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Modern Pathology*. 2011; 24: 1248–1253.
255. Michel M, Kaps L, Maderer A, Galle PR, Moehler M. The Role of p53 Dysfunction in Colorectal Cancer and Its Implication for Therapy. *Cancers*. 2021; 13: 2296.

- 256.Sun H, Liu S, Zhou J, Xu J, Zhang H, Yan H, et al. Specific TP53 subtype as biomarker for immune checkpoint inhibitors in lung adenocarcinoma. *EBioMedicine*. 2020; 60: 102990.
- 257.Xiao Y, Chen J, Zhou H, Zeng X, Ruan Z, Pu Z, et al. Combining p53 mRNA nanotherapy with immune checkpoint blockade reprograms the immune microenvironment for effective cancer therapy. *Nat Commun*. 2022;13(1):758.
- 258.Fernandez-Pol S, Ma L, Ohgami RS, Arber DA. Immunohistochemistry for p53 is a useful tool to identify cases of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes that are TP53 mutated, have complex karyotype, and have poor prognosis. *Modern Pathology*. 2017; 30: 382–392.
- 259.Kang EY, Cheasley D, LePage C, Wakefield MJ, da Cunha Torres M, Rowley S, et al. Refined cut-off for TP53 immunohistochemistry improves prediction of TP53 mutation status in ovarian mucinous tumors: implications for outcome analyses. *Modern Pathology*. 2021; 34: 194–206.
- 260.Xinarianos G, Scott FM, Liloglou T, Prime W, Callaghan J, Gosney JR, et al. Telomerase activity in non-small cell lung carcinomas correlates with smoking status. *Int J Oncol*. 1999;15(5):961-5.
- 261.Hsu KH, Ho CC, Hsia TC, Tseng JS, Su KY, Wu MF, et al. Identification of five driver gene mutations in patients with treatment-naïve lung adenocarcinoma in Taiwan. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120852.
- 262.Haratani K, Hayashi H, Chiba Y, Kudo K, Yonesaka K, Kato R, et al. Association of Immune-Related Adverse Events With Nivolumab Efficacy in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol*. 2018;4(3):374-378.
- 263.Johann DJ Jr, Steliga M, Shin IJ, Yoon D, Arnaoutakis K, Hutchins L, et al. Liquid biopsy and its role in an advanced clinical trial for lung cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018;243(3):262-271.
- 264.Meng X, Huang Z, Teng F, Xing L, Yu J. Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(10):868-76.
- 265.Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, Zurawski B, Kim SW, Carcereny Costa E, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2019;381(21):2020-2031.
- 266.Banchereau R, Leng N, Zill O, Sokol E, Liu G, Pavlick D, et al. Molecular determinants of response to PD-L1 blockade across tumor types. *Nat Commun*. 2021;12(1):3969.

267. Gadgeel SM, Wozniak A. Preclinical rationale for PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors as therapy for epidermal growth factor receptor inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2013;14(4):322-32.
268. Felder M, Kapur A, Gonzalez-Bosquet J, Horibata S, Heintz J, Albrecht R, et al. MUC16 (CA125): tumor biomarker to cancer therapy, a work in progress. *Mol Cancer*. 2014;13:129.
269. Johnson MD, Vito F, Xu H. MUC16 expression and risk of adenocarcinoma metastases to peritoneum, pleura, leptomeninges, and brain. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010;18(3):250-3.
270. Chen Y, Huang Y, Kanwal M, Li G, Yang J, Niu H, et al. MUC16 in non-small cell lung cancer patients affected by familial lung cancer and indoor air pollution: clinical characteristics and cell behaviors. *Transl Lung Cancer Res*. 2019;8(4):476-488.
271. Wang Z, Hou H, Zhang H, Duan X, Li L, Meng L. Effect of MUC16 mutations on tumor mutation burden and its potential prognostic significance for cutaneous melanoma. *Am J Transl Res*. 2022;14(2):849-862.
272. Zhang L, Han X, Shi Y. Association of MUC16 Mutation With Response to Immune Checkpoint Inhibitors in Solid Tumors. *JAMA Netw Open*. 2020;3(8):e2013201.
273. Na F, Pan X, Chen J, Chen X, Wang M, Chi P, et al. KMT2C deficiency promotes small cell lung cancer metastasis through DNMT3A-mediated epigenetic reprogramming. *Nat Cancer*. 2022;3(6):753-767.
274. Liu C, Duan Q, Zhang Q. Association of KMT2C mutations with favorable outcomes with immune checkpoint inhibitors across multiple tumor types. *J Clin Oncol (Suppl 15)*. 2021;39:2600-2600.
275. Villanueva L, Álvarez-Errico D, Esteller M. The Contribution of Epigenetics to Cancer Immunotherapy. *Trends Immunol*. 2020;41(8):676-691.
276. Hellmann MD, Jänne PA, Opyrchal M, Hafez N, Raez LE, Gabrilovich DI, et al. Entinostat plus Pembrolizumab in Patients with Metastatic NSCLC Previously Treated with Anti-PD-(L)1 Therapy. *Clin Cancer Res*. 2021;27(4):1019-1028.
277. Pi YN, Qi WC, Xia BR, Lou G, Jin WL. Long Non-Coding RNAs in the Tumor Immune Microenvironment: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Front Immunol*. 2021;12:697083.

- 278.Zhang L, Xu X, Su X. Noncoding RNAs in cancer immunity: functions, regulatory mechanisms, and clinical application. *Mol Cancer*. 2020;19(1):48.
- 279.Ikeda H, Togashi Y. Aging, cancer, and antitumor immunity. *Int J Clin Oncol*. 2022;27(2):316-322.
- 280.Arang N, Gutkind JS. G Protein-Coupled receptors and heterotrimeric G proteins as cancer drivers. *FEBS Lett*. 2020;594(24):4201-4232.
- 281.Wu V, Yeerna H, Nohata N, Chiou J, Harismendy O, Raimondi F, et al. Illuminating the Onco-GPCRome: Novel G protein-coupled receptor-driven oncocrine networks and targets for cancer immunotherapy. *J Biol Chem*. 2019;294(29):11062-11086.
- 282.Zhang S, Wang H, Liu J, Tao T, Zeng Z, Wang M. RGS1 and related genes as potential targets for immunotherapy in cervical cancer: computational biology and experimental validation. *J Transl Med*. 2022;20(1):334.
- 283.Fernández-Lázaro D, García Hernández JL, García AC, Córdova Martínez A, Mielgo-Ayuso J, Cruz-Hernández JJ. Liquid Biopsy as Novel Tool in Precision Medicine: Origins, Properties, Identification and Clinical Perspective of Cancer's Biomarkers. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(4):215.
- 284.Li YJ, Lei YH, Yao N, Wang CR, Hu N, Ye WC, et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin J Cancer*. 2017;36(1):52.
- 285.Ferro F, Servais S, Besson P, Roger S, Dumas JF, Brisson L. Autophagy and mitophagy in cancer metabolic remodelling. *Semin Cell Dev Biol*. 2020;98:129-138.
- 286.Zhong Y, Long T, Gu CS, Tang JY, Gao LF, Zhu JX, et al. MYH9-dependent polarization of ATG9B promotes colorectal cancer metastasis by accelerating focal adhesion assembly. *Cell Death Differ*. 2021;28(12):3251-3269.
- 287.Yun EJ, Kim S, Hsieh JT, Baek ST. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway induces autophagy-mediated temozolomide-resistance in human glioblastoma. *Cell Death Dis*. 2020;11(9):771.
- 288.Sun Z, Wang Z, Liu X, Wang D. New development of inhibitors targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in personalized treatment of non-small-cell lung cancer. *Anticancer Drugs*. 2015;26(1):1-14.
- 289.Tan AC. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Thorac Cancer*. 2020;11(3):511-518.

290. Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, Alfieri RR. Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol.* 2014;90(3):197-207.
291. Roper N, Velez MJ, Chiappori A, Kim YS, Wei JS, Sindiri S, et al. Notch signaling and efficacy of PD-1/PD-L1 blockade in relapsed small cell lung cancer. *Nat Commun.* 2021;12(1):3880.
292. Li X, Wang Y, Li X, Feng G, Hu S, Bai Y. The Impact of NOTCH Pathway Alteration on Tumor Microenvironment and Clinical Survival of Immune Checkpoint Inhibitors in NSCLC. *Front Immunol.* 2021;12:638763.
293. Lind H, Gameiro SR, Jochems C, Donahue RN, Strauss J, Gulley JL, et al. Dual targeting of TGF- $\beta$  and PD-L1 via a bifunctional anti-PD-L1/TGF- $\beta$ R2 agent: status of preclinical and clinical advances. *J Immunother Cancer.* 2020;8(1):e000433.
294. Gulley JL, Schlom J, Barcellos-Hoff MH, Wang XJ, Seoane J, Audhuy F, et al. Dual inhibition of TGF- $\beta$  and PD-L1: a novel approach to cancer treatment. *Mol Oncol.* 2022;16(11):2117-2134.
295. Pecoraro A, Pagano M, Russo G, Russo A. Ribosome Biogenesis and Cancer: Overview on Ribosomal Proteins. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11):5496.
296. Braal CL, Jongbloed EM, Wilting SM, Mathijssen RHJ, Koolen SLW, Jager A. Inhibiting CDK4/6 in Breast Cancer with Palbociclib, Ribociclib, and Abemaciclib: Similarities and Differences. *Drugs.* 2021;81(3):317-331.
297. Schaer DA, Beckmann RP, Dempsey JA, Huber L, Forest A, Amaladas N, et al. The CDK4/6 Inhibitor Abemaciclib Induces a T Cell Inflamed Tumor Microenvironment and Enhances the Efficacy of PD-L1 Checkpoint Blockade. *Cell Rep.* 2018;22(11):2978-2994.
298. Vikas P, Borcherding N, Chennamadhavuni A, Garje R. Therapeutic Potential of Combining PARP Inhibitor and Immunotherapy in Solid Tumors. *Front Oncol.* 2020;10:570.
299. Gray JE, Owonikoko TK, Kato T, Nadal E, Greystoke A, Cardona AF, et al. 1418TiP Randomized, placebo-controlled phase III study of 1L pembrolizumab (Pembro) plus carboplatin/taxane followed by pembro with or without maintenance olaparib in patients (Pts) with metastatic squamous non-small cell lung cancer (sqNSCLC): KEYLYNK-008. *Ann Oncol.* 2020; 31(Suppl4):S896.

300. Shen M, Qi R, Ren J, Lv D, Yang H. Characterization With KRAS Mutant Is a Critical Determinant in Immunotherapy and Other Multiple Therapies for Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Oncol.* 2022;11:780655.
301. Aredo JV, Padda SK, Kunder CA, Han SS, Neal JW, Shrager JB, et al. Impact of KRAS mutation subtype and concurrent pathogenic mutations on non-small cell lung cancer outcomes. *Lung Cancer.* 2019;133:144-150.
302. Qian X, Liu X, Zhu Z, Wang S, Song X, Chen G, et al. Variants in LAMC3 Causes Occipital Cortical Malformation. *Front Genet.* 2021;12:616761.
303. Kasper BS, Kraus C, Schwarz M, Rösch J, Thiel CT, Reis A, et al. A novel splice variant expands the LAMC3-associated cortical phenotype to frontal only polymicrogyria and adult-onset epilepsy. *Am J Med Genet A.* 2020;182(11):2761-2764.
304. He YH, Deng YS, Peng PX, Wang N, Wang JF, Ding ZS, et al. A novel messenger RNA and long noncoding RNA signature associated with the progression of nonmuscle invasive bladder cancer. *J Cell Biochem.* 2018 Nov 13.
305. Cao J, Yang CH, Han WQ, Xie Y, Liu ZZ, Jiang SS. Correlation Between the Evolution of Somatic Alterations During Lymphatic Metastasis and Clinical Outcome in Penile Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2021;11:641869.
306. Lei SM, Liu X, Xia LP, Ke Y, Wei LW, Li L, et al. Relationships between decreased LAMC3 and poor prognosis in ovarian cancer. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2021;56(7):489-497.
307. Lesseur C, Diergaarde B, Olshan AF, Wünsch-Filho V, Ness AR, Liu G, et al. Genome-wide association analyses identify new susceptibility loci for oral cavity and pharyngeal cancer. *Nat Genet.* 2016;48(12):1544-1550.
308. Taki M, Abiko K, Ukita M, Murakami R, Yamanoi K, Yamaguchi K, et al. Tumor Immune Microenvironment during Epithelial-Mesenchymal Transition. *Clin Cancer Res.* 2021;27(17):4669-4679.
309. Jiang Y, Zhan H. Communication between EMT and PD-L1 signaling: New insights into tumor immune evasion. *Cancer Lett.* 2020;468:72-81.
310. Erin N, Grahovac J, Brozovic A, Efferth T. Tumor microenvironment and epithelial mesenchymal transition as targets to overcome tumor multidrug resistance. *Drug Resist Updat.* 2020;53:100715.
311. Robin NH, Moran RT, Ala-Kokko L. Stickler Syndrome. 2000 Jun 9 [updated 2021 May 6]. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean

- LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2022.
312. Nixon TRW, Alexander P, Richards A, McNinch A, Bearcroft PWP, Cobben J, et al. Homozygous Type IX collagen variants (COL9A1, COL9A2, and COL9A3) causing recessive Stickler syndrome-Expanding the phenotype. *Am J Med Genet A*. 2019;179(8):1498-1506.
313. Markova T, Sparber P, Borovikov A, Nagornova T, Dadali E. Clinical and genetic characterization of autosomal recessive stickler syndrome caused by novel compound heterozygous mutations in the COL9A3 gene. *Mol Genet Genomic Med*. 2021;9(3):e1620.
314. Fan B, Dachrut S, Coral H, Yuen ST, Chu KM, Law S, et al. Integration of DNA copy number alterations and transcriptional expression analysis in human gastric cancer. *PLoS One*. 2012;7(4):e29824.
315. Wu W, Warner M, Wang L, He WW, Zhao R, Guan X, et al. Drivers and suppressors of triple-negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(33):e2104162118.
316. Liu M, Li F, Liu B, Jian Y, Zhang D, Zhou H, et al. Profiles of immune cell infiltration and immune-related genes in the tumor microenvironment of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Med Genomics*. 2021;14(1):75.
317. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
318. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 2022;12(1):31-46.
319. Fernández-Lázaro D, Hernández JLG, García AC, Castillo ACD, Hueso MV, Cruz-Hernández JJ. Clinical Perspective and Translational Oncology of Liquid Biopsy. *Diagnostics (Basel)*. 2020;10(7):443.
320. Isoyama S, Mori S, Sugiyama D, Kojima Y, Tada Y, Shitara K, et al. Cancer immunotherapy with PI3K and PD-1 dual-blockade via optimal modulation of T cell activation signal. *J Immunother Cancer*. 2021;9(8):e002279.



**ANEXOS**





Article

## Influence of DNA Mismatch Repair (MMR) System in Survival and Response to Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs) in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Retrospective Analysis

Alejandro Olivares-Hernández<sup>1,2,\*</sup>, Edel del Barco Morillo<sup>1,2,3</sup>, Carmen Parra Pérez<sup>3,4,\*</sup>, José Pablo Miramontes-González<sup>5,6</sup>, Luis Figuero-Pérez<sup>1,2</sup>, Teresa Martín-Gómez<sup>1,2,3</sup>, Roberto Escala-Cornejo<sup>7</sup>, Lorena Bellido Hernández<sup>1,2</sup>, Rogelio González Sarmiento<sup>2,3</sup>, Juan Jesús Cruz-Hernández<sup>1,2,3,†</sup> and María Dolores Ludeña de la Cruz<sup>3,4,†</sup>



Citation: Olivares-Hernández, A.; del Barco Morillo, E.; Parra Pérez, C.; Miramontes-González, J.P.; Figuero-Pérez, L.; Martín-Gómez, T.; Escala-Cornejo, R.; Bellido Hernández, L.; González Sarmiento, R.; Cruz-Hernández, J.J.; et al. Influence of DNA Mismatch Repair (MMR) System in Survival and Response to Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs) in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Retrospective Analysis. *Biomedicines* 2022, 10, 360. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10020360>

Academic Editor: Satoshi Wada

Received: 27 December 2021

Accepted: 27 January 2022

Published: 2 February 2022

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



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Department of Medical Oncology, University Hospital of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; ebarco@saludcastillayleon.es (E.d.B.M.); lfiguero@saludcastillayleon.es (L.F.-P.); mtmartingo@saludcastillayleon.es (T.M.-G.); lbellido@saludcastillayleon.es (L.B.H.); jjcruz@usal.es (J.J.C.-H.)
  - <sup>2</sup> Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), 37007 Salamanca, Spain; gonzalez@usal.es
  - <sup>3</sup> Department of Medicine, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; mdludena@saludcastillayleon.es
  - <sup>4</sup> Department of Pathology, University Hospital of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain
  - <sup>5</sup> Department of Internal Medicine, University Hospital Rio Hortega, 47012 Valladolid, Spain; jpmiramontes@hotmail.com
  - <sup>6</sup> Department of Medicine, University of Valladolid, 45005 Valladolid, Spain
  - <sup>7</sup> Instituto de Investigación Nacional (SOLCA) de Guayaquil, Guayaquil 090514, Ecuador; roberto.a.escala@solca.med.ec
- \* Correspondence: aolivares@saludcastillayleon.es (A.O.-H.); mcparra@saludcastillayleon.es (C.P.P.); Tel.: +34-923-29-11-00 (A.O.-H. & C.P.P.); Fax: +34-923-29-13-25 (A.O.-H. & C.P.P.)  
† Co-senior authorship.

**Abstract:** Mutations in the mismatch repair (MMR) system predict the response to immune checkpoint inhibitors (ICIs) like colon or gastric cancer. However, the MMR system's involvement in non-small cell lung cancer (NSCLC) remains unknown. Addressing this issue will improve clinical guidelines in the case of mutations in the main genes of the MMR system (MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2). This work retrospectively assessed the role that these gene mutations play in the response to and survival of ICIs in NSCLC. Patients with NSCLC treated with nivolumab as the second-line treatment in the University Hospital of Salamanca were enrolled in this study. Survival and response analyses were performed according to groups of MMR system gene expression (MMR expression present or deficiency) and other subgroups, such as toxicity. There was a statistically significant relationship between the best response obtained and the expression of the MMR system ( $p = 0.045$ ). The presence of toxicity grade  $\geq 3$  was associated with the deficiency expression of MMR (dMMR/MSI-H) group ( $p = 0.022$ ; odds ratio = 10.167, 95% confidence interval (CI) 1.669–61.919). A trend towards greater survival and response to ICIs was observed in NSCLC and dMMR. Assessing the genes in the MMR system involved in NSCLC is key to obtaining personalized immunotherapy treatments.

**Keywords:** MMR system; immunotherapy; ICIs; NSCLC; dMMR/MSI-H; survival; response

### 1. Introduction

Immunotherapy has now revolutionized the treatment of solid tumors, especially since the introduction of ipilimumab, the first drug approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 2011 for the treatment of advanced unresectable melanoma [1]. Immune checkpoint inhibitors (ICIs) have increased survival rates for non-small cell lung cancer (NSCLC) by up to 20–30% to five years, where previously the overall survival rates (OS) did not reach beyond 12–18 months [2]. However, one of the current challenges in oncology is the search for patients with long responses to immunotherapy, which would

allow for precision medicine and higher numbers of long-term survivors. The discovery of different predictive biomarkers that respond to ICIs will revolutionize precision medicine. Different genomic predictive biomarkers, such as the KRAS, TP53, or STK11 genes, have been studied in this field with contradictory results [3–5]. Currently, one of the most promising avenues for the treatment of solid tumors and the most unknown element of NSCLC is the mismatch repair (MMR) system genes.

Around 4–5% of NSCLCs show alterations in the genes that make up the MMR system (deficiency of expression, dMMR/MSI-H) [6]. The MMR system is one of the most important guardians of genomic integrity. It improves the fidelity of DNA replication, aborts illegitimate recombination, and affects the outcome of several other processes of DNA metabolism. The malfunction of MMR gives rise to a mutator phenotype and microsatellite instability [7]. The role of MMR system defects in the response to immunotherapy is well known and has been widely studied in different tumors, mainly at the gastrointestinal (GI) tract level [8]. Different studies based on patient series or retrospective analysis have shown that the deficiency expression of MSH2 or MLH1 in lung adenocarcinomas has been associated with poor survival of these patients due to resistance to immunotherapy [9]. The deficiency of this repair system has been observed to be more significant in tumors of the adenocarcinoma or squamous cell lineages compared to a microcytic histology. In most cases, the silencing of the genes of the MMR system is due to epigenetic alterations and not so much to mutations [10].

Mutations of MMR genes have been associated with mutations of the KRAS or EGFR genes in NSCLC patients; however, this association has not translated into a prognostic or predictive implication on the response to chemotherapy or immunotherapy [11]. No studies have assessed the relationship between NSCLC and dMMR/MSI-H tumors' response to immunotherapy. There are only data based on single case reports or case series and other data based on extrapolations from larger studies that included more tumors, such as studies conducted by Zhao et al. [6] and Viale et al. [9].

Therefore, although the MMR system and its implications for immunotherapy for NSCLC have not been clearly studied, this work assumes that, as in other tumors, such as colon cancer, its presence is a favorable predictive factor for response to these treatments. Therefore, immunotherapy may be considered in a previous line to the foreseen or in patients with conductive mutations [12]. Future studies can determine how the presence of these alterations in the MMR genes can affect immunotherapy for NSCLC. As such, the objective of this work is to evaluate mutations in the MMR system and their effects on the response to immunotherapy for NSCLC and subsequent survival.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Data Collection and Construction of the Cohort

A retrospective hospital-based study was carried out on selected patients treated at the Department of Medical Oncology in the Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (Salamanca, Spain). The inclusion criteria were as follows:

- Patients diagnosed with advanced or metastatic NSCLC.
- The patients must have received treatment with ICIs (Nivolumab) between 2015 and 2021.
- Second-line immunotherapy treatment with an anti-PD1 drug (nivolumab independent of PD-L1 expression in the tumor, according to clinical trials CheckMate 017 and CheckMate 057) [13,14].
- The existence of adequate samples from each patient in the Pathology Department of de University Hospital of Salamanca for IHC analysis.
- Patients over 18 years with full mental faculties who received and signed the informed consent for inclusion in the research project. After the age of 18, there is no age limit.
- Patients had to present an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 0-1.

The exclusion criteria were as follows:

- Refusal for inclusion in the research project by the patient or if age under 18 years old.

- Small cell lung cancer.
- First-line treatment with immunotherapy.
- No sample of primary tumor.
- ECOG  $\geq 2$

The fundamental data collected and studied were age (years), sex, histology, sites of metastases, progression-free survival (PFS) in months, overall survival (OS) in months, number of doses received, and the best response obtained with immunotherapy and immunotoxicity. The study was carried out according to the ethical protocols of the hospital and after obtaining informed consent from patients for the extraction of the samples. The patients signed informed consent that allowed the study of their primary tumor samples for different research purposes, as was done later this study. If the information found in this study is favourable for inclusion in immunotherapy treatment regimens, it will be included in the NSCLC treatment protocols of the Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

Subsequently, the previous data were analyzed together with the expression data of the MMR system for the MLH1, MSH2, MSH6, and PM2 genes. An analysis of survival and response was carried out in patients based on the mutations found in the four previous genes. The patients were subdivided by positive or negative PD-L1 expression (this subdivision was made because it is the most widely used in clinical trials for NSCLC and second-line immunotherapy, such as the CheckMate 017 and CheckMate 057 trials). To carry out this classification of patients, we relied on published clinical trials of second-line immunotherapy, in which the main factor for dividing the subgroups was the positive or negative expression of PD-L1.

## 2.2. Analysis of MMR System Expression by IHC

The expression analysis of the MMR system was performed with the peroxidase anti-peroxidase immunohistochemistry (IHC) technique using Leica BOND Polymer development kits (Buffalo Grove, IL 60089 United States). Leica BOND III automatic machines (Buffalo Grove, IL 60089 United States) were subsequently used. We carried out a semi-quantitative study via analysis at 10 fields of 20 $\times$ . The samples were evaluated by two independent doctors to avoid bias. Microscopic analysis was carried out with Nikon Eclipse Ci microscopy equipment. All of the samples analyzed by IHC were from NSCLC primary tumors, and were carried out during the year 2020 after collecting data from all patients.

## 2.3. Statistical Analysis

For the statistical analysis, PFS was first calculated as the months from the initiation of immunotherapy treatment to the clinical or radiological progression. OS was calculated as the period (in months) from the initiation of the patient's immunotherapy treatment until death. Survival rates were calculated as medians with 95% confidence intervals (CIs). Survival and response as functions of MMR expression were calculated using the Kaplan–Meier method (log rank and Breslow test), Cox regression analysis, and chi-squared distribution. Subgroup analyses were performed for sex, histology, and the expression of PD-L1 to avoid confounding factors. All survival data are expressed as medians. The statistical significance for the analyses in this study was established at  $p < 0.05$ . The software used was SPSS version 25 (IBM).

## 3. Results

### 3.1. General Analysis of the Sample

A total of 73 NSCLC samples were studied (Table 1). The median age of the patients was 68 years (44–84). There were 59 males (80.8%) and 14 females (19.2%). The most frequent histology was adenocarcinoma in 36 patients (49.3%), followed by squamous cell cancer in 34 patients (46.6%). The most frequent sites of metastatic involvement were the lung (45 patients, 61.6%) and lymph nodes (39 patients, 53.4%), followed by the bone (14 patients, 19.2%) and liver (10 patients, 13.7%). The PD-L1 expression was negative (0%) in 27 patients and positive ( $\geq 1\%$ ) in 46 patients. Loss of expression of the repair genes

was observed in 6 of the 73 patients analyzed (8.2%). In the six patients in whom the loss of expression was observed, the affected gene was PMS2. In addition, for one patient, a double loss of expression was observed as a deficit in MLH1 and PMS2. In the total sample, no driver mutations were found.

**Table 1.** General characteristics of the sample. The table shows the demographic variables of the study population of patients with advanced or metastatic NSCLC under treatment with immunotherapy at the Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

Sample	Overall, 73 (100%)	MMR Present, 67 (91.8%)	MMR Deficiency, 6 (8.2%)
Age	68 (44–84)	68 (44–84)	67 (54–79)
Sex (M/W)	59/14 (80.8/19.2%)	53/14 (79.1/20.9%)	6/0 (100/0%)
Subtype			
• ADC	36 (49.3%)	32 (47.8%)	4 (66.7%)
• Squamous	34 (46.6%)	32 (47.8%)	2 (33.3%)
• Undifferentiated	3 (4.1%)	3 (4.5%)	0 (0%)
PD-L1			
• Negative	27 (37%)	25 (37.3%)	3 (50%)
• Positive	46 (63%)	42 (62.7%)	3 (50%)
Driver mutations			
• EGFR, ALK, or ROS1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Survival (months)			
• Overall	13 (95% CI 8.2–17.8)	12 (95% CI 4–20)	14 (95% CI 4.5–23.5)
• Progression free	5 (95% CI 3.8–6.2)	4 (95% CI 3–5)	8 (95% CI 2–14)
Response			
• Progression or death	40 (54.8%)	39 (58.2%)	1 (16.7%)
• Stabilisation	16 (21.9%)	12 (17.9%)	4 (66.7%)
• Partial response	13 (17.8%)	12 (17.9%)	1 (16.7%)
• Complete response	4 (5.4%)	4 (6%)	0 (0%)
Toxicity			
• Not observed	47 (64.4%)	45 (67.2%)	2 (33.3%)
• Asthenia	12 (16.4%)	11 (16.4%)	1 (16.7%)
• Endocrine	4 (5.8%)	2 (3%)	2 (33.3%)
• Dermal	2 (2.7%)	1 (1.5%)	1 (16.7%)
• Gastrointestinal	4 (5.8%)	3 (4.5%)	1 (16.7%)
• Hepatic	4 (5.8%)	2 (3%)	2 (33.3%)
• Renal	7 (9.6%)	5 (7.5%)	2 (33.3%)
• Cardiac	1 (1.4%)	1 (1.5%)	0 (0%)
• Pulmonary	1 (1.4%)	1 (1.5%)	0 (0%)

The OS of the sample was 13 months (95% CI 8.2–17.8). The PFS was 5 months (95% CI 3.8–6.2). The response results were as follows: (1) 4 patients (5.4%) had a complete response, (2) 13 patients (17.8%) had a partial response, (3) stabilization was observed in 16 patients (21.9%), and (4) progression was observed in 40 patients (54.8%). Seven was the mean number of doses administered. The observed toxicity was grade  $\geq 3$  in 8 patients (CTCAE v5.0).

### 3.2. Survival Analysis by Expression of the MMR System

The OS of patients with a preserved expression was 12 months versus 14 months for those with tumors who had a loss of expression of the MMR system ( $p = 0.598$ ; Figure 1). The PFS of patients with a preserved expression of the MMR system was 4 months versus 8 months for patients with a loss of expression ( $p = 0.661$ ; Figure 2).

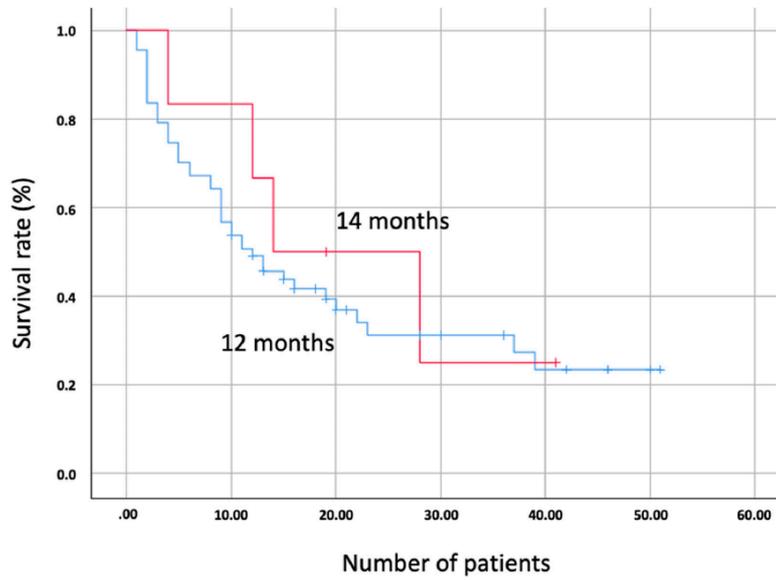


Figure 1. Kaplan–Meier curve showing the comparison of overall survival (OS) between patients with lost mismatch repair (MMR) system gene expression (red) and conserved (blue).

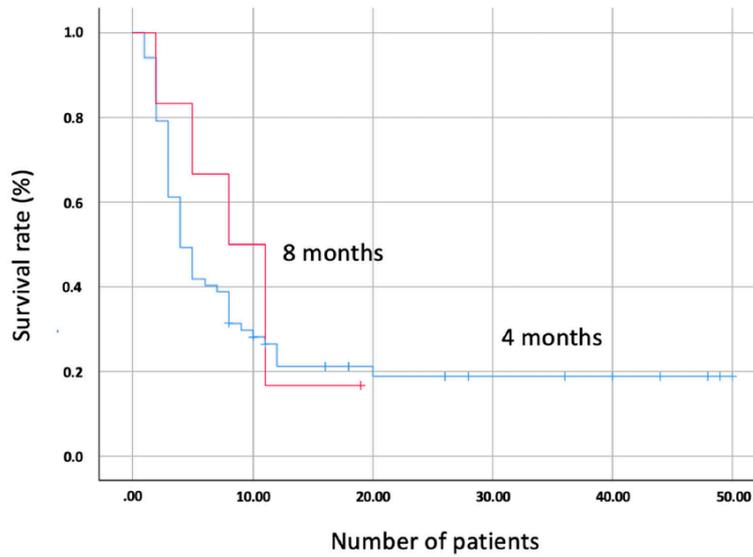
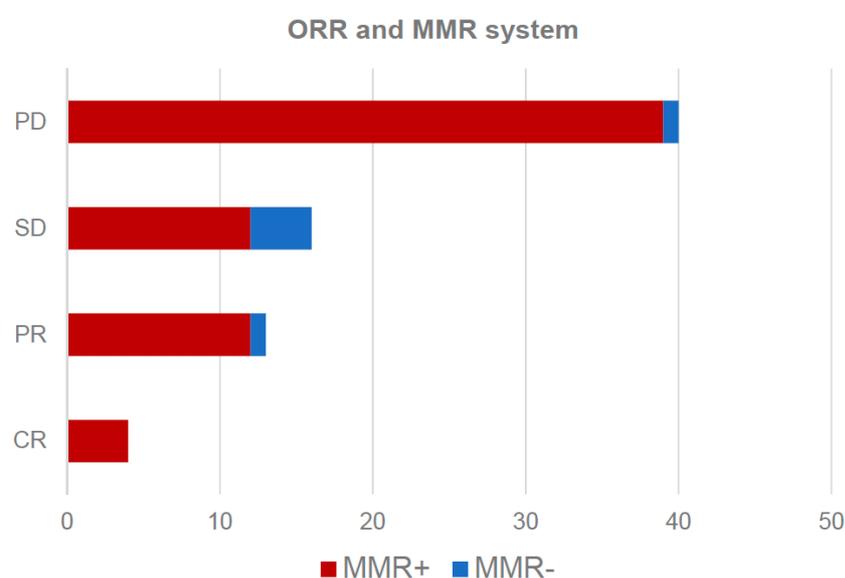


Figure 2. Kaplan–Meier curve showing the comparison of progression-free survival (PFS) between patients with lost MMR system gene expression (red) and conserved (blue).

No differences in OS were observed based on the expression of the MMR system based on factors such as sex (only males presented loss of expression,  $p = 0.595$ ), histology (adenocarcinoma group,  $p = 0.359$ , and epidermoid group,  $p = 0.271$ ) or PD-L1 positivity/negativity (PD-L1 negative group,  $p = 0.744$ , and positive,  $p = 0.641$ ). No differences in PFS were observed in MMR conservation or expression groups based on factors such as sex ( $p = 0.668$ ), histology (adenocarcinoma,  $p = 0.399$ , and epidermoid,  $p = 0.556$ ), or PD-L1 (negative group,  $p = 0.753$ , and positive,  $p = 0.346$ ).

### 3.3. Analysis of Response by Expression of the MMR System

The existence of a relationship between the loss of expression of the MMR system and the best response obtained (four groups based on RECIST 1.1 criteria) with immunotherapy treatment using a Pearson chi-squared test was analyzed. The results showed a significance of  $p = 0.045$ . Figure 3 shows the relationship between the objective response rate (ORR) and the expression of the MMR system in absolute numbers of the total number of patients in each subgroup.



**Figure 3.** Relationship between objective response rate (ORR) and mutations in the MMR system in patients treated with immunotherapy in NSCLC. MMR+, present expression of MMR system; MMR-, deficiency expression of MMR system; PD, progressive disease; SD, stable disease; PR, partial response; CR, complete response.

We analyzed whether the presence of severe toxicity (grade  $\geq 3$ ) was correlated with a loss of expression of repair genes. A comparison was made using Fisher's exact test, where  $p = 0.022$  was observed (odds ratio (OR) = 10.167 (95% CI 1.669–61.919)). Therefore, there was a statistically significant association between toxicity  $\geq 3$  and loss of expression of MMR system genes. The calculation was then adjusted according to the best response obtained as a confounding factor, dividing the response groups according to responses of yes or no. The association between toxicity and the IHC of the MMR system was focused on those patients with favorable responses (stabilization or partial or complete response).

#### 4. Discussion

The expression of the repair system has seldom been studied until now, and therefore, its implications for the treatment of cancers and the prevalence of these alterations are not clearly known [15]. Different studies have calculated the prevalence of mutations in the genes of the MMR system in lung cancer to be 4–5%. However, it is estimated that the reduction in the expression of these genes could be even greater at upwards of 50% in different series (Xinarianos et al. and Hsu et al.) [16,17]. In our series, the loss of expression of the repair genes was 8.2%, which is higher than that shown in other studies. To date, studies have shown that the most altered gene in these cases is MSH2. This is contrary to our study, which did not show that there were alterations in this gene, with the most frequent alteration being in PMS2 [18].

The survival rates assessed were different in the cases of OS and PFS. In the case of OS, no differences were found between the two groups evaluated. On the contrary, PFS was doubled in patients with a loss of expression of the repair genes (8 months) compared to those with preserved expression (4 months). Although the results are not statistically significant, there is a clear trend towards higher PFS in patients with a loss of expression. This is in accordance with different studies carried out on other solid tumors. The KEYNOTE-177 study, conducted in patients with metastatic colon cancer and dMMR/MSI-H, showed a PFS of 16.5 months in patients treated with immunotherapy versus 8.2 months in those treated with chemotherapy and capecitabine-based regimens [19]. The current study marks the beginning of immunotherapy research on solid tumors with alterations in the MMR system, and it is possible that in patients with NSCLC, this benefit will also be demonstrated in the future. This is why, despite the main limitation of the study, which is the low prevalence of mutations in the MMR system in NSCLC, the results showed a clear tendency towards a better response to immunotherapy in these patients. The implications of the MMR system genes in NSCLC could be assessed in patients with a PD-L1 expression < 50% in whom current treatment is based on a combination of platinum-based chemotherapy plus immunotherapy [20,21]. In the future, monotherapy immunotherapy could be applied in dMMR/MSI-H tumors, avoiding the toxicity associated with unnecessary chemotherapy [22].

Due to the limitation of the sample size, the association between the loss of expression and improved response to immunotherapy was evaluated. When the association between the two qualitative variables was evaluated, there was a statistically significant relationship based on the results of a chi-squared test. This relationship shows how cases with a loss of expression of the repair genes present a greater response, primarily at the expense of patients with partial responses [23]. These observations were not influenced by other factors such as age, sex, or histological subtype. This is why, even with the low prevalence of the loss of expression of reparative genes in NSCLC, the performance of these routine genes in patients with metastatic or advanced NSCLC should be evaluated through a cost-efficiency study. IHC could realize such a low-cost study, and it would be possible for many patients to benefit thanks to a prevalence of around 5%, which, according to some series, could be even higher [24].

In addition, whether the presence of a greater toxicity was related to a loss of expression of the repair genes was also analyzed. It was observed that a higher toxicity (divided into two subgroups depending on whether to present a toxicity grade  $\geq 3$  or severe) was related to a loss of expression of the repair genes. However, despite this association, it was verified that if there was a confounding factor, such as the response obtained, the response was the one associated with toxicity, and this, in turn, led to the loss of expression of the repair genes. Therefore, this opens a new avenue of study, as the association between the response to immunotherapy and toxicity should be clarified [25]. To date, multiple studies have assessed the more than likely existence of a causal association between increased response and severe toxicity  $\geq 2$  or 3 [26]. Thus far, no study has clearly defined this strength of association; however, it is likely that the increased activity of the immune system against

tumors leads to a greater antitumor response, followed by the consequent immunorelational toxicity secondary to this immune activation at the expense of T lymphocytes [27].

To conclude, it is important to assess whether NSCLC should be included in the sphere of Lynch syndrome [28]. Tobacco's clear association with NSCLC may have taken a backseat to the genetic causes of lung cancer [29]. However, in the future, 10% of patients with non-smoking NSCLC should be included in different molecular studies, which will show that NSCLC's origin is more significant than the already known oncogenic drivers of lung cancer, such as EGFR, ALK, or ROS1 [30].

## 5. Conclusions

Alterations of MMR system genes in NSCLC appear to be associated with an increased response to immunotherapy, similar to other solid tumors. In the case of these tumors, mutations in the MMR system and losses of expression must be studied in the future. New studies and clinical trials that assess these conclusions will be key for precision medicine for patients with NSCLC treated with immunotherapy.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.O.-H. and E.d.B.M. Methodology, A.O.-H. and C.P.P. Validation, A.O.-H., R.G.S., J.J.C.-H., J.P.M.-G. and M.D.L.d.l.C. Writing—original draft preparation, A.O.-H., J.P.M.-G. and L.B.H. Investigation, A.O.-H., L.F.-P., T.M.-G., R.E.-C., and J.P.M.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to are the property of the Medical Oncology Department of the University Hospital of Salamanca.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Hodi, F.S.; O'Day, S.J.; McDermott, D.F.; Weber, R.W.; Sosman, J.A.; Haanen, J.B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J.C.; et al. Improved survival with Ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 711–723. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hamid, O.; Robert, C.; Daud, A.; Hodi, F.S.; Hwu, W.J.; Kefford, R.; Wolchok, J.D.; Hersey, P.; Joseph, R.; Weber, J.S.; et al. Five-year survival outcomes for patients with advanced melanoma treated with pembrolizumab in KEYNOTE-001. *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, 582–588. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Amanam, I.; Mambetsariev, I.; Gupta, R.; Achuthan, S.; Wang, Y.; Pharaon, R.; Massarelli, E.; Koczywas, M.; Reckamp, K.; Salgia, R. Role of immunotherapy and co-mutations on KRAS-mutant non-small cell lung cancer survival. *J. Thorac. Dis.* **2020**, *12*, 5086–5095. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Assoun, S.; Theou-Anton, N.; Nguenang, M.; Cazes, A.; Danel, C.; Abbar, B.; Pluvy, J.; Gounant, V.; Khalil, A.; Namour, C.; et al. Association of TP53 mutations with response and longer survival under immune checkpoint inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* **2019**, *132*, 65–71. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Skoulidis, F.; Goldberg, M.E.; Greenawalt, D.M.; Hellmann, M.D.; Awad, M.D.; Gainor, J.F.; Schrock, A.B.; Hartmaier, R.J.; Trabucco, S.E.; Gay, L.; et al. STK11/LKB1 mutations and PD-1 Inhibitor resistance in KRAS-mutant lung adenocarcinoma. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 822–835. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Zhao, P.; Li, L.; Jiang, X.; Li, Q. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12*, 54. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Jiricny, J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2006**, *7*, 335–346. [\[CrossRef\]](#)
- Sahin, I.H.; Akce, M.; Alese, O.; Shaib, W.; Lesinsko, G.B.; El-Rayes, B.; Wu, C. Immune checkpoint inhibitors for the treatment of MSI-H/MMR-D colorectal cancer and a perspective on resistance mechanisms. *Br. J. Cancer.* **2019**, *121*, 809–818. [\[CrossRef\]](#)
- Viale, G.; Trapani, D.; Curigliano, G. Mismatch Repair Deficiency as a Predictive Biomarker for Immunotherapy Efficacy. *Biomed. Res. Int.* **2017**, *2017*, 4719194. [\[CrossRef\]](#)
- Lahtz, C.; Pfeifer, G.P. Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *J. Mol. Cell Biol.* **2011**, *3*, 51–58. [\[CrossRef\]](#)
- Warth, A.; Körner, S.; Penzel, R.; Muley, T.; Dienemann, H.; Schirmacher, P.; Von Knebel-Doeberitz, M.; Weichert, W.; Kloor, M. Microsatellite instability in pulmonary adenocarcinomas: A comprehensive study of 480 cases. *Virchows Arch.* **2016**, *468*, 313–319. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

12. Nojadeh, J.N.; Sharif, S.B.; Sakhinia, E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI J.* **2018**, *17*, 159–168. [[PubMed](#)]
13. Brahmer, J.; Karen, L.R.; Baas, P.; Crinó, L.; Eberhardt, W.E.E.; Poddubskaya, E.; Antonia, S.; Pluzanski, A.; Vokes, E.E.; Holgado, E.; et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 123–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Borghaei, H.; Paz-Ares, L.; Horn, L.; Spigel, D.R.; Steins, M.; Ready, N.E.; Chow, L.Q.; Vokes, E.E.; Felip, E.; Holgado, E.; et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1627–1639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Shen, C.; Wang, X.; Tian, L.; Che, G. Microsatellite alteration in multiple primary lung cancer. *J. Thorac. Dis.* **2014**, *6*, 1499–1505.
16. Xinarianos, G.; Scott, F.M.; Liloglou, T.; Prime, W.; Callaghan, J.; Gosney, J.R.; Field, J.K. Telomerase activity in non-small cell lung carcinomas correlates with smoking status. *Int. J. Oncol.* **1999**, *15*, 961–965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Hsu, K.H.; Ho, C.C.; Hsia, T.C.; Tseng, J.S.; Su, K.Y.; Wu, M.F.; Chiu, K.L.; Yang, T.Y.; Chen, K.C.; Ooi, H.; et al. Identification of five driver gene mutations in patients with treatment-naïve lung adenocarcinoma in Taiwan. *PLoS ONE.* **2015**, *10*, e0120852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Doukas, S.G.; Vageli, D.P.; Nikolouzakis, T.K.; Falzone, L.; Docea, A.O.; Lazopoulos, G.; Kalbakis, K.; Tsatsakis, A. Role of DNA mismatch repair genes in lung and head and neck cancer (Review). *World Acad. Sci. J.* **2019**, *1*, 184–191. [[CrossRef](#)]
19. André, T.; Shiu, K.K.; Kim, T.W.; Vitttrup, B.; Jensen, L.H.; Punt, C.; Smith, D.; Garcia-Carbonero, R.; Benavides, M.; Gibbs, P.; et al. Pembrolizumab in microsatellite-instability-high advanced colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2207–2218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Gandhi, L.; Rodríguez-Abreu, D.; Gadgeel, S.; Esteban, E.; Felip, E.; De Angelis, F.; Domine, M.; Clingan, P.; Hochmair, M.J.; Powell, S.F.; et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 2078–2092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Paz-Ares, L.; Luft, A.; Vicente, D.; Tafreshi, A.; Gümüs, M.; Mazières, J.; Hermes, B.; Çay Şenler, F.; Csósz, T.; Fülöp, A.; et al. Pembrolizumab plus chemotherapy for squamous non-small cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 2040–2051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Garon, E.B.; Rizvi, N.A.; Hui, R.; Leighl, N.; Balmanoukian, A.S.; Eder, J.P.; Patnaik, A.; Aggarwal, C.; Gubens, M.; Horn, L.; et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 2018–2028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wang, Q.X.; Qu, C.H.; Gao, Y.H.; Ding, P.R.; Yun, H.P.; Xie, D.; Cai, M.-Y. The degree of microsatellite instability predicts response to PD-1 blockade immunotherapy in mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high colorectal cancers. *Exp. Hematol. Oncol.* **2021**, *10*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Raab, S.S. The cost-effectiveness of immunohistochemistry. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2000**, *124*, 1185–1191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Das, S.; Johnson, D.B. Immune-related adverse events and anti-tumour efficacy of immune checkpoint inhibitors. *J. Immunother. Cancer.* **2019**, *7*, 306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Osipov, A.; Lim, S.J.; Popovic, A.; Azad, N.S.; Laheru, D.A.; Zheng, L.; Jaffee, E.M.; Wang, H.; Yarchoan, M. Tumor mutational burden, toxicity, and response of immune checkpoint inhibitors targeting PD(L)1, CTLA-4, and combination: A meta-regression analysis. *Clin. Cancer Res.* **2020**, *26*, 4842–4851. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Weinmann, S.C.; Pisetsky, D.S. Mechanisms of immune-related adverse events during the treatment of cancer with immune checkpoint inhibitors. *Rheumatology* **2019**, *58* (Suppl. 7), viii59–vii67. [[CrossRef](#)]
28. Sehgal, R.; Sheahan, K.; O’Connell, P.R.; Hanly, A.M.; Martin, S.T.; Winter, D.C. Lynch syndrome: An updated review. *Genes* **2014**, *5*, 497–507. [[CrossRef](#)]
29. Warren, G.W.; Cummings, K.M. Tobacco and lung cancer: Risks, trends, and outcomes in patients with cancer. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book* **2013**, *33*, 359–364. [[CrossRef](#)]
30. Griffin, R.; Ramirez, R.A. Molecular targets in non-small cell lung cancer. *Ochsner J.* **2017**, *17*, 388–392.

# ANEXO 2. SEGVNDO ARTÍCULO PVBLICADO EN LA REVISTA FRONTIERS IN BIOSCIENCE LANDMARK



Front. Biosci. (Landmark Ed) 2022; 27(3): 088  
<https://doi.org/10.31083/j.fbi2703088>

Original Research

## Immunohistochemical Assessment of the P53 Protein as a Predictor of Non-Small Cell Lung Cancer Response to Immunotherapy

Alejandro Olivares-Hernández<sup>1,2,\*</sup>, Edel del Barco Morillo<sup>1,2,3</sup>,  
José Pablo Miramontes-González<sup>4,5,\*</sup>, Luis Figuero-Pérez<sup>1,2</sup>, Luis Pérez-Belmonte<sup>6,7,8</sup>,  
Javier Martín-Vallejo<sup>3</sup>, Teresa Martín-Gómez<sup>1,2,3</sup>, Roberto Escala-Cornejo<sup>9</sup>,  
Rosario Vidal-Tocino<sup>1,2,3</sup>, Lorena Bellido Hernández<sup>1,2,3</sup>, Rogelio González Sarmiento<sup>2,3</sup>,  
María Dolores Ludeña de la Cruz<sup>3,10</sup>, Juan Jesús Cruz-Hernández<sup>1,2,3</sup>, Carmen Parra Pérez<sup>3,10</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Oncology, University Hospital of Salamanca, 182 37007 Paseo de San Vicente, Spain

<sup>2</sup>Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), 182 37007 Paseo de San Vicente, Spain

<sup>3</sup>Faculty of Medicine, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

<sup>4</sup>Department of Internal Medicine, University Hospital Rio Hortega, 2 47012 Calle Dulzaina, Spain

<sup>5</sup>Faculty of Medicine, University of Valladolid, 7 47004 Avenida Ramón y Cajal, Spain

<sup>6</sup>Department of Internal Medicine, Regional University Hospital of Malaga, 84 29010 Avenida de Carlos Haya, Spain

<sup>7</sup>Institute for Biomedical Research of Malaga (IBIMA), 84 29010 Avenida de Carlos Haya, Spain

<sup>8</sup>Faculty of Medicine, University of Malaga, 2 29016 Avenida de Cervantes, Spain

<sup>9</sup>National Research Institute (SOLCA) of Guayaquil, 090514 Avenida Pedro Menéndez Gilbert, Ecuador

<sup>10</sup>Department of Pathology, University Hospital of Salamanca, 182 37007 Paseo de San Vicente, Spain

\*Correspondence: [aolivares@saludecastillayleon.es](mailto:aolivares@saludecastillayleon.es) (Alejandro Olivares-Hernández); [jpmiramontes@hotmail.com](mailto:jpmiramontes@hotmail.com) (José Pablo Miramontes-González)

Academic Editor: Elena Levantini

Submitted: 4 December 2021 Revised: 14 February 2022 Accepted: 15 February 2022 Published: 8 March 2022

### Abstract

**Background:** Determining predictive biomarkers for immune checkpoint inhibitors (ICIs) is a current challenge in oncology. Previous studies on non-small cell lung cancer (NSCLC) have shown how *TP53* gene mutations are correlated with different responses to ICIs. Strong and diffuse immuno-expression of p53 by immunohistochemistry (IHC) is interpreted as a likely indicator of a *TP53* gene mutation. We aimed to assess the p53 protein expression via IHC in NSCLC as a predictive biomarker of the response to ICIs. **Methods:** This was a retrospective hospital-based study of patients with NSCLC treated with Nivolumab in the University Hospital of Salamanca. All diagnostic biopsies were studied via IHC (measuring p53 protein expression, peroxidase anti-peroxidase immunohistochemistry technique using Leica BOND Polymer development kits). Survival analysis was performed by subgroups of expression of p53 and other factors using the Kaplan-Meier estimator and Cox proportional-hazards model. **Results:** Seventy-three patients were included (59 men and 14 women). The median age was 68 (44–84) years. Thirty-six biopsies were adenocarcinoma, 34 were squamous, and three were undifferentiated. In 41 biopsies (56.2%), the cellular expression of p53 was <5% (Group A), and in 32 biopsies (43.8%), the expression was ≥5% (Group B). In the general analysis, no differences were observed in overall survival (OS) (A: 12 months vs B: 20 months;  $p = 0.070$ ) or progression-free survival (PFS) (A: 4 m vs B: 7 m;  $p = 0.064$ ). Significant differences were observed in adenocarcinomas for both OS (A: 8 m vs B: median not reached;  $p = 0.002$ ) and PFS (A: 3 m vs 8 m;  $p = 0.013$ ). No differences in PFS and OS were observed in squamous cell carcinoma. Significant differences were observed in OS in the PD-L1 negative group (0% expression) (A: 13 m vs B: 39 m;  $p = 0.024$ ), but not in PFS (A: 3 m vs B: 7 m;  $p = 0.70$ ). No differences were observed in the PD-L1 positive group. **Conclusions:** A trend toward a greater response to ICIs was observed in the PFS and OS of patients with high expression of p53 by IHC (*TP53* mutation), especially in the PD-L1 negative adenocarcinoma subgroup. These results will make it possible to make future modifications to the clinical guidelines of NSCLC according to the expression of p53.

**Keywords:** p53 protein; non-small cell lung cancer; immunotherapy; immune checkpoint inhibitors; biomarkers

### 1. Introduction

Among malignancies, lung cancer is a with the highest incidence worldwide, with 2.1 million newly diagnosed cases per year [1]. In terms of mortality, a total of 1.8 million people die from lung tumours each year (representing 18.4% of deaths from cancer) [2]. The aetiology is well known; tobacco is the main cause, responsible for 90% of lung cancers [3]. Other known risk factors include asbestos,

radon, and polycyclic aromatic hydrocarbons [4]. The most widely used histological classification for the characterisation of lung cancer divides these tumours into four variants: (1) adenocarcinoma, (2) squamous cell carcinoma, (3) large cell carcinoma, and (4) small cell or small cell carcinoma. The first three tumour types are grouped under the term non-small cell lung cancer (NSCLC), which encompasses 85% of lung tumours.

 Copyright: © 2022 The Author(s). Published by IMR Press. This is an open access article under the CC BY 4.0 license.

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

The introduction of immunotherapy treatments [immune checkpoint inhibitors (ICIs)] has revolutionized NSCLC treatment. The inhibition of T cells by tumour cells is performed through two main inhibitory pathways best described for T cells: the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) protein receptor and the programmed cell death protein 1 (PD-1) [5,6]. These are the pathways through which ICIs act by negatively regulating these receptors and consequently stimulating the T lymphocytes. Various factors, such as gene mutations, are known as predictors or modifiers of the response to immunotherapy or, more accurately, to ICIs in solid tumours [7].

The most pertinent somatic mutations in NSCLC are those related to the *RAS* (Rat Sarcoma Virus), *RB* (Retinoblastoma Protein), *TP53* (Tumour Protein 53), *AKT* (Protein Kinase B), *LKB1* (Liver Kinase B1), and *BRAF* (Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B) genes. Alterations in the *TP53* gene occur in approximately 50% of NSCLC cases [8]. This percentage is higher in epidermoid tumours and lower in adenocarcinomas because it is associated with tobacco use [9]. The involvement of the *TP53* gene in different tumours is widely known because of its function as a suppressor gene. The loss or mutation of the *TP53* gene in tumour cells has been shown to influence immune recognition through mechanisms, such as the presentation of major histocompatibility complex 1 or the recruitment of suppressor myeloid cells or Treg lymphocytes [10]. Not only is *TP53* key in the direct regulation of the immune system, but it also plays a role in establishing the tumour microenvironment [11]. Therefore, several studies have evaluated the implications of *TP53* mutations in predicting the response to ICIs in solid tumours, especially NSCLC [12,13].

Immunohistochemical (IHC) staining for p53 is mainly correlated with the presence of missense mutations in *TP53* [14,15]. Historically, p53 IHC has been interpreted as negative or positive based on the percentage of stained tumour cell nuclei using variable cut-offs ranging from 5 to 10% [16]. However, the current classification of p53 expression is subdivided into three expression patterns: over-expression, the complete absence of expression, and cytoplasmic expression. Only 5% of tumours with mutated *TP53* show p53 protein expression by the IHC wild type. This three-pattern classification correlates with all possible *TP53* mutations, the most common being missense. For all these reasons, the protein expression of p53 by IHC (in all its forms) can be used as a highly sensitive surrogate marker for mutations in *TP53* with a failure rate of only 5% [17].

*TP53* mutations have traditionally been correlated with resistance to radiation therapy and chemotherapy [18]. Studies on immunotherapy and NSCLC have presented contradictory results regarding the mutational status of *TP53*. A study by Assoun *et al.* [19] demonstrated a greater benefit of immunotherapy in patients with NSCLC and mutated *TP53*. However, a study by Zhao *et al.* [20] presented

contrary results, with lower survival of NSCLC patients treated with immunotherapy treatment in patients with mutated *TP53*. These results were more marked in patients with low immune expression measured as the tumour mutation burden (TMB), and were aligned with the findings of Carlisle *et al.* [21], who reported a trend toward a greater response in tumours with high expression of PD-L1.

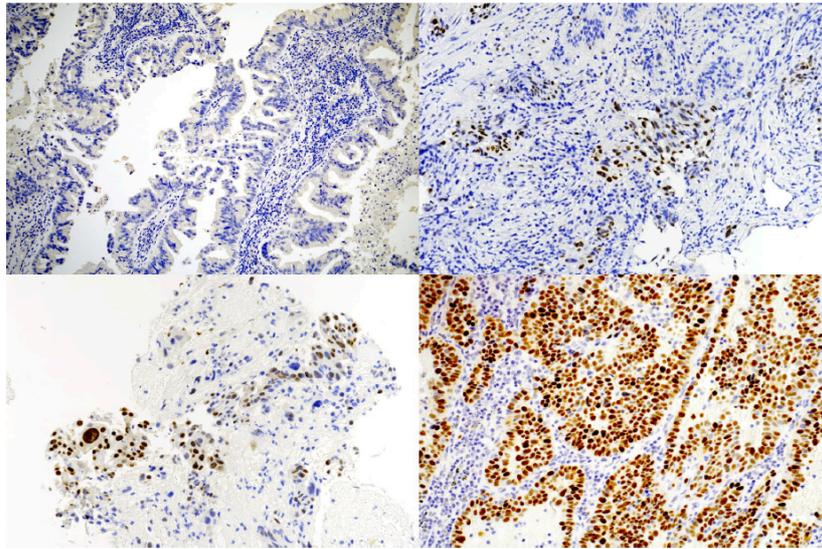
In this research, our primary objective was to determine whether the protein expression of p53, as a surrogate marker of the mutational status of *TP53*, was correlated with the response to immunotherapy treatments in patients with NSCLC. As secondary objectives of the study, we investigated whether this response to ICIs, based on the mutational status of *TP53*, was influenced by various other factors, such as sex, histology, and the expression of PD-L1.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Data Collection and Construction of the Cohort

A retrospective hospital-based study was carried out in selected patients within the Complejo Asistencial Universitario de Salamanca (Salamanca, Spain). The inclusion criteria were a diagnosis of advanced or metastatic NSCLC and second-line immunotherapy treatment with an anti-PD1 drug (Nivolumab independent of PD-L1 expression in the tumour, according to clinical trials CheckMate 017 and CheckMate 057) [22,23]. The fundamental data collected and studied were age (years), sex, histology, sites of metastases, progression-free survival (PFS) in months, overall survival (OS) in months, the number of doses received, the best response obtained with immunotherapy, and immunotoxicity presented. The study was carried out according to the ethical protocols of the hospital and with the informed consent of the patients for the extraction of the sample. If the information found in this study is favourable for the immunotherapy treatment, it will be included in the NSCLC treatment protocols of the Complejo Asistencial Universitario de Salamanca.

According to the data available in the literature, a p53 protein expression level of 5% is considered to determine a high probability of *TP53* mutation (based on the results of a study carried out by Kim *et al.* [24]). Several studies have shown that the 5% cut-off point has the shortest sensitivity and specificity for assessing *TP53* mutations, both in solid tumours (such as adenocarcinoma of the lung or ovary) and in haematological neoplasms [15,25]. Together with the above, for evaluating the secondary endpoint, the patients were subdivided by positive or negative PD-L1 expression (this subdivision was made because it is the most widely used in clinical trials in NSCLC and second-line immunotherapy, such as the trials CheckMate 017 and CheckMate 057). To carry out this classification of patients, we relied on published clinical trials of second-line immunotherapy in which the main factor for dividing the subgroups was the positive or negative expression of PD-L1 [26,27].



**Fig. 1.** Assessment of the level of protein expression of p53 by IHC. The figure shows 0% p53 expression (upper left), 30% (upper right), 50% (lower left), and 100% (lower right) staining.

### 2.2 Analysis of p53 Protein Expression by IHC

The expression analysis of the p53 protein was performed with the peroxidase anti-peroxidase immunohistochemistry technique using the Leica BOND Polymer development kits. Leica BOND III automatic machines were subsequently used. P53 clon D07 Leica prediluted. The level of expression of p53 was quantified as a percentage, with 0% indicating no expression and 100% indicating complete expression of the protein in the cell (Fig. 1). The values of p53 are described in quantitative terms according to the main studies in the literature on IHC in p53 [28,29]. We carried out a semi-quantitative study, analysing ten fields of 20× (**Supplementary material**).

The samples were evaluated by two independent people to avoid bias. Microscopic analysis was carried out using a Nikon Eclipse Ci microscopy device (Tokyo, Kanto, Japan). According to the existing literature on IHC as a surrogate marker for mutations in the *TP53* gene (in both solid and haematological malignancies), it has been considered that a p53 protein expression level of  $\geq 5\%$  is a reliable cut-off point indicating a mutated *TP53* gene [24].

### 2.3 Statistical Analysis

For statistical analysis, first, PFS was calculated as the months from the initiation of immunotherapy treatment to clinical or radiological progression. OS was calculated as the period (in months) from initiating the patient's immunotherapy treatment until death. Survival rates were cal-

culated as medians with 95% confidence intervals (CIs). Survival as a function of p53 expression was calculated using the Kaplan-Meier method (log-rank and Breslow test) and Cox regression analysis. To avoid confounding factors, subgroup analyses were performed for sex, age, and histology. Additional proportional-hazards models that included the above potential confounders were constructed. The statistical significance for the analyses in this study was established at  $p < 0.05$ . The software used was SPSS, version 25 (IBM®, Armonk, NY, USA). The results were expressed using the log-rank test, except those specifically requiring the Breslow test.

## 3. Results

### 3.1 General Analysis of the Sample

A total of 73 biopsies were examined, which were taken from patients with NSCLC who were treated with anti-PD1 as second-line therapy. The median age was 68 (44–84) years; 59 patients were men (80.8%), and 14 were women (19.2%). Histology corresponded to adenocarcinoma in 36 patients, squamous cell carcinoma in 34 patients, and undifferentiated carcinoma in three patients. The most frequent sites of metastatic involvement were the lung with metastatic secondary nodules (45 patients, 61.6%) and lymph nodes (39 patients, 53.4%), followed by the bone (14 patients, 19.2%) and liver (ten patients, 13.7%). The mean PD-L1 expression was 2%. PD-L1 expression was negative (0%) in 27 patients and positive ( $\geq 1\%$ ) in 46 patients. PD-

**Table 1. General characteristics of the sample.**

Sample	Overall, 73 (100%)	Adenocarcinoma, 36 (49.3%)	Squamous, 34 (46.6%)
Age (range)	68 (44–84)	68 (44–84)	68 (44–84)
Sex (M/W)	59/14 (80.8/19.2%)	25/11 (69.4/30.6%)	31/3 (91.2/8.8%)
P53 expression			
• 0%	35 (47.9%)	20 (55.5%)	13 (38.2%)
• <5%	41 (56.2%)	12 (33.3%)	14 (41.2%)
• ≥5%	32 (43.8%)	24 (66.7%)	20 (58.8%)
• ≥10%	26 (35.6%)	7 (19.4%)	19 (55.9%)
• ≥20%	22 (30.1%)	6 (16.6%)	16 (47.1%)
• ≥50%	14 (19.2%)	3 (8.3%)	8 (23.5%)
PD-L1			
• Negative	27 (37%)	18 (50%)	9 (26.5%)
• Positive	46 (63%)	18 (50%)	25 (73.5%)
Survival (months)			
• Overall	13 (95% CI 8.2–17.8)	16 (95% CI 3.5–28.5)	12 (95% CI 9–15)
• Progression-free	5 (95% CI 3.8–6.2)	4 (95% CI 2.5–5.5)	5 (95% CI 2–8)
Response			
• Progression	40 (54.8%)	22 (61.1%)	16 (47.1%)
• Stabilisation	16 (21.9%)	8 (22.2%)	8 (23.5%)
• Partial response	13 (17.8%)	3 (8.3%)	9 (26.5%)
• Complete response	4 (5.4%)	3 (8.3%)	1 (2.9%)
Toxicity			
• Not observed	47 (64.4%)	24 (66.7%)	22 (64.7%)
• Asthenia	12 (16.4%)	5 (13.9%)	7 (20.6%)
• Endocrine	4 (5.5%)	2 (5.6%)	2 (5.9%)
• Dermal	1 (1.4%)	1 (2.8%)	0 (0%)
• Gastrointestinal	3 (4.1%)	1 (2.8%)	1 (2.9%)
• Hepatic	4 (5.5%)	2 (5.6%)	2 (5.9%)
• Renal	7 (9.6%)	5 (13.9%)	2 (5.9%)
• Cardiac	1 (1.4%)	1 (2.8%)	0 (0%)
• Pulmonary	1 (1.4%)	1 (2.8%)	0 (0%)

The table shows the demographic variables of the study population of patients with advanced or metastatic NSCLC under treatment with immunotherapy at the University Hospital of Salamanca. Patients with undifferentiated carcinomas have been excluded from Table 1 due to its lack of representation (three patients).

L1 expression was  $\geq 10\%$  in 21 patients and  $< 10\%$  in 52 patients. Only four patients had expression levels of  $\geq 50\%$ . The protein expression of p53 determined by IHC was 0% in 35 patients. The p53 expression level was  $\geq 5\%$  in 32 patients, and in 41 patients, the expression level was  $< 5\%$ . The characteristics of the sample are presented in Table 1.

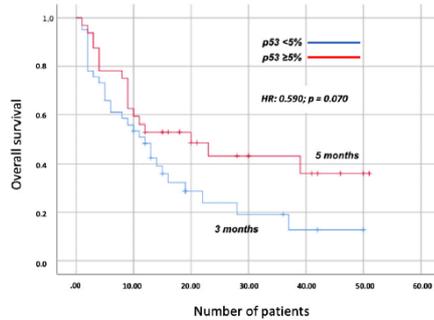
The OS of the sample was 13 months (95% CI 8.2–17.8). The PFS was 5 months (95% CI 3.8–6.2). The OS of patients with adenocarcinoma histology was 16 months (95% CI 3.5–28.5), with a 4-month PFS [95% CI 2.5–5.5]. The OS of patients with squamous cell carcinoma histology was 12 months (95% CI 9–15) with a 5-month PFS (95% CI 2–8). The PFS of the PD-L1-negative subgroup was 4 months (95% CI 3–5), whereas it was 6 months (95% CI 3–9) in the PD-L1-positive subgroup ( $p = 0.097$ ). The response results were as follows: (1) four patients (5.4%)

had a complete response, (2) 13 patients (17.8%) had a partial response, (3) stabilisation was observed in 16 patients (21.9%), and (4) progression was observed in 40 patients (54.8%). The mean number of doses administered was seven. The observed toxicity was grade  $\geq 3$  in eight patients (CTCAEv5.0).

### 3.2 Survival Analysis by Protein Expression of p53

The OS for patients above the 5% p53 cut-off point was 12 months (95% CI 7.5–16.5), and the OS was 20 months (95% CI 3.4–36.6) in patients below the cut-off (HR = 0.590 [95% CI 0.327–1.064];  $p = 0.070$ ) (Fig. 2). The PFS was 4 months in patients above the 5% cut-off point (95% CI 3.0–5.0), and it was 7 months (95% CI 3.3–10.7) in patients below the cut-off (HR = 0.630 [95% CI 0.370–

1.072];  $p = 0.064$ ). No statistical differences were observed with cut-off points of 1% (OS  $p = 0.317$  and PFS  $p = 0.343$ ) and 10% (OS  $p = 0.149$  and PFS  $p = 0.181$ ).

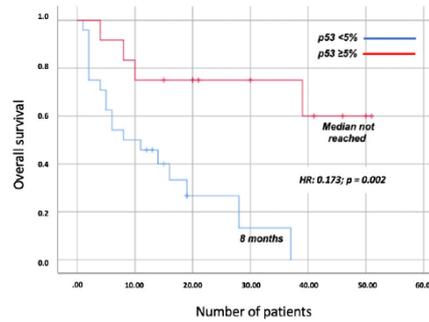


**Fig. 2. Comparison of overall survival (OS) in the entire sample of patients with protein expression levels of p53 of <5% vs  $\geq 5\%$ .** Although the results are not statistically significant, a trend toward a higher OS was observed for the entire sample in patients with expression levels of  $\geq 5\%$ . The OS of patients with p53 expression of  $\geq 5\%$  was 5 months, and 3 months in patients with p53 <5% ( $p = 0.070$ ).

In the analysis by histology, statistically significant differences were observed for adenocarcinoma histology but not for squamous tumours. In adenocarcinomas, the OS was 8 months (95% CI 0.0–16.0) in patients with p53 expression levels of <5%, whereas the median was not reached at the time of the analysis in patients with p53 expression levels of  $\geq 5\%$  (HR = 0.173 [95% CI 0.049–0.616];  $p = 0.002$ ) (Fig. 3). The PFS was 3 months (95% CI 1.8–4.2) in patients with p53 expression levels of <5% and was 8 months [95% CI 4.6–11.4] in patients with p53 expression levels of  $\geq 5\%$  (HR = 0.372 [95% CI 0.155–0.894];  $p = 0.013$ ). In squamous cells, no differences were observed in OS ( $p = 0.247$ ) or PFS ( $p = 0.860$ ).

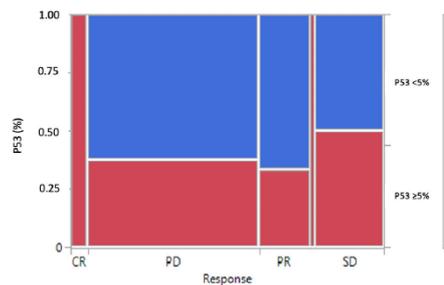
The only statistically significant differences regarding sex were observed in PFS in female patients. The PFS was 3 months (95% CI 2.2–3.8) in patients with p53 levels of <5% and was 5 months (95% CI 0.0–11.5) in patients with p53 levels of  $\geq 5\%$  (HR = 0.233 [95% CI 0.056–0.975];  $p = 0.020$ ). There were no statistically significant differences in OS ( $p = 0.123$ ) in female patients. There were also no differences in OS ( $p = 0.247$ ) or PFS ( $p = 0.239$ ) in male patients. No statistically significant differences were observed in the subgroup analyses based on the age, toxicity, or site of metastatic involvement by the expression of p53.

A higher percentage of responses was observed in patients with protein expression of p53  $\geq 5\%$  compared to patients with p53 <5%. All complete responses (four patients) were in tumours with p53  $\geq 5\%$ . In contrast, pro-



**Fig. 3. Comparison of overall survival (OS) in patients with adenocarcinoma with p53 protein expression levels of <5% vs  $\geq 5\%$ .** The results obtained are statistically significant in favour of the p53  $\geq 5\%$  subgroup, with the median not reached at the time of the study for an OS of 8 months in the p53 <5% subgroup ( $p = 0.002$ ).

gression was more frequent in patients with p53 <5% (61% of patients) vs p53  $\geq 5\%$  (46.9% of patients). These findings were not statistically significant (Chi-square test,  $p = 0.103$ ). Fig. 4 shows the responses as a function of p53 expression.

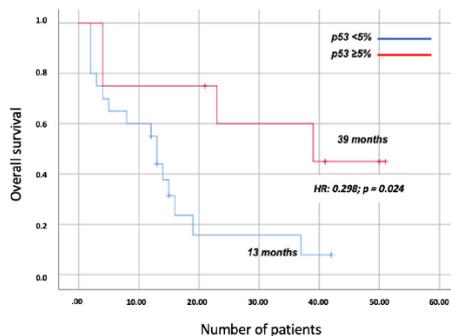


**Fig. 4. Responses were obtained as a function of p53 protein expression.** The absolute value is accompanied by the percentage of all patients with the same p53 expression. All complete responses were in tumours with p53 protein expression  $\geq 5\%$ . On the contrary, the patients with progression mostly belonged to the group with p53 expression <5% (46.9 vs 61%). \*Abbreviations: CR, complete response; PD, progressive disease; PR, partial response; SD, stable disease.

### 3.3 Survival Analysis by Expression of p53 and PD-L1

When the sample was analysed according to the positivity or negativity of PD-L1 expression, statistically signif-

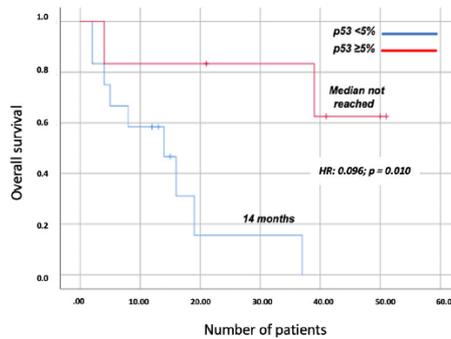
ificant differences were identified in the subgroup of patients with negative PD-L1. For this subgroup of patients, OS was 13 months (95% CI 11.0–15.0) in patients with p53 levels of <5% and was 39 months (95% CI 0.0–78.5) in patients with p53 levels of  $\geq 5\%$  (HR = 0.298 [95% CI 0.093–0.950];  $p = 0.024$ ) (Fig. 5). The PFS was 3 months (95% CI 1.9–4.1) in patients with p53 levels of <5% and was 7 months (95% CI 1.5–12.5) in patients with p53 levels of  $\geq 5\%$  (HR = 0.478 [95% CI 0.186–1.231];  $p = 0.070$ ). No differences were observed in the OS ( $p = 0.449$ ) or PFS ( $p = 0.525$ ) in patients with positive PD-L1. Exploratory analyses were performed with different cut-off points for PD-L1 (10%, 25%, and 50%), with no differences observed in OS or PFS between the different cohorts. Exploratory analyses have also been performed with the currently approved cut-off points for PD-L1 in NSCLC such as <1%, 1–50%, and  $\geq 50\%$ , without finding statistically significant results in the subgroups with PD-L1 between 1–50% (OS  $p = 0.310$ , PFS  $p = 0.241$ ). Neither were differences observed by subgroups of PD-L1 as a function of age, toxicity, or other factors.



**Fig. 5.** The difference in overall survival (OS) of patients in the sample with negative PD-L1 expression, in which a higher OS was observed in patients with high p53 protein expression compared with those with p53 expression levels of <5%. In those with negative PD-L1, the OS of patients with p53 expression  $\geq 5\%$  was 39 months, and 13 months in patients with p53 <5% ( $p = 0.024$ ).

In the evaluation of the subgroup of patients with adenocarcinoma and negative PD-L1 expression, we observed a 14-month OS (95% CI 5–30) in patients with p53 levels of <5% compared with an unreached median OS in patients with p53 levels of  $\geq 5\%$  (HR = 0.096 [95% CI 0.011–0.806];  $p = 0.010$ ) (Fig. 6). The PFS was 3 months (95% CI 2–4) in patients with p53 levels <5% and was 7 months (95% CI 2–11) in patients with p53 levels of  $\geq 5\%$  (HR = 0.392 [95% CI 0.122–1.262];  $p = 0.078$ ). In the epidermoid and PD-L1 negative subgroup, no statistically significant differences

were observed in OS ( $p = 0.894$ ) or PFS ( $p = 0.624$ ). No statistically significant differences were observed in these analyses based on age, toxicity, or location of metastases.



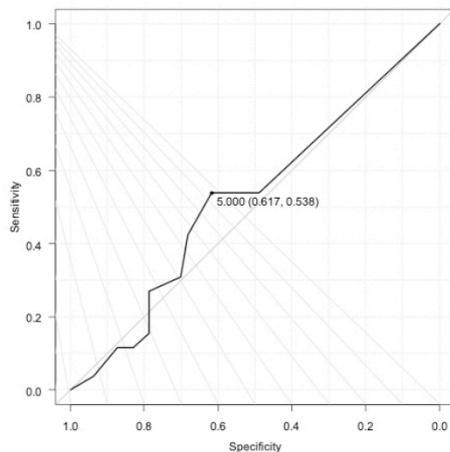
**Fig. 6.** The difference in overall survival (OS) between patients with advanced lung cancer, adenocarcinoma subtype, who were PD-L1 negative as a function of p53 protein expression. A greater tendency for OS was observed in patients with expression  $\geq 5\%$  ( $p = 0.010$ ).

To validate the chosen cut-off point of p53, a ROC curve has been made to show which cut-off point of p53 protein expression has the most homogeneous sensitivity and specificity. The patients were divided into two subgroups according to whether they obtained a response or not with the immunotherapy treatment, and it was compared with the percentage of p53 expression. Fig. 7 shows the ROC curve where the cut-off point of 5% is the one that presents the most homogeneous sensitivity and specificity of the entire sample.

#### 4. Discussion

In this study, we analysed the influence of p53 mutations on the response to immunotherapy in patients with NSCLC. We performed an IHC analysis of an NSCLC sample to measure the protein expression of p53 (section 2.2). This research has a series of limitations, the first of which is due to the retrospective design of the study. Along with this, the number of patients is limited because of the difficulty of processing the samples, given that those performed by fine-needle aspiration were not accepted as valid because of technical difficulties.

Instead of genetic analysis of the tumour, we performed IHC (which can be performed at any type of centre) to determine mutations in *TP53* and assess predictive markers of response to immunotherapy [30,31]. Currently, genetic sequencing technology is not available at any centre [32]; therefore, the IHC technique was chosen as a surrogate marker of mutation in *TP53* [33]. The different studies car-



**Fig. 7. ROC curve showing the cut-off point of p53 protein expression in 5% as the one that best discriminates between the possibility of mutated and non-mutated *TP53*.**

ried out to date do not clearly show the influence of *TP53* on the response to immunotherapy treatments in NSCLC. Current studies are contradictory on this matter, and therefore this article aims to make a greater contribution to this field.

The choice of patients with anti-PD1 treatment as second-line therapy was a key point of our work and is crucial for understanding the analysis and the sample. Given that until 2 years ago, first-line and second-line immunotherapy treatment was classified according to PD-L1 expression levels of  $\geq 50\%$  and  $< 50\%$ , respectively, we aspired to assemble a cohort of patients as homogeneous as possible [34]. The characteristics of the patients were similar between groups as all of them were patients with NSCLC and anti-PD1 treatment (patients without anti-PDL1 treatment were excluded) who presented with measurable disease at the beginning and during treatment with ICIs.

The main objective of the analysis was to assess whether p53 mutations (determined through IHC) were correlated with a greater response to immunotherapy treatment and, therefore, may serve as a predictive marker of response [24,25]. The global data analysis showed a trend toward enhanced survival in both OS and PFS, although the trend was not statistically significant. The absence of statistical significance was possibly due to the small sample size. These differences are consistent with those from other studies in solid tumours, such as those carried out by Assoun *et al.* [19] in NSCLC and Michel *et al.* [35] in colorectal cancer. These theoretical data are based on the increased release of antigens produced by mutations in *TP53* [36]. This creation of antigens would imply activation of the immune system

with the consequent greater response to ICIs [37].

These differences in OS and PFS can be observed in our analysis, which was dependent on the adenocarcinoma subtype and in women (two factors that are likely related in many cases). A study by Sun *et al.* [38] reported that *TP53* mutations could predict response to immunotherapy in the NSCLC adenocarcinoma subtype, although this was independent of the mutational type. According to these findings, p53 expression as a surrogate marker is very likely dependent on and exclusive to the adenocarcinoma subtype. It is possible that in adenocarcinoma subtypes, the influence of p53 is key compared to squamous cells because the TMB in the former is lower. Therefore, in squamous subtypes, high TMB would already be a biomarker of response to ICIs [39]. Together with the above, a higher percentage of responses is observed in patients with high protein expression of p53. There were only complete responses in patients with mutated *TP53*. In contrast, the percentage of progressions was 14.1% higher in patients without mutations. The results, in this case, were not statistically significant. However, it is possible that the limiting factor of the sample size accounts for this absence of statistical significance.

Another relevant finding is the fact that the high protein expression level of p53 seems more critical in tumours with negative PD-L1 expression. In these patients, OS was higher in patients with expression levels of  $\geq 5\%$ , and the PFS was also higher, but the difference was not statistically significant. This might be explained by the fact that the presence of *TP53* mutations may have a greater influence on immunotherapy treatment in patients with negative PD-L1 expression, who present a poorer response than patients with positive PD-L1 expression [40]. In these latter patients, the response to immunotherapy was greater because of the PD-L1 positive status, and the influence of p53 expression was lower; therefore, the results were not positive for this finding [41]. Because of this, the changes produced in the microenvironment by the *TP53* mutations have greater influence in tumours with a less activated immune system (tumours with negative PD-L1) than in tumours with a microenvironment favourable to the activation of the immune system (PD-L1 positive) [11,42].

Taken together, our results favour the determination of p53 before the start of treatment with immunotherapy, mainly in patients with the adenocarcinoma subtype. The prior determination of p53 should be evaluated in those patients whose treatment is based on immunotherapy plus chemotherapy regimens where chemotherapy could be avoided, or on the contrary in those with monotherapy ICIs, where chemotherapy addition would be interesting.

## 5. Conclusions

It can be stated that survival is higher with NSCLC immunotherapy in patients with mutations in *TP53*, as assessed using a surrogate marker, such as p53 protein ex-

pression. This finding seems to be more valid in patients with the adenocarcinoma subtype. The influence of p53 on NSCLC is possibly greater on PD-L1 negative tumours due to the relatively less activation of the immune system in these tumours. Additional studies are required in the future to validate these conclusions. Due to the limitation of the sample size in the research, future studies should include a larger sample size with a greater number of patients with negative PD-L1 and adenocarcinoma subtypes.

#### Author contributions

Conceptualization—AO-H, EB-M, and JPM-G. Methodology—AO-H, LP-B, and LF-P. Validation—AO-H, EB-M, JPM-G, RG-S, JJC-H, MDL-C, and CP-P. Writing - original draft preparation—AO-H, JM-V, TM-G, RE-C, and RV-T. Investigation—AO-H, LF-P, and LB-H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

#### Ethics approval and consent to participate

This study has been approved by the ethics committee of the University Hospital of Salamanca under reference number PI 2021 10 878. It has had the informed consent of all the patients included for the analysis of the samples and has complied with the bioethical protocols current.

#### Acknowledgment

For the cancer patients of the University Hospital of Salamanca for their kindness and affection.

#### Funding

This research received no external funding.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at <https://www.imrpress.com/journal/FBL/27/3/10.31083/j.fbl2703088>.

#### References

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, *et al*. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. 2021; 71: 209–249.
- [2] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, *et al*. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*. 2019; 144: 1941–1953.
- [3] Walser T, Cui X, Yanagawa J, Lee JM, Heinrich E, Lee G, *et al*. Smoking and lung cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2008; 5: 811–815.
- [4] Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *The European Respiratory Journal*. 2016; 48: 889–902.
- [5] Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood*. 2018; 131: 58–67.
- [6] Kythreotou A, Siddique A, Mauri FA, Bower M, Pinato DJ. PD-L1. *Journal of Clinical Pathology*. 2018; 71: 189–194.
- [7] Zhang Y, Lin A, Li Y, Ding W, Meng H, Luo P, *et al*. Age and mutations as predictors of the response to immunotherapy in head and neck squamous cell cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020; 8: 608969.
- [8] Campling BG, el-Deiry WS. Clinical implications of p53 mutations in lung cancer. *Methods in Molecular Medicine*. 2003; 75: 53–77.
- [9] Gibbons DL, Byers LA, Kurie JM. Smoking, p53 Mutation, and Lung Cancer. *Molecular Cancer Research*. 2014; 12: 3–13.
- [10] Levine AJ. P53 and The Immune Response: 40 Years of Exploration-A Plan for the Future. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21: 541.
- [11] Lin X, Wang L, Xie X, Qin Y, Xie Z, Ouyang M, *et al*. Prognostic Biomarker TP53 Mutations for Immune Checkpoint Blockade Therapy and Its Association With Tumor Microenvironment of Lung Adenocarcinoma. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 2020; 7: 602328.
- [12] Sobhani N, D'Angelo A, Wang X, Young KH, Generali D, Li Y. Mutant p53 as an Antigen in Cancer Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21: 4087.
- [13] DeLeo AB. P53-based immunotherapy of cancer. *Critical Reviews in Immunology*. 1998; 18: 29–35.
- [14] Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih IM, *et al*. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Modern Pathology*. 2011; 24: 1248–1253.
- [15] Fernandez-Pol S, Ma L, Ohgami RS, Arber DA. Immunohistochemistry for p53 is a useful tool to identify cases of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes that are TP53 mutated, have complex karyotype, and have poor prognosis. *Modern Pathology*. 2017; 30: 382–392.
- [16] Lee BJ, Kim JH, Jo DH, Kim K, Yu YS, Kim JH. Nuclear expression of p53 in mature tumor endothelium of retinoblastoma. *Oncology Reports*. 2014; 32: 801–807.
- [17] Köbel M, Ronnett BM, Singh N, Soslow RA, Gilks CB, McCluggage WG. Interpretation of P53 Immunohistochemistry in Endometrial Carcinomas: toward Increased Reproducibility. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2019; 38: S123–S131.
- [18] Tchelebi L, Ashamalla H, Graves PR. Mutant p53 and the Response to Chemotherapy and Radiation. *Subcellular Biochemistry*. 2014; 57: 133–159.
- [19] Assoun S, Theou-Anton N, Nguenang M, Cazes A, Danel C, Abbar B, *et al*. Association of TP53 mutations with response and longer survival under immune checkpoint inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2019; 132: 65–71.
- [20] Zhao L, Qu X, Wu Z, Li Y, Zhang X, Guo W. TP53 somatic mutations are associated with poor survival in non-small cell lung cancer patients who undergo immunotherapy. *Aging*. 2020; 12: 14556–14568.
- [21] Carlisle JW, Nho NT, Kim C, Chen Z, Li S, Hill C, *et al*. Impact of TP53 mutations on efficacy of PD-1 targeted immunotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Journal of Clinical Oncology*. 2018; 36: e21090–e21090.
- [22] Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, *et al*. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2015; 373: 123–135.
- [23] Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, *et al*. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsqua-

- mons Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2015; 373: 1627–1639.
- [24] Kim CH, Lee HS, Park JH, Choi JH, Jang SH, Park YB, *et al*. Prognostic role of p53 and Ki-67 immunohistochemical expression in patients with surgically resected lung adenocarcinoma: a retrospective study. *The Journal of Thoracic Disease*. 2015; 7: 822–833.
- [25] Kang EY, Cheasley D, LePage C, Wakefield MJ, da Cunha Torres M, Rowley S, *et al*. Refined cut-off for TP53 immunohistochemistry improves prediction of TP53 mutation status in ovarian mucinous tumors: implications for outcome analyses. *Modern Pathology*. 2021; 34: 194–206.
- [26] Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csösz T, Fülöp A, *et al*. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2016; 375: 1823–1833.
- [27] Park K, Özgüroğlu M, Vansteenkiste J, Spigel D, Yang JCH, Ishii H, *et al*. Avelumab Versus Docetaxel in Patients with Platinum-Treated Advanced NSCLC: 2-Year Follow-up from the JAVELIN Lung 200 Phase 3 Trial. *Journal of Thoracic Oncology*. 2021; 16: 1369–1378.
- [28] Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih IM, *et al*. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Modern Pathology*. 2011; 24: 1248–1253.
- [29] Psyri A, Kountourakis P, Yu Z, Papadimitriou C, Markakis S, Camp RL, *et al*. Analysis of p53 protein expression levels on ovarian cancer tissue microarray using automated quantitative analysis elucidates prognostic patient subsets. *Annals of Oncology*. 2007; 18: 709–715.
- [30] Singh N, Piskorz AM, Bosse T, Jimenez-Linan M, Rous B, Brenton JD, *et al*. P53 immunohistochemistry is an accurate surrogate for TP53 mutational analysis in endometrial carcinoma biopsies. *The Journal of Pathology*. 2020; 250: 336–345.
- [31] Kaye PV. P53 Immunohistochemistry as a biomarker of dysplasia and neoplastic progression in Barrett's oesophagus. *Diagnostic Histopathology*. 2015; 21: 89–98.
- [32] Raab SS. The cost-effectiveness of immunohistochemistry. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2000; 124: 1185–1191.
- [33] Marino P, Touzani R, Perrier L, Rouleau E, Kossi DS, Zhaomin Z, *et al*. Cost of cancer diagnosis using next-generation sequencing targeted gene panels in routine practice: a nationwide French study. *European Journal of Human Genetics*. 2018; 26: 314–323.
- [34] Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leigh N, Balmanoukian AS, Eder JP, *et al*. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2015; 372: 2018–2028.
- [35] Michel M, Kaps L, Maderer A, Galle PR, Moehler M. The Role of p53 Dysfunction in Colorectal Cancer and Its Implication for Therapy. *Cancers*. 2021; 13: 2296.
- [36] Hsiue EH, Wright KM, Douglass J, Hwang MS, Mog BJ, Pearlman AH, *et al*. Targeting a neoantigen derived from a common TP53 mutation. *Science*. 2021; 371: eabc8697.
- [37] Deniger DC, Pasetto A, Robbins PF, Gartner JJ, Prickett TD, Paria BC, *et al*. T-cell Responses to TP53 “Hotspot” Mutations and Unique Neoantigens Expressed by Human Ovarian Cancers. *Clinical Cancer Research*. 2018; 24: 5562–5573.
- [38] Sun H, Liu S, Zhou J, Xu J, Zhang H, Yan H, *et al*. Specific TP53 subtype as biomarker for immune checkpoint inhibitors in lung adenocarcinoma. *EBioMedicine*. 2020; 60: 102990.
- [39] Willis C, Fiander M, Tran D, Korytowsky B, Thomas J, Calderon F, *et al*. Tumor mutational burden in lung cancer: a systematic literature review. *Oncotarget*. 2019; 10: 6604–6622.
- [40] Ozaki Y, Muto S, Takagi H, Watanabe M, Inoue T, Fukuhara M, *et al*. Tumor mutation burden and immunological, genomic, and clinicopathological factors as biomarkers for checkpoint inhibitor treatment of patients with non-small-cell lung cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2020; 69: 127–134.
- [41] Gibney GT, Weiner LM, Atkins MB. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *The Lancet Oncology*. 2016; 17: e542–e551.
- [42] Okada Y, Hurwitz EE, Esposito JM, Brower MA, Nutt CL, Louis DN. Selection pressures of TP53 mutation and microenvironmental location influence epidermal growth factor receptor gene amplification in human glioblastomas. *Cancer Research*. 2003; 63: 413–416.

# ANEXO 3. COMUNICACIÓN PUBLICADA EN ANNALS OF ONCOLOGY (CONGRESO ESMO 2021)

Annals of Oncology

abstracts

**Legal entity responsible for the study:** The authors.

**Funding:** Has not received any funding.

**Disclosure:** A. Hernandez Calvo: Financial Interests, Personal, Other, Travel, Accommodations, Expenses: Merk Serono; Financial Interests, Personal, Other, Travel, Accommodations, Expenses: Kyowa Kirin International. D.V. Araujo: Financial Interests, Personal, Other, honoraria: GlaxoSmithKline. M. Oliva: Financial Interests, Personal, Advisory Role: Bristol Myers Squibb; Financial Interests, Personal, Other, Travel/Accommodation expenses: MSD Oncology; Financial Interests, Personal and Institutional, Research Grant: Mirati Therapeutics; Other, Personal, Other: Bristol Myers Squibb; Other, Personal, Other: Merck. L.L. Siu: Financial Interests, Institutional, Research Grant: Bristol-Myers Squibb; Financial Interests, Institutional, Research Grant: Genentech/Roche; Financial Interests, Institutional, Research Grant: GlaxoSmithKline; Financial Interests, Institutional, Research Grant: Merck; Financial Interests, Institutional, Research Grant: Novartis; Financial Interests, Institutional, Research Grant: Pfizer; Financial Interests, Institutional, Research Grant: MedImmune; Financial Interests, Institutional, Research Grant: AstraZeneca; Financial Interests, Institutional, Research Grant: Boehringer Ingelheim; Financial Interests, Institutional, Research Grant: Bayer; Financial Interests, Institutional, Research Grant: Amgen; Financial Interests, Institutional, Research Grant: Astellas Pharma; Financial Interests, Institutional, Research Grant: Shattuck Labs; Financial Interests, Institutional, Research Grant: Symphogen; Financial Interests, Institutional, Research Grant: AVID Radiopharmaceuticals; Financial Interests, Institutional, Research Grant: Mirati Therapeutics; Financial Interests, Institutional, Research Grant: Intensity Therapeutics; Financial Interests, Institutional, Research Grant: Karyopharm Therapeutics; Financial Interests, Personal, Stocks/Shares, An Immediate Family Member: Agios; Financial Interests, Personal, Leadership Role, An Immediate Family Member: Treadwell Therapeutics; Financial Interests, Personal, Advisory Role: Merck; Financial Interests, Personal, Advisory Role: AstraZeneca/MedImmune; Financial Interests, Personal, Advisory Role: MorphoSys; Financial Interests, Personal, Advisory Role: Roche; Financial Interests, Personal, Advisory Role: Loxo; Financial Interests, Personal, Advisory Role: Voronoi; Financial Interests, Personal, Advisory Role: Oncorus; Financial Interests, Personal, Advisory Role: Symphogen; Financial Interests, Personal, Advisory Role: Mirati Therapeutics; Financial Interests, Personal, Advisory Role: GlaxoSmithKline; Financial Interests, Personal, Advisory Role: Seattle Genetics; Financial Interests, Personal, Advisory Role: Treadwell Therapeutics; Financial Interests, Personal, Advisory Role: Arvinas; Financial Interests, Personal, Advisory Role: Navire; Financial Interests, Personal, Advisory Role: Janpix; Financial Interests, Personal, Advisory Role: Relay Therapeutics; Financial Interests, Personal, Advisory Role: Daiichi Sankyo/UCB Japan. All other authors have declared no conflicts of interest.

<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.08.1386>

## 1003P Expression by immunohistochemistry of p53 tumor suppressor protein as a predictive biomarker of response to immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer

A. Olivares Hernández<sup>1</sup>, E. del Barco<sup>2</sup>, L. Figueroa Pérez<sup>3</sup>, R.A. Escala Cornejo<sup>4</sup>, M.C. Parra Pérez<sup>5</sup>, A. Rodrigues Franço<sup>6</sup>, L. Bellido Hernández<sup>7</sup>, R. Vidal Tocino<sup>1</sup>, E. Escalera Martín<sup>8</sup>, J. Claros Ampuero<sup>9</sup>, E. Terán Brage<sup>1</sup>, A. López Gutiérrez<sup>1</sup>, M.D. Ludeña de la Cruz<sup>2</sup>, J.J. Cruz-Hernández

<sup>1</sup>Medical Oncology Department, IBSAL - Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>2</sup>Oncology, Hospital Clínico Universitario Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>3</sup>Medical Oncology, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>4</sup>Medical Oncology Department, Complejo Asistencial de Avila - Hospital Nuestra Señora de Sonsoles Urgencias, Avila, Spain; <sup>5</sup>Pathology, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>6</sup>Medical Oncology, Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain; <sup>7</sup>Medical Oncology, Hospital Clínico Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain

**Background:** The determination of predictive biomarkers for immune checkpoint inhibitors (ICIs) is one of the current challenges in oncology. At present, we are unaware of the existence of response patterns to ICIs. Different studies of non-small cell lung cancer (NSCLC) have shown how mutations in the TP53 gene correlate with different responses to ICIs. Strong and diffuse immunoeexpressions of p53 by immunohistochemistry (IHC) are generally interpreted as a likely indicator of a TP53 gene mutation. The objective of this study is to assess the expression of p53 protein via ICH in NSCLC as a predictive biomarker of response to ICIs.

**Methods:** Retrospective hospital-based study of patients with NSCLC who were treated with Nivolumab in the Department of Oncology of the University Hospital of Salamanca. All diagnostic biopsies were studied via IHC by measuring the expression of the p53 protein. A survival correlation (Kaplan-Meier, Log Rank test, SPSSv25) was performed by subgroups of p53 expression in months (m). Statistical significance was established a priori at p<0.05.

**Results:** In all, 73 biopsies were studied (36 adenocarcinoma, 34 squamous, 3 undifferentiated). In 47 (64.4%) biopsies, the cellular expression of p53 was <10% (Group A or A), and in 26 (35.6%) it was ≥10% (group B or B). No differences were observed in progression-free survival (PFS) (A 4m vs B 7m; p=0.181) or overall survival (OS) (A 12m vs B 20m; p = 0.149). Statistically significant differences were observed in PFS when the groups in PDL1≥10% were compared (A 5m vs B not reached median; p=0.047), and in OS (A 9m vs B not reached median; p=0.02). No differences were observed in PFS (A 4m vs B 4m; p=0.925) or OS (A 13m vs B 9m; p=0.972) in PDL1<10%.

**Conclusions:** Despite the limited nature of our sample, a trend towards a greater response to ICIs was observed in PFS and OS in patients with a high expression of p53 protein (TP53 gene mutation) and PDL1≥10%. Mutations in TP53 appear to show a correlation with the response to ICIs in tumours with high expression of PDL1. New studies are needed in the future to assess the expression of p53 via ICH as a new predictive marker of response to ICIs in NSCLC and other solid tumours.

**Legal entity responsible for the study:** The authors.

**Funding:** Has not received any funding.

**Disclosure:** All authors have declared no conflicts of interest.

<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.08.1387>

## 1004P Initial results from a phase I study of Nous-209, an off-the-shelf viral vectored immunotherapy encoding 209 shared frame shift peptide neoantigens, with pembrolizumab, for the treatment of tumors with a deficiency in mismatch repair/microsatellite instability

M.J. Overman<sup>1</sup>, G. Leoni<sup>2</sup>, A.M. D'Alise<sup>3</sup>, G. Cotugno<sup>4</sup>, F. Langone<sup>5</sup>, S. Capone<sup>6</sup>, M. Del Sorbo<sup>7</sup>, M. Fakhri<sup>8</sup>, D.T. Le<sup>9</sup>, A.F. Shields<sup>9</sup>, K.S. Pedersen<sup>9</sup>, M.A. Shah<sup>10</sup>, S. Mukherjee<sup>11</sup>, P. Delaite<sup>12</sup>, T. Faivre<sup>12</sup>, E. Scarselli<sup>13</sup>

<sup>1</sup>Medicine Oncology, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA; <sup>2</sup>Bioinformatic, Nouscom SRL, Rome, Italy; <sup>3</sup>Immunology, Nouscom SRL, Rome, Italy; <sup>4</sup>Vectorology, Nouscom SRL, Rome, Italy; <sup>5</sup>Immunology, Reithera SRL, Rome, Italy; <sup>6</sup>Department of Medical Oncology & Therapeutics Research, City of Hope Comprehensive Cancer Center, Duarte, CA, USA; <sup>7</sup>Medicine Oncology, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA; <sup>8</sup>Medicine Oncology, Barbara Ann Karmanos Cancer Center, Detroit, MI, USA; <sup>9</sup>Medicine Oncology, Washington University School of Medicine, St Louis, MO, USA; <sup>10</sup>Medicine Oncology, Weill-Cornell Medical Center, New York, NY, USA; <sup>11</sup>Internal Medicine Department, Roswell Park Comprehensive Cancer Center, Buffalo, NY, USA; <sup>12</sup>Clinical Department, Nouscom AG, Basel, Switzerland; <sup>13</sup>Nouscom SRL, Rome, Italy

**Background:** Defective DNA mismatch repair (dMMR) leads to high levels of microsatellite-instability (MSI-H) and insertions or deletions in coding regions, resulting in the generation of tumor-specific frameshift peptides (FSPs). We selected 209 shared FSPs among patients with first- or second-line metastatic dMMR/MSI-H colorectal (CRC), gastric, and gastroesophageal junction (GEJ) cancers, to develop an off-the-shelf therapeutic vaccine. Nous-209, is a polyvalent viral vectored vaccine composed of 4 Great Apes Adenoviral (GAd) and 4 Modified Vaccinia Ankara (MVA) vectors (Leoni et al, Cancer Res. 2020).

**Methods:** Objectives of this phase I first in human (FIH) study (NCT04041310) of Nous-209 and pembrolizumab, a programmed death receptor-1 (PD-1)-inhibitor, include evaluation of safety, tolerability, immunogenicity, and preliminary efficacy of the combination. Nous-209 is administered intramuscularly, concomitantly with pembrolizumab (doses and schedule per approved label): 1 prime (GAd-209-FSP) at the 2<sup>nd</sup> pembrolizumab infusion and 3 booster (MVA-209-FSP) injections at subsequent infusions each 3 weeks apart. The study is composed of two sequential cohorts: dose escalation and dose expansion.

**Results:** The first six patients (CRC, n=3; gastric and GEJ, n=3) were enrolled equally in two dose levels with median follow-up of 12.9 months (range 8.0 -19.0 months) as of April 30, 2021. No dose limiting toxicities (DLTs) were observed, and the treatment combination appears to be safe and tolerable. Vaccine immunogenicity was demonstrated by ex-vivo interferon-gamma ELISPOT assay in 83% of patients. RECIST1.1 overall response rate was 67%: 4 partial responses (PR), 1 stable disease (SD) and 1 progressive disease (PD).

**Conclusions:** Combination of the Nous-209 genetic polyvalent cancer vaccine and pembrolizumab has been demonstrated to be safe, immunogenic, and has early signs of clinical efficacy, which may be attributed to the relative vaccine contribution.

**Clinical trial identification:** NCT04041310.

**Legal entity responsible for the study:** Nouscom AG.

**Funding:** Nouscom AG.

**Disclosure:** G. Leoni: Financial Interests, Personal, Full or part-time Employment: Nouscom SRL. A.M. D'Alise: Financial Interests, Personal, Full or part-time Employment: Nouscom SRL. G. Cotugno: Financial Interests, Personal, Full or part-time Employment: Nouscom SRL. F. Langone: Financial Interests, Personal, Full or part-time Employment: Nouscom SRL. S. Capone: Financial Interests, Personal, Full or part-time Employment: Reithera SRL. M. Del Sorbo: Financial Interests, Personal, Full or part-time Employment: Reithera SRL. P. Delaite: Financial Interests, Personal, Full or part-time Employment: Nouscom AG. T. Faivre: Financial Interests, Personal, Full or part-time Employment: Nouscom AG. E. Scarselli: Financial Interests, Personal, Full or part-time Employment: Nouscom SRL. All other authors have declared no conflicts of interest.

<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.08.1388>

## ***ANEXO 4. TNM CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO***

### ***T – Tumor primario***

Tx	El tumor primario no se puede caracterizar.
T0	No evidencia de tumor primario.
T1	Tumor de 3 centímetros o menos de diámetro máximo, rodeado de parénquima pulmonar o pleural visceral, sin contacto con el bronquio principal.
T1a (mi)	Adenocarcinoma mínimamente invasivo.
T1a	Tumor de 1 centímetro o menos de diámetro máximo.
T1b	Tumor mayor a 1 centímetro, pero menor a 2 centímetros.
T1c	Tumor mayor a 2 centímetros, pero menor a 3 centímetros.
T2	Tumor mayor a 3 centímetros, pero menor a 5 centímetros; o tumor con una de las siguientes características: envuelve al bronquio principal (sin invasión de la carina), invade pleura visceral, asocia atelectasia u obstrucción que se extiende hasta la región hilar.
T2a	Tumor mayor de 3 centímetros, pero menor a 4 centímetros.
T2b	Tumor mayor de 4 centímetros, pero menor a 5 centímetros.
T3	Tumor mayor a 5 centímetros, pero menor a 7 centímetros o invasión directa de una de las siguientes estructuras: pared costal, nervio frénico, pericardio parietal o nódulo pulmonar metastásico en el mismo lóbulo que el primario.
T4	Tumor mayor a 7 centímetros o invasión de una de las siguientes estructuras: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpos

vertebrales, carina o nódulo pulmonar metastásico en un lóbulo diferente al primario, pero del pulmón ipsilateral.

---

***N – Afectación ganglionar***

---

Nx	No es posible caracterizar la afectación ganglionar.
N0	No afectación ganglionar.
N1	Metástasis ganglionares ipsilaterales peribronquiales o hiliares (incluidas las afectadas por invasión directa).
N2	Metástasis en ganglios mediastínicos o subcarinales ipsilaterales.
N3	Metástasis en ganglios mediastínicos o hiliares contralaterales o en ganglios escalénicos o supraclaviculares ipsilaterales.

---

***M – Afectación metastásica***

---

M0	No afectación metastásica.
M1	Metástasis a distancia
M1a	Nódulo pulmonar metastásico en pulmón contralateral o tumor con nódulos pleural o pericárdicos o existencia de derrame pleural o pericárdico maligno.
M1b	Metástasis única fuera del mediastino en un único órgano.
M1c	Múltiples lesiones metastásicas en uno o varios órganos.

---

***ANEXO 5. ESTADIAJE DEL CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO***

T/M	Subcategory	N0	N1	N2	N3
T1	T1a	IA1	IIB	IIIA	IIIB
	T1b	IA2	IIB	IIIA	IIIB
	T1c	IA3	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB
	T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T3	T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
M1	M1a	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c	IVB	IVB	IVB	IVB

## ANEXO 6. MODELO DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO



### COMPLEJO ASISTENCIAL DE SALAMANCA

#### ATENCIÓN ESPECIALIZADA

#### INFORMACIÓN Y AUTORIZACIÓN PARA TRATAMIENTOS MEDICOS ONCOLOGICOS

Se informa al paciente del diagnóstico y opciones de tratamiento. Se informa de efectos secundarios y toxicidad. Se aclaran dudas. Acepta y firma consentimiento informado. Queda original en papel en sobre de historia de oncología

#### DATOS DEL PACIENTE

---

#### DATOS DEL MÉDICO

---

Alejandro Olivares Hernández  
Nº COLEGIADO: 37/07524

#### SOLICITUD DE INFORMACIÓN

---

Deseo ser informado sobre mi enfermedad y la intervención que se me va a realizar.

<input checked="" type="checkbox"/>	SÍ
<input type="checkbox"/>	NO

#### DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO

- QUIMIOTERAPICO
- INMUNOTERAPICO
- ANTIDIANA MOLECULAR \_\_\_\_\_
- OTRO \_\_\_\_\_

#### DECLARACIONES Y FIRMAS

---

DECLARO: Que he sido informado con antelación y de forma satisfactoria por el médico del diagnóstico, pronóstico, alternativas terapéuticas, riesgos y beneficios del procedimiento que se me va a realizar.

- Que conozco y asumo los riesgos y/o secuelas que pudieran producirse por el tratamiento propiamente dicho o por la localización de la lesión, pese a que los médicos pongan todos los medios a su alcance para evitarlos.
- Que he leído y comprendido este escrito. Estoy satisfecho con la información recibida, he formulado todas las preguntas que he creído conveniente y me han aclarado todas las dudas planteadas.
- Que se me ha informado de la posibilidad de utilizar el procedimiento en un proyecto docente o de investigación sin que comporte riesgo adicional sobre mi salud.
- Que se me ha informado de la posibilidad de utilizar utilizarán mis muestras y datos personales (estudios genéticos, de salud pública o estadísticos, que cumplan todos los requisitos que exige la ley) para estudio de biopsia líquida en sangre periférica para lo cual se podrán extraer muestras de sangre periférica coincidiendo con extracciones de analítica rutinaria y de manera excepcional extracción fuera de la práctica clínica habitual y que me puedo negar en cualquier momento a que sean realizados y utilizados. También se podrán utilizar muestras de orina para estudios de toxicidad o marcadores biológico de respuesta.
- También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar ninguna explicación, puedo revocar el consentimiento que ahora presto, con sólo comunicarlo al equipo médico.

#### FECHA Y FIRMA DEL CONSENTIMIENTO

---

Fecha: \_\_\_\_\_

FIRMA DEL MÉDICO

FIRMA DEL PACIENTE