



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Utilidad de los biomarcadores para la valoración de los tratamientos en inmunoterapia del cáncer.

Usefulness of biomarkers for the evaluation of cancer immunotherapy treatments.

Autora:

Patricia Lizama Pérez

Director:

Luis Martínez Lostao

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública

Área de Inmunología

2019

INDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	III
RESUMEN/ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	3
<i>Relación entre el sistema inmune y el cáncer.</i>	3
<i>Mecanismos tumorales de escape del sistema inmune.</i>	6
<i>Tratamientos de inmunoterapia.</i>	9
<i>Inmunoterapia basada en PD-1 y PD-L1.</i>	12
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	14
RESULTADOS	16
<i>Biomarcadores predictivos de respuesta inmunoterápica</i>	16
EXPRESIÓN DE PD-L1 EN LAS CÉLULAS TUMORALES.	17
TMB	19
NEOANTÍGENOS Y MUTACIONES TUMOR-ESPECÍFICAS.	21
MICROAMBIENTE TUMORAL	23
MICROBIOTA INTESTINAL Y ORAL	24
BIOMARCADORES DE SANGRE PERIFÉRICA	25
<i>Biomarcadores de respuesta y de resistencia al tratamiento.</i>	26
<i>Nuevas perspectivas de utilización de los biomarcadores</i>	27
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXOS	37
<i>Anexo 1</i>	37
<i>Anexo 2</i>	38
<i>Anexo 3</i>	39
<i>Anexo 4</i>	40

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- **ALK:** *Anaplastic lymphoma kinase*
- **ANGPT:** *Angiogenic factors angiopoietin*
- **APC:** *Antigen-presenting cell*
- **BRAF:** *V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*
- **CARTs:** *T cells Chimeric Antigen Receptors*
- **CAR-NK:** *NK cells Chimeric Antigen Receptors*
- **CB:** *Clinic benefit*
- **ctDNA:** *Circulating tumor DNA*
- **CTLA-4:** *Cytotoxic T lymphocyte associated protein 4*
- **DAMP:** *Damage-associated molecular patterns*
- **DC:** *Dendritic cells*
- **EGFR:** *Epidermal Growth Factor Receptor*
- **FcR:** *Crystallizable fragment*
- **FDA:** *Food and Drug Administration*
- **GAs:** *Genetic alterations*
- **HER2:** *Human epidermal growth factor receptor 2*
- **IDO1:** *Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1*
- **IFN- γ :** *Gamma interferon*
- **IgG:** *Inmunoglobulin G*
- **irPFS:** *Immune-related progression-free survival*
- **irRC:** *Immune-related response criteria*
- **JAK:** *Janus Kinase*
- **KRAS:** *KAY-ras jeen*
- **LDH:** *Lactate dehydrogenase*
- **MAPK:** *The Mitogen-Activated Protein Kinase*
- **MHC:** *Major histocompatibility complex*
- **MMR** (protein or gen): *Mismatch repair*
- **MSI:** *Microsatellite instability*
- **MYC:** *Myelocytomatosis oncogene*
- **NF- κ B:** *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
- **NGS:** *Next Generation Sequencing*
- **NK** (Lymphocyte): *Natural Killer*
- **NLR:** *Neutrophil-to-lymphocyte ratio*
- **NR:** *No responders*
- **PBMCs:** *Peripheral blood mononuclear cells*
- **PD-1:** *Programmed cell death protein 1*
- **PD-L1:** *Programmed cell death-ligand protein 1*
- **PI3K:** *Phosphatidylinositol 3-kinase*
- **RAS:** *Rat Sarcoma (Oncogen)*
- **RECIST:** *The Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*
- **STING:** *Stimulator of interferon genes*
- **STK11:** *Serine/threonine kinase 11*
- **TAMs:** *Tumor-associated macrophages*
- **TCGA:** *The Cancer Genome Atlas*
- **TCR:** *T-cell antigen receptor*
- **TILs:** *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*
- **TMB:** *Tumor mutational burden*
- **TNF:** *Tumor necrosis factor*
- **TLR:** *Toll-like receptor*
- **USD:** *U.S. Dollar*
- **VEGF:** *Vascular endotelial growth factor*
- **WES:** *Whole-exome sequencing*

RESUMEN

El empleo de tratamientos inmunoterápicos contra el cáncer es una alternativa terapéutica cada vez más habitual en la práctica clínica. En concreto, las terapias basadas en el bloqueo de los *immune checkpoints* se presentan como una opción eficaz frente a otros tratamientos más agresivos, tóxicos o que han mostrado resistencias con anterioridad en pacientes con distintos tipos de cáncer.

Sin embargo, la efectividad de este tipo de terapias no siempre es la esperada, ya que en ocasiones la tasa de respuesta es escasa. Puesto que se trata de terapias que implican un moderado riesgo de toxicidad y un alto coste, ha surgido la necesidad de desarrollar y validar biomarcadores que permitan predecir en qué pacientes la relación riesgo/beneficio es suficiente como para administrar este tipo de tratamientos.

A lo largo de este trabajo de revisión se valorarán los biomarcadores predictivos de respuesta y los biomarcadores de resistencia más importantes desarrollados en la actualidad, su mecanismo de acción, sus ventajas y sus limitaciones. En concreto, en el presente trabajo se analizarán la expresión de PD-L1, la TMB, las alteraciones en el microambiente tumoral por la variación en las concentraciones de IFN- γ , LDH, IDO1, los linfocitos T CD8+ y las mutaciones concretas de algunos oncogenes.

PALABRAS CLAVE: *Puntos de control inmune, Biomarcador, Expresión de PD-L1, TMB, Tumor inmunogénico, Inmunoterapia.*

ABSTRACT

The use of immunotherapeutic treatments in cancer is a very common therapeutic choice in clinical practice. Specifically, therapies based on the immune checkpoint blockade are an effective option against other treatments that turn out to be more aggressive, toxic or that have shown resistance on patients with cancer.

However, the rate of response in these therapies not always is high. Since these treatments involve a moderate risk of toxicity and are expensive, it is necessary to develop and validate different biomarkers in order to predict in which patients the risk/benefit ratio is enough for dispensing these treatments.

The purpose of this work is to evaluate the most important predictive biomarkers of response and resistance, their mechanism of action, their advantages and limitations. In particular, the present study will analyze the expression of PD-L1, TMB, alterations in the tumor microenvironment due to the variation in the concentration of IFN- γ , LDH, IDO1, CD8+ T lymphocytes and the specific mutations of some oncogenes.

KEY WORDS: *Immune checkpoint, Biomarker, PDL1 expression, TMB, Immunogenic tumor, Immunotherapy*

INTRODUCCIÓN

Relación entre el sistema inmune y el cáncer.

Es plenamente conocido que la función principal del sistema inmune es la detección y eliminación de “elementos” extraños, conocidos como antígenos, que generan “señales de peligro”; así como no responder a los autoantígenos “no peligrosos”. En el caso de las células tumorales, las mutaciones genéticas que presentan, conllevan en ocasiones la generación de nuevos antígenos; además de que habitualmente producen “señales de peligro” que pueden activar al sistema inmune.¹

Este supuesto conformó el punto de partida de una línea de investigación, iniciada por *Paul Erlich*, quien sostuvo la potencial importancia del sistema inmune en la detección de procesos tumorales. Sin embargo, el desarrollo más importante se produjo en la década de 1950, momento en el que la inmunología tuvo un gran apogeo. Serían *Macfarlane Burnet* y *Lewis Tomas* quienes, en 1957 desarrollarían la teoría de la **inmunovigilancia tumoral**. Esta teoría postulaba que el sistema inmune no solo tenía la finalidad de defender al organismo frente a agentes externos dañinos, sino que también tenía un papel fundamental en la defensa frente a los agentes dañinos propios, es decir, las neoplasias. Además, añadía que eran los linfocitos los encargados de reconocer y eliminar estas células cancerosas.

Sin embargo, los ensayos que se realizaron no fueron concluyentes en cuanto a la existencia de este proceso, de manera que los postulados de inmunovigilancia fueron desechados y abandonados desde finales de los 70, no siendo hasta finales de los 90 cuando se reconsideró esta teoría. Finalmente, se pudo constatar experimentalmente con el empleo de ratones *Knock-Out* deficientes en moléculas clave en la defensa inmunológica. En estos estudios se demostró que la ausencia de un sistema inmune competente propiciaba la generación de tumores con una mayor incidencia que en los animales con un sistema inmune completamente funcional. Es por ello, que la teoría de la inmunovigilancia antitumoral pasó a ser un hecho experimentalmente constatado.

Ahora bien, posteriores estudios sirvieron para demostrar que la relación entre el sistema inmune y el cáncer era más compleja que la inicialmente demostrada en la inmunovigilancia antitumoral. Fue entonces cuando se vio que en el momento que se inicia la respuesta inmune contra el tumor, se producen una serie de procesos, por parte del mismo, que forjan el desarrollo tumoral, concluyendo en la selección de las variantes celulares tumorales que presentan un fenotipo menos inmunogénico.

Esto se produce porque el sistema inmune elimina las células tumorales que superan un umbral de inmunogenicidad, persistiendo aquellas células cancerosas que promueven la tolerancia inmunológica, bien porque evaden el control inmune o bien porque adquieren mecanismos que lo suprimen. Este fracaso de la respuesta inmune ya lo observó *Paul Ehrlich*, quien, a principios del siglo XX, observó que ratones con tumores en crecimiento eran muy resistentes a una segunda exposición tumoral, a pesar de que el primer tumor siguiese desarrollándose. A este fenómeno se le denominó **inmunidad concomitante**, de manera que mientras que en el tumor primario la respuesta inmune terminaba por proteger al tumor, en otros tumores nacientes, esta respuesta era suficiente como para eliminar el tumor completamente (únicamente en los 7-10 primeros días tras implantarse el tumor, momento en el que se incrementa la infiltración de linfocitos).²

Debido a que la relación del sistema inmune con la enfermedad neoplásica es más compleja de lo que se creía anteriormente, fueron *Dunn et al* quienes proponen rebautizar el concepto con el nombre de **inmunoedición tumoral**. Esta inmunoedición del cáncer se entiende como el conjunto de interacciones que se establecen entre el tumor y el sistema inmune y que pueden finalizar en dos posibles escenarios: la eliminación completa del tumor o el paso a una situación de tolerancia frente al mismo. En este proceso de inmunoedición tumoral encontramos tres fases conocidas como “las tres Es de la inmunoedición tumoral”: **eliminación, equilibrio y evasión** (véase Figura 1).^{1,3}

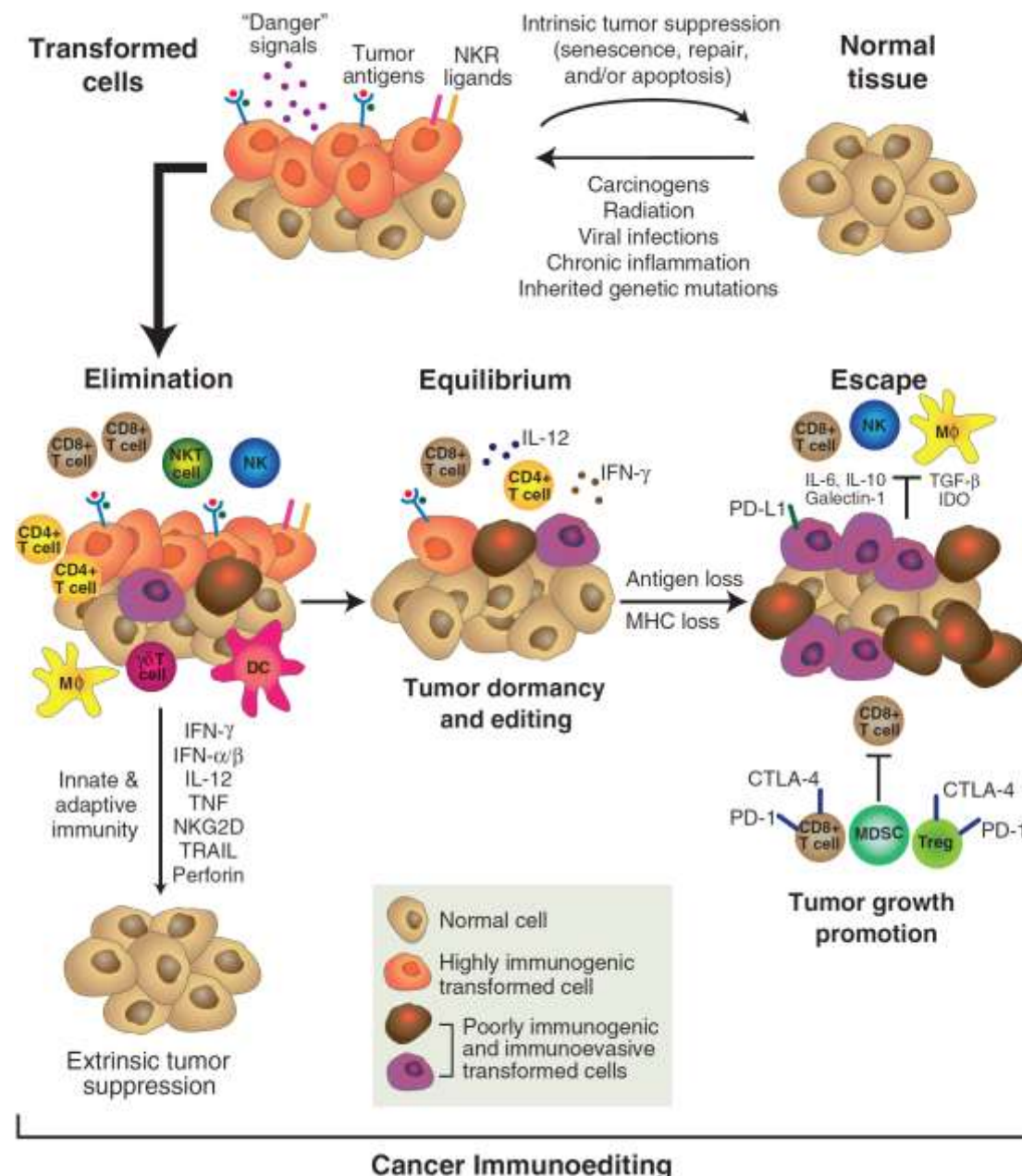


Figura 1- Esquema que muestra "las tres Es de la inmunoedición tumoral" y todos los elementos que forman parte de este proceso.²

En la primera fase, **la fase de eliminación**, se genera una respuesta antitumoral a expensas de la inmunidad innata inicial y posteriormente de una respuesta inmune adaptativa, en la que resulta imprescindible una respuesta de linfocitos T (principalmente CD8+ citotóxicos) frente a antígenos específicos del tumor.⁴

La **respuesta innata** se produce principalmente por las células NK, que detectan cambios producidos por las células neoplásicas (por ejemplo, la ausencia de ciertas señales inhibitorias o la activación de señales de estrés) y generan una respuesta citotóxica frente a las células tumorales mediante diferentes mecanismos (secreción de perforina/granzima B, expresión de los ligandos de muerte de la familia del TNF,...) produciendo la apoptosis de las mismas.³ Otras células que participan en la respuesta innata son los TAM, que aparecen en todas las fases de la progresión desde que son reclutados a la zona tumoral. Se encargan de la fagocitosis de antígenos. También podemos encontrar DC, que se encargan fagocitar y presentar antígenos detectando también señales de daño celular (DAMP) que ponen en marcha una respuesta pro-inflamatoria que favorecerá la respuesta inmune adaptativa posterior.⁵ En cuanto al desarrollo de la **respuesta adaptativa**, es necesaria una presentación de antígenos acompañada de ciertas señales que impidan que se produzca tolerancia hacia los propios antígenos del tumor, además de otras señales pro-inflamatorias que activen los linfocitos T.⁶ De esta manera, los linfocitos T son parte fundamental del proceso, pudiendo eliminar células tumorales que expresan neoantígenos inmunogénicos.⁷

Si en la primera fase no se elimina completamente el tumor, se puede llegar a una **fase de equilibrio**. Las primeras evidencias de la existencia esta fase, surgieron cuando, en ratones inmunocompetentes, se les administró el carcinógeno MCA a dosis bajas y se vio que, aunque las células tumorales se mantenían de forma prolongada, no llegaban a formar un tumor clínicamente aparente. Sin embargo, al administrar anticuerpos contra los linfocitos T e IFN- γ , de forma brusca se formaban tumores en el lugar de la inoculación.⁸ Esto demuestra la importancia de la inmunidad adaptativa en el control del desarrollo tumoral (principalmente los linfocitos T). Durante esta fase se produce un equilibrio entre el crecimiento de las células tumorales y la respuesta inmune desarrollada alrededor, en el que el sistema inmune es capaz de controlar el tumor (eliminando las variantes inmunogénicas o retrasando el desarrollo del tumor) pero sin conseguir eliminarlo por completo. Así, se produce una selección en la que únicamente sobreviven aquellas células que o bien no presentan antígenos reconocibles por el sistema inmune, o bien generan mecanismos de evasión al control inmune configurando un microambiente tumoral que desencadenará la última fase.^{1,2,3,4}

Los mecanismos que favorecen el desarrollo y mantenimiento de esta fase no son conocidos con exactitud, pero sí que se sabe que existe un balance entre las células que se encuentran en el microambiente tumoral, por una parte células pro-inflamatorias (linfocitos T CD8+, células NK, linfocitos T $\gamma\delta$,...) que promueven la eliminación del tumor y por otra, células anti-inflamatorias (linfocitos T reguladores macrófagos M2, células mieloides supresoras,...) que limitan la eliminación de las células tumorales. En este escenario, el sistema inmune no es capaz de eliminar el tumor ni el tumor de evadirse completamente del propio sistema inmune.^{4,9}

Por último, se produce la **fase de escape**, en el que las variantes tumorales que han sobrevivido presentan mecanismos de resistencia a la eliminación inmunológica o han generado un microambiente tumoral inmunosupresor. Así, el microambiente tumoral posee un sistema inmune que muestra tolerancia al tumor y éste puede expandirse y desarrollarse de forma descontrolada, momento en el que se manifiesta de forma clínica.

Los mecanismos de escape se pueden producir, por una parte, porque los linfocitos T no son capaces de reconocer los antígenos tumorales (por secuestro del antígeno o por una inadecuada presentación del antígeno en los ganglios linfáticos), por otra parte, por la incapacidad de generación de señales de coestimulación apropiadas (pese a la presentación antigénica adecuada), también, por agotamiento del sistema inmune (que se ve incapaz de proliferar o secretar citoquinas para generar una respuesta antitumoral completa) y, por último, por una supresión directa de estos linfocitos por parte de otras células o de ciertos receptores de membrana, que inhiben su activación y/o proliferación.¹⁰

Mecanismos tumorales de escape del sistema inmune.

Como se ha indicado anteriormente, en la última fase de la inmuoedición tumoral, la **fase de escape**, el tumor es capaz de evadir las barreras de defensa del sistema inmune y crecer de forma descontrolada, manifestándose entonces clínicamente. En esta fase influyen diferentes mecanismos, que podemos englobar en tres apartados: i) los que se producen por cambios en las **células tumorales**; ii) los que se derivan de cambios en el **microambiente tumoral**; y, iii) los que se producen por alteraciones en las **células del sistema inmune**.

En primer lugar, encontramos los mecanismos de evasión derivados de **cambios en las células tumorales**, que actúan generando un microambiente antiinflamatorio. Un ejemplo de esto es la vía de señalización NF-κB, un factor de transcripción que se ha asociado con la progresión tumoral. La transcripción de este factor genera un incremento en la expresión de citoquinas que inhiben el sistema inmune. Ahora bien, los efectos inmunomoduladores de esta vía de señalización dependen en gran medida del microambiente tumoral ya existente y de la presencia o no de otros agentes inmunosupresores. Así, se ha visto que la actividad de este factor se incrementa con la pérdida de la proteína p53, y, del mismo modo, la activación de p53 disminuye la concentración de NF-κB.^{11,12}

En ese mismo sentido, también existen oncogenes que controlan el microambiente tumoral. Un ejemplo estudiado en varios tipos de tumores es el oncogén *MYC*, que regula un gran número de procesos esenciales de la célula y, además, es clave en la inmunogenicidad tumoral. Se observó que la inhibición del oncogén *MYC* en islotes tumorales establecidos generaba una regresión tumoral, así como una disminución de los neutrófilos y macrófagos infiltrantes del tumor. Por otra parte, su activación estimuló la producción de citoquinas proinflamatorias (CCL5, IL-1, ...), lo que facilita la angiogénesis.¹¹ Otro ejemplo de oncogenes que producen alteraciones en el microambiente tumoral es la mutación del oncogén *RAS*, asociado al tumor de células mieloides y cáncer de páncreas, que induce la expresión de IL-6 y la producción de citoquinas que fomentan la progresión e infiltración tumoral.¹³

En segundo lugar, este **microambiente tumoral inflamatorio** participa tanto en la formación como en el desarrollo de los tumores. Para poder entender por qué se produce este fenómeno, en apariencia contradictorio, es necesario diferenciar entre este tipo de inflamación crónica, producida por el desarrollo tumoral y que conlleva alteraciones en el sistema inmune, por un proceso de extenuación celular, que lo prácticamente lo inactivan; y la respuesta aguda del propio sistema inmune, mediante una activación de diversas células debido al reconocimiento de DAMP generadas por el tumor y que sí actuará intentando eliminar las células tumorales.

Las células más abundantes en este microambiente tumoral son los TAM y los linfocitos T. Además de éstas, podemos encontrar otras células que también tienen un papel clave en el proceso de inmunomodulación (neutrófilos, células B, mastocitos o células NK). Los TAM suponen aproximadamente un 50% de las células que componen el tumor y los podemos dividir en una subpoblación M1, con fenotipo proinflamatorio, que produce citoquinas como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12 o IL-23 e inicia una respuesta antitumoral, y M2, con fenotipo antiinflamatorio, que produce citoquinas como IL-10 o TGF β , que favorecen el microambiente inmunosupresor y facilita la progresión tumoral. En los tumores desarrollados existe un predominio de macrófagos M2.^{12,13}

Otro mecanismo de escape consiste en evitar que la inmunidad adaptativa, en concreto los linfocitos T, se recluten al microambiente tumoral, mediante la inhibición de citoquinas (CXCL9 y CXCL10) y otros mecanismos proinflamatorios, evitando así que se reúnan en una concentración suficiente en el microambiente tumoral como para generar una respuesta efectiva contra el tumor.

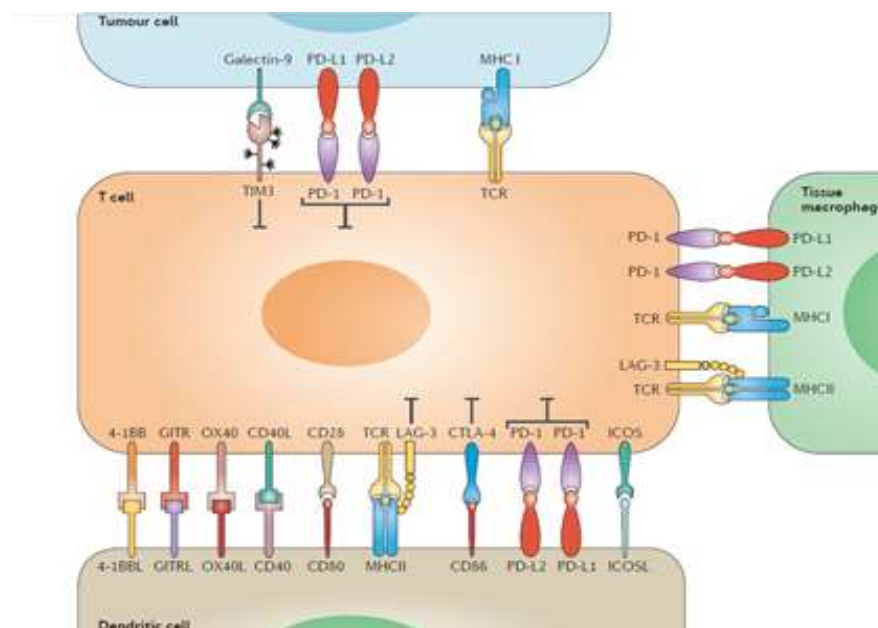
Por último, otro tipo de mecanismo de evasión viene determinado por las **células del sistema inmune**, cuya activación o inhibición en el microambiente tumoral resulta fundamental en el desarrollo y crecimiento del tumor.¹³

En cuanto a los mecanismos de activación de los linfocitos T, es preciso diferenciar entre los mecanismos de escape que se producen en los linfocitos T activados y los que se producen en los linfocitos T *naïve*.¹² La activación del linfocito T se desencadena por el reconocimiento de un antígeno en el MHC de las APC por parte del TCR del propio linfocito. Esta activación, requiere de la existencia de señales coestimuladoras, como la propiciada por CD80 y CD86, presentes en las APC, y CD28, presente en los linfocitos T. Estas señales potencian la activación del sistema inmune. De esta manera, con los linfocitos T activados, existen mecanismos de escape basados en la reducción de la inmunogenicidad, esto es, en hacer invisibles las células tumorales para el sistema inmune. Fueron *Robert Schreiber et al* quienes mostraron que los tumores que se producían en huéspedes inmunocompetentes presentaban una inmunogenicidad menor comparada con tumores cuyos huéspedes tenían una falta de inmunidad adaptativa. Posteriormente se demostró que esto se debe a que las células tumorales con una menor inmunogenicidad no son eliminadas por el sistema inmune^{12,14}

De esta manera, un mecanismo de evasión consiste en la inactivación de los linfocitos T ya activados. Así, se conoce la existencia de receptores que intervienen en la regulación del linfocito como son **CTLA-4** y **PD-1** que pertenecen a la familia del receptor CD28. Ambos se conocen como puntos de control del sistema inmune (**immune checkpoints**). Este tipo de receptores actúan en condiciones fisiológicas controlando la activación del sistema inmune, evitando la autorreactividad y los fenómenos de autoinmunidad contra los tejidos sanos.

CTLA-4, es un receptor de los linfocitos T, estructuralmente similar a CD28 presente en los linfocitos T, que se une a las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, de las APC, impidiendo la activación correcta de los linfocitos T y generando una situación de anergia. En tejidos sanos, esta inactivación de los linfocitos T impide fenómenos de autorreactividad celular, pero, sin embargo, en el microambiente tumoral genera una inmunosupresión y favorece la evasión tumoral.¹² **PD-1**, por su parte, es un receptor que regula la función de los linfocitos T previamente activados (nunca se expresa en linfocitos T *naïve*), aunque también se expresa en linfocitos B, células NK y algunos tipos de células mieloides y cancerígenas, protegiendo al organismo de respuestas inmunes exacerbadas, aumentando su expresión de forma progresiva durante el proceso de agotamiento de las funciones del linfocito T.¹³ La actuación de PD-1 se basa en la atenuación de la señal del TCR mediante la unión de PD-1 de los linfocitos T a su ligando PD-L1, lo que genera una señal bioquímica inhibitoria en el momento del reconocimiento del antígeno. Este tipo de receptores es comúnmente expresado en células T activadas de forma crónica, generando una señal inhibitoria de las mismas, lo que resulta en el desarrollo de un fenotipo disfuncional de linfocitos T.¹²

Entre las diferencias entre CTLA-4 y PD-1 se encuentran que el primero se confina a los linfocitos T, mientras que el segundo está expresado también en linfocitos B y células mieloides. Por otra parte, mientras que las funciones de CTLA-4 se producen en la primera fase de activación de los linfocitos, las funciones de PD-1 se producen en la fase efectora, predominantemente en tejido periférico (véase *Figura 2*).¹⁵



*Figura 2-Diferentes receptores y ligandos del microambiente tumoral, que permiten la interacción del linfocito T con el resto de células del microambiente tumoral. Se ve que mientras el ligando de CTLA-4, CD86, sólo está presente en las células dendríticas, y por lo tanto sólo puede inactivar los linfocitos T, el ligando PD-L1/PD-L2 se encuentra también en las células tumorales y en los macrófagos tisulares.*¹⁶

Existen diversos estudios que muestran una reducción en el crecimiento del tumor y un aumento de la supervivencia de los pacientes en aquellos tumores en los que se ha producido un bloqueo de los *immune checkpoints*. De esta manera, la utilización de anticuerpos monoclonales contra estos puntos de control celular es una estrategia terapéutica cada vez más utilizada en la actualidad.

Tratamientos de inmunoterapia.

Se pueden encontrar a lo largo de la literatura médica diferentes clasificaciones de las estrategias inmunoterápicas antitumorales, bien sea en función del tipo de agente inmunoterápico empleado (anticuerpos, citoquinas, células, ...) o en función del mecanismo de acción (la administración de moléculas inmunológicas o la inducción de la respuesta inmune del propio paciente). Según esta última clasificación, existen dos tipos de inmunoterapia, la **inmunoterapia pasiva**, que consiste en la transferencia a pacientes con tumores de moléculas o células inmunológicas capaces de reconocer y eliminar tumores, y la **inmunoterapia activa**, que consiste en la activación del propio sistema inmune del paciente con un tumor para que sea su sistema inmune quien combata el tumor (véase Figura 3).¹³

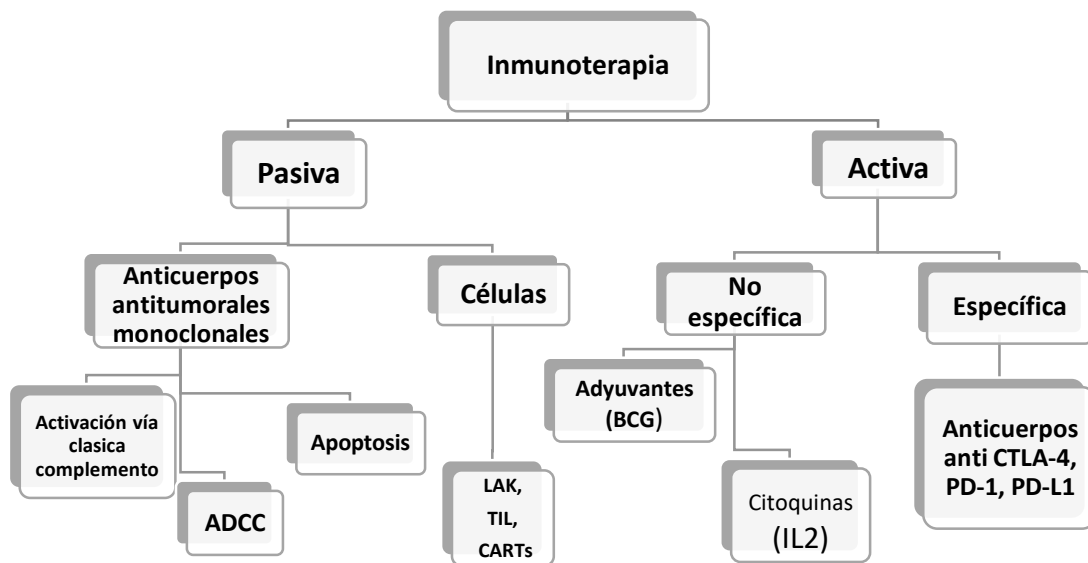


Figura 3-Esquema de las principales terapias inmunoterápicas en función del mecanismo de acción.

Dentro de la inmunoterapia pasiva, encontramos los **anticuerpos antitumorales monoclonales** de diferentes orígenes (murinos, quiméricos, humanizados o completamente humanos) que reconocen específicamente antígenos tumorales. Los mecanismos de acción dependen del tipo de IgG que sean (los más utilizados en oncología son de la clase IgG1), siendo los más importantes la: i) la muerte celular directa (apoptosis de la célula tumoral); ii) el impedimento del crecimiento celular bien por interferencia con receptores de membrana o interferencia con factores que favorecen la progresión tumoral; y, iii) la estimulación de la citotoxicidad del propio sistema inmune a través de los receptores de Fc presentes en las células NK, macrófagos y granulocitos o por la activación de la vía clásica del complemento.^{13,17,18} Además, hay que tener en cuenta que la apoptosis de las células tumorales puede liberar al microambiente tumoral antígenos intracelulares inaccesibles previamente para el sistema inmune, que generan una respuesta adaptativa persistente de linfocitos T citotóxicos de forma posterior.¹⁷

Son muy diversos los anticuerpos monoclonales empleados en oncología. Los más empleados en la actualidad son los dirigidos contra receptores de membrana como rituximab (anti-CD20) o contra factores de crecimiento como cetuximab (anti-EGFR), trastuzumab (anti-HER2) y bevacizumab (anti-VEGF).¹⁸

Por otra parte, encontramos los anticuerpos biespecíficos, que tienen afinidad por dos antígenos diferentes de forma concomitante. Un ejemplo de este tipo de terapia es el blinatumumab (anti-CD3/anti-CD19), que se emplea en leucemia linfoblástica aguda. De esta manera pueden activar directamente los linfocitos T mediante la unión a CD3 y unirse a las células tumorales a través de antígenos tumorales concretos como CD19 expresado en las células leucémicas.

Por último, también dentro de la inmunoterapia pasiva, encontramos la **inmunoterapia adoptiva**, que se realiza principalmente con linfocitos T, pudiendo emplear también las células NK. Este tipo de inmunoterapia adoptiva consiste a grandes rasgos en la extracción de células inmunes autólogas o heterólogas, su tratamiento *ex vivo* para potenciar su actividad antitumoral y su reinfusión en el paciente. La terapia con linfocitos T puede realizarse por la transferencia de TIL, que consiste en la extracción de linfocitos T directamente de una biopsia de un tumor, la expansión de los mismos hasta conseguir un elevado número de los mismos y la reinfusión en el organismo del paciente, tras un acondicionamiento previo (con citoquinas) que promueven su activación. Otro tipo de terapia son los CAR-T, en la cual se infunden linfocitos T, previamente extraídos de la sangre del paciente que se modifican genéticamente para presentar un receptor contra antígenos de un determinado tumor. En la actualidad se están ya desarrollando la terapia con CAR-NK.¹³

Dentro de la **inmunoterapia activa**, existe una inmunoterapia activa inespecífica como el empleo de **adyuvantes y citoquinas**, que son moléculas que activan la respuesta inmune inespecíficamente. Algunos de ellos, estimulan la liberación de antígenos, lo que favorece su reconocimiento por las APC y su activación.¹³

Algunos adyuvantes que estimulan la liberación de antígenos son los virosomas (partículas virales esféricas, con cápside y envoltura, pero sin material genético, que permite transportar antígenos inmunoestimuladores a los APC), los liposomas (de mayor eficacia antitumoral debido a su versatilidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad). El único aprobado en la clínica es la alúmina, un adyuvante basado en aluminio, fosfato o hidróxido de aluminio. Forma depósitos en el sitio de la inyección que permiten una liberación gradual y la interacción prolongada con las APC. Además, diversos estudios sugieren que induce también la muerte celular.¹³ Por otra parte, tenemos los adyuvantes inmunoestimuladores, que permiten impulsar la respuesta inmune para que sea capaz de controlar el crecimiento tumoral. Algunos ejemplos de este tipo de terapias son la vacunación *in situ*, en la que se realiza una administración intratumoral de un agente que actúe como antígeno tumoral e induzca una respuesta específica de los linfocitos T (por ejemplo, la BCG en el carcinoma *in situ* de vejiga).¹³

Las citoquinas son moléculas producidas por, entre otras, las células del sistema inmune y actúan como mensajeras del mismo en respuesta e agentes infecciosos o antígenos tumorales. Una citoquina especialmente importante en la producción de este microambiente inmunoestimulador tumoral es el **IFN-γ**, el cual se puede activar mediante diferentes adyuvantes, actualmente en desarrollo, como los ligandos de STING, los ligandos de TLR3, ligandos de TLR7, etc. Otra citoquina utilizada en este tipo de tratamientos es **IL-2**, cuyo efecto es potenciar la activación y diferenciación de los linfocitos T, así como la proliferación y activación de las células NK, teniendo en este caso un papel inmunoestimulador. Sin embargo, IL-2 también puede promover la diferenciación de los linfocitos T reguladores actuando entonces como inmunosupresor,

lo que es importante tener en cuenta a la hora de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento basadas en IL-2. Este tipo de tratamientos se administra tanto intravenoso a altas dosis como en pequeñas dosis subcutáneo.¹³

Por último, dentro de la inmunoterapia activa específica, se ha desarrollado una terapia consistente en el **bloqueo de los *immune checkpoints*** (PD-1, CTLA-4). Estas moléculas, como se ha descrito en el punto de “Mecanismos tumorales de escape del sistema inmune”, son moléculas que, en condiciones fisiológicas, se encargan de la inhibición del sistema inmune, impidiendo que se produzcan fenómenos de autoinmunidad debidos a una activación excesiva del mismo. También tienen la función de mantener esta fase de anergia del sistema inmune y de modular la respuesta del sistema inmune. Sin embargo, los tumores generan mecanismos de evasión basados en generar señales que activen los *immune checkpoints*, produciendo así un **freno para el sistema inmune en la defensa antitumoral** (véase Figura 4).¹⁴

Debido a esto, la existencia de anticuerpos monoclonales que bloqueen los *immune checkpoints* de forma específica, suponen la eliminación de este freno del sistema inmune, fomentando su proliferación y defensa contra el tumor.

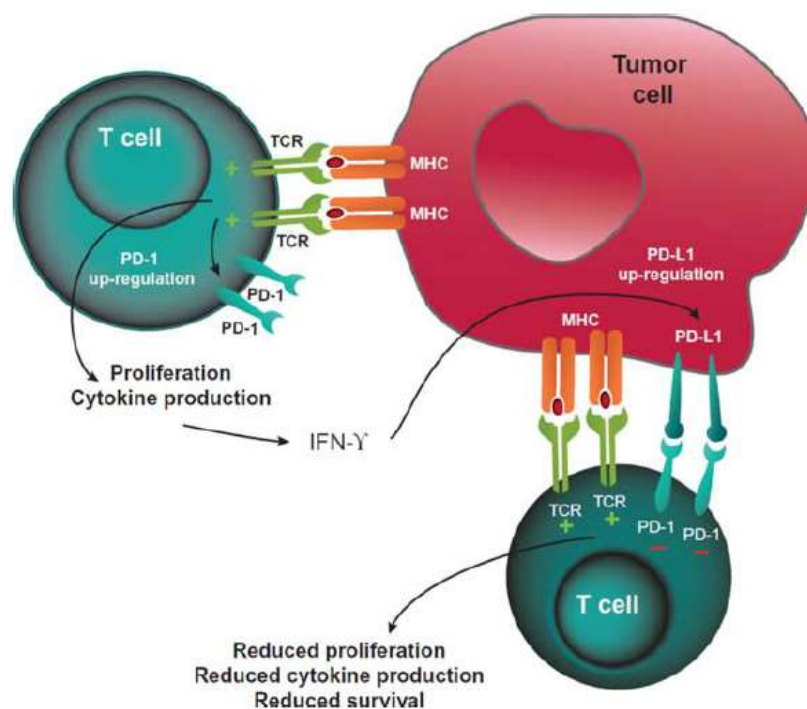


Figura 4-Mecanismo acción de los *immune checkpoints*. Las células tumorales tienen la capacidad de expresar diferentes ligandos como PD-L1 que se une a PD-1 expresando en los linfocitos T, generando una reducción de la proliferación, de la producción de citoquinas y de la supervivencia de éstos últimos. Por otra parte, si no se produce un bloqueo de PD-1, los linfocitos T, por medio del TCR se unen a los antígenos expresados en el MHC de las células tumorales, activándose y llevando a cabo una respuesta inmune¹⁵

Inmunoterapia basada en PD-1 y PD-L1.

Los tratamientos inmunoterápicos centrados en el bloqueo de los *immune checkpoints* se basan en anticuerpos monoclonales que bloquean CTLA-4 y PD-1 principalmente, impidiendo que ejerzan su efecto inhibitorio. En este apartado se discutirá la inmunoterapia basada en la vía de señalización PD-1/PD-L1.

PD-1 se expresa, como ya se ha indicado, en linfocitos T activados, mientras que su ligando, PD-L1, se puede expresar en múltiples tejidos, entre ellos, en distintos tumores. En éstos, su expresión puede ser inmunogénica (extrínseca al tumor, producida por el propio sistema inmune) u oncogénica (generada por mecanismos intrínsecos de las células tumorales), ambas formas de expresión dentro del propio microambiente tumoral. Esta expresión varía en función del tipo de tumor, siendo particularmente abundante en el melanoma, el NSCLC y el cáncer de ovario.^{15, 19}

Para la inhibición de estos receptores se emplean anticuerpos monoclonales específicos (principalmente IgG-1, IgG2 e IgG4). En caso de las células inmunosupresoras, si solo se busca el bloqueo de los receptores se suelen utilizar IgG4, pero en ocasiones se utiliza un anticuerpo de clase IgG1 que tengan como efecto tanto el bloqueo de estos receptores como la eliminación de los linfocitos T reguladores (para ello necesita promover la actividad de células citotóxicas).¹³

Entre los anticuerpos monoclonales actuales que se emplean para inhibir la vía de señalización PD-1/PD-L1 se encuentran **nivolumab**, **pembrolizumab**, **atezolizumab**, **pidilizumab** y **ayelumab** (véase Tabla 1).¹³

Dentro de los anticuerpos anti-PD1, se desarrollarán los más importantes. Nivolumab es un anticuerpo monoclonal humanizado IgG4 contra PD-1, actualmente aprobado por la FDA y de elección en el tratamiento del melanoma metastásico (principalmente si es BRAF+), NSCLC, carcinoma renal, carcinoma urotelial. Pembrolizumab, por su parte, es un anticuerpo de alta afinidad tipo IgG4 contra PD-1. Actualmente también ha sido aprobado y está indicado en linfoma Hodgkin, melanoma, carcinoma urotelial y NSCLC. De todos los fármacos es el que más afinidad tiene, lo que conlleva, a su vez, unos niveles mayores de toxicidad. Por otra parte, pidilizumab es un isotipo de anticuerpo tipo IgG1 contra PD-1. Todavía no se encuentra aprobado por la FDA, siendo los estudios más avanzados en fase II (para el tratamiento de neoplasias hematológicas).^{20, 21}

Además de anticuerpos dirigidos contra PD-1, también existen anticuerpo contra PD-L1, alguno de ellos ya aprobado para su uso terapéutico. Se ha visto que la inhibición específica de PD-L1 resulta más eficaz que la PD-1, puesto que permite mantener las interacciones que se producen entre PD-1 y PD-L2, generando un bloqueo más específico y evitando, así, la toxicidad secundaria al bloqueo de PD-1/PD-L2.¹⁵ Atezolizumab anticuerpo monoclonal humanizado tipo IgG1 dirigido contra PD-L1. Es un fármaco también en uso, ya aprobado por la FDA para el tratamiento del carcinoma urotelial y el NSCLC. Ayelumab, por su parte, tampoco se encuentra aprobado actualmente, teniendo una gran cantidad de ensayos clínicos en fase III para el tratamiento de neoplasias mamarias, ováricas, cáncer renal o cáncer urotelial entre otros. Se trata de un anticuerpo monoclonal tipo IgG1 dirigido contra PD-L1.²⁰

Tabla 1- Fármacos que bloquean los immune checkpoints. Tabla modificada de Robert et al. ²²

Receptor	Fármaco	Referencia	Estado de desarrollo clínico	Referencia
CTLA-4	Ipilimumab	<i>Bristol-Myers Squibb</i>	Aprobado para melanoma en EEUU (2011). En fase II-II para otras indicaciones.	Sondak et al. (11)
PD-1	Tremelimumab	<i>Pfizer-MedImmune</i>	Ensayo en fase III	Comin-Anduix et al. (2016)
	Nivolumab	<i>Bristol-Myers Squibb, Ono Pharmaceuticals</i>	Aprobado para tratamiento refractario en melanoma irresecable en Japón y EEUU (2016) Aprobado para NSCLC en EEUU (2016)	Specenier (2016)
	Pembrolizumab	<i>Merck</i>	Aprobado para el tratamiento refractario en melanoma irresecable en EEUU (2016)	Abdel-Rahman (2016)
	Pidilizumab	<i>Cure Tech</i>	Ensayo clínico en fase I-II	Bryan and Gordon (2014)
PD-L1	Atezolizumab	<i>Genentech/Roch</i>	Aprobado para NSCLC y carcinoma urotelial en EEUU (2016)	Rosenberg et al. (2016)
	Avelumab	<i>Mark/Pfizer</i>	Ensayo clínico en fase II	Kaufman et al. (2016)

En definitiva, se ha visto que el bloqueo de los *immune checkpoint* y en concreto de la vía PD-1/PD-L1 se presenta como una **terapia eficaz en el tratamiento del cáncer**. Sin embargo, y a medida que el empleo de este tipo de terapias ha ido creciendo, también se ha visto que algunos pacientes son refractarios a este tipo de tratamientos, por lo que resulta fundamental conocer las causas de estos mecanismos de resistencia. Por otra parte, antes de realizar la indicación de este tipo de terapias, es necesario estratificar a los pacientes en función de su probabilidad de respuesta al anticuerpo, y por lo tanto realizar un tratamiento individualizado para cada paciente, favoreciendo la respuesta en aquellos que probablemente respondan y evitando la administración y las toxicidades derivadas de la misma en pacientes no respondedores. Tanto para identificar a los pacientes respondedores como para realizar esta estratificación se están utilizando diferentes biomarcadores predictivos de respuesta, cuya presencia o ausencia se asocia con la tasa de respuesta de los diferentes tratamientos inmunoterápicos en diferentes tumores.

OBJETIVOS

El presente Trabajo Fin de Grado pretende analizar los resultados obtenidos con algunos de los biomarcadores más relevantes desarrollados hasta el momento como predictores de respuesta en las terapias anti PD-1/PD-L1. Los objetivos específicos de este trabajo son:

- Revisar de los principales biomarcadores predictivos de respuesta de la terapia inmunoterápica anti PD-1/PD-L1 desarrollados hasta la actualidad.
- Analizar las limitaciones de estos biomarcadores que impiden su aplicación en la práctica clínica habitual.
- Revisar de los biomarcadores de respuesta y resistencia más importantes para los anticuerpos bloqueantes de los PD-1/PD-L1.
- Conocer las nuevas perspectivas de futuro que solucionen las limitaciones actuales de los biomarcadores estudiados.

MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño del estudio se basa en una revisión sistemática de la literatura existente, tanto de ensayos clínicos como de revisiones y estudios científicos en el ámbito del empleo de biomarcadores para la valoración de los tratamientos en inmunoterapia del cáncer. En cuanto a la estrategia de búsqueda, los artículos se han obtenido de *PubMed* y de libros de literatura científica. El vocabulario ha sido controlado por los términos *MeSH (Medical Subject Headings)* y el idioma de búsqueda ha sido el inglés. Se han utilizado las palabras clave “*PDL1 expression*” “*TMB*” “*immunogenic tumor*” “*immune checkpoint*” “*biomarker*”. Para una búsqueda más concreta, se ha empleado el buscador avanzado, utilizando los operadores booleanos “*AND*” y “*OR*”, además de la elección de diferentes filtros (*Review, Published in the last 5 years, Cancer, Humans, Field: Title/Abstract*).

Para la extracción de los datos se realizaron diferentes búsquedas durante el periodo comprendido entre los meses de noviembre y enero, en las que se seleccionaron los artículos en función del *abstract*. Las búsquedas que se realizaron fueron: i) “**tumor AND immune system AND relationship**” (se encontraron 236 resultados, de los que se eligió 1); ii) “**TMB AND PDL1 expression**” (encontrando 1 único resultado); iii) “**PDL1 OR TMB**” (118 artículos de los cuales fueron elegidos 8); iv) “**PDL1 OR TMB AND biomarker**” (apareciendo 20 artículos de los cuales se escogieron 3); v) “**PDL1 AND biomarker**” (se encontraron 207 artículos, de los que se eligieron 4); vi) “**PDL1 OR TMB AND immunogenic tumor**” (15 artículos y de ellos se escogió 5); vii), “**immune checkpoint AND biomarker**” (encontrando 253 artículos, de los que se eligieron 17); viii) “**immunotherapy AND passive AND monoclonal antibody**” (aparecieron 94 resultados, de los que fue escogido 1); ix) “**checkpoint inhibition AND PDL1 AND biomarker**” (encontrando 17 resultados, de los que se utilizaron 5).

En definitiva, en el presente artículo se han analizado 45 artículos relacionados con la utilidad de los biomarcadores para la valoración de los tratamientos de inmunoterapia en cáncer (véase *Tabla 2*).

Tabla 2- Resumen de búsqueda de artículos realizada

Términos usados	Artículos encontrados	Artículos seleccionados
<i>Tumor AND immune system AND relationship</i>	236	1
<i>TMB AND PDL1 expression</i>	1	1
<i>PDL1 OR TMB</i>	118	8
<i>PDL1 OR TMB AND biomarker</i>	20	3
<i>PDL1 AND biomarker</i>	207	4
<i>PDL1 OR TMB AND immunogenic tumor</i>	15	5
<i>Immune checkpoint AND biomarker</i>	253	17
<i>Immunotherapy AND passive AND monoclonal antibody</i>	94	1
<i>Checkpoint inhibition AND PDL1 AND biomarker</i>	17	5
<i>TOTAL:</i>	961	45

Además de todo esto, se hizo una aproximación inicial y revisión del libro *Inmunología tumoral e inmunoterapia del cáncer* (Antonio Antón, Alberto Anel, Luis Martínez-Lostao, Julián Pardo, Roberto Pazo. Editorial Amazing Books. ISBN: 976-84-17403-06-5. 1ª Edición).

La información analizada se estructuró en dos subapartados: 1) la introducción en la que se describía la relación del sistema inmune con el cáncer y el mecanismo fisiopatológico de *immune checkpoint* PD-1 así como los anticuerpos utilizados para bloquearlos y 2) la descripción y potencial valor predictivo de los diferentes biomarcadores predictivos de respuesta de los anticuerpos anti PD-1/PD-L1.

RESULTADOS

Biomarcadores predictivos de respuesta inmunoterápica

La existencia de los biomarcadores surge como una necesidad para maximizar el beneficio terapéutico de los pacientes a los que se administran anticuerpos que bloquean los *immune checkpoints*. Así, los biomarcadores podrían identificar diferentes tipos de pacientes: i) aquellos que tienen una **alta probabilidad de respuesta** al tratamiento, por lo que se podrían administrar precozmente y maximizar su beneficio, ii) pacientes que, a pesar de tener probabilidad de respuesta alta, los efectos secundarios de su administración superan el posible beneficio terapéutico (ej.: pacientes ancianos o con patología múltiple) y es mejor optar por otro tipo de terapias, iii) aquellos que tienen una **baja probabilidad de respuesta** al tratamiento inmunoterápico, lo que nos evitaría administrar un tratamiento que puede presentar una toxicidad alta en ciertas ocasiones (ej.: nivolumab e ipilimumab asociados), con un coste muy elevado en la actualidad y que produciría una demora en el inicio de otros tratamientos no inmunoterápicos más efectivos en este tipo de pacientes; y, iv) la existencia de **resistencia** al tratamiento inmunoterápico que sí había tenido respuesta previa. La mayoría de estas herramientas todavía no se emplean en el manejo clínico de los pacientes neoplásicos con este tipo de tratamiento.^{22, 23}

Los biomarcadores pueden clasificarse según su función en **predictivos o pronósticos**. Un biomarcador predictivo nos permite conocer la probabilidad general de beneficio y respuesta a un tratamiento determinado, mientras que un marcador pronóstico es aquel que nos da información global acerca del paciente y el desarrollo de su enfermedad.²⁴

Para el desarrollo de estos biomarcadores se han utilizado diferentes criterios. El RECIST define la respuesta tumoral y el control de la enfermedad según *ratios* oncológicos. Sin embargo, con el desarrollo de la inmunoterapia, surgen nuevos parámetros de medida, como el irPFS y el irRC que nos permiten hacer una distinción entre la respuesta al tratamiento clásica y la que se produce en inmunoterapia.⁷

Son diversos los biomarcadores desarrollados hasta la actualidad para la valoración de la respuesta a la inmunoterapia como la **expresión de PD-L1** mediante técnicas inmunohistoquímicas, la valoración de la **TMB** y **mutaciones concretas de genes** que condicionan mayor respuesta al tratamiento, las **alteraciones en el microambiente tumoral** como aumento de los niveles de infiltración de los linfocitos T CD8+, citoquinas pro o antiinflamatorias, el NLR, la LDH, y la IDO1, los biomarcadores constituidos por la **microbiota intestinal**, los **biomarcadores de sangre periférica** y **marcadores de respuesta y resistencia** de estos fármacos (véase Figura 5).²⁵

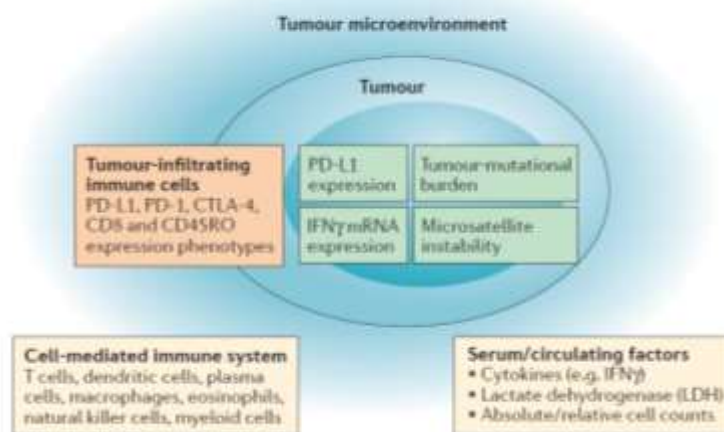


Figura 5-Principales biomarcadores predictivos de respuesta de tratamiento inhibidor de los immune checkpoints clasificados en función del lugar en el que se producen¹⁷

Todos estos biomarcadores previamente indicados se van a analizar en la sección de Resultados del presente trabajo, analizando con más profundidad la **expresión de PD-L1**, puesto que es el biomarcador más estudiado y desarrollado, además de ser el único que se utiliza en la práctica clínica y la **TMB**, puesto que es el biomarcador con mayor especificidad y predictividad que se ha desarrollado hasta la actualidad.

EXPRESIÓN DE PD-L1 EN LAS CÉLULAS TUMORALES.

Antes de describir la expresión de PD-L1 resulta necesario mencionar que existen varios factores que influyen en la misma y en la eficacia clínica de los inhibidores de los *immune checkpoints*. Algunos de los aspectos que muestran la variabilidad en la expresión de PD-L1 son las terapias previas, la presencia de células del sistema inmune en el microambiente tumoral y el tipo de tumor que presente el paciente, siendo más frecuente la expresión de PD-L1 en melanoma, NSCLC y carcinoma renal.²⁶

PD-L1 puede expresarse de forma constitutiva debido a una **activación de un oncogén concreto**, que puede estar inducido por la activación de ciertos **factores proinflamatorios (IFN- γ) producidos** o por el propio **sistema inmune**. Su expresión se puede producir, por tanto, por las propias células del tumor o por células del sistema inmune.⁷ Altos niveles de PD-L1 dentro del propio tumor se han asociado a peor pronóstico, con una mayor propensión a presentar alteraciones patológicas en la célula tumoral, como la presencia de una mayor multiplicación clonal de la célula tumoral o la existencia de metástasis linfáticas y a distancia.²⁶

La expresión de PD-L1 por parte de las células tumorales se asocia a la expresión de PD-1 por parte de los linfocitos. Por esto, la expresión de PD-L1 en las células tumorales ha demostrado una correlación significativa con una respuesta objetiva a los fármacos anti PD-1. *Daud et al.* estudiaron la relación entre la actividad de fármacos anti-PD1 y la expresión de PD-L1 en pacientes con melanoma metastásico que eran tratados con pembrolizumab (anti-PD1) en la fase Ib del ensayo *Keynote-001*. Se observó que cuando la proporción de células que expresaban en su membrana PD-

L1 era valorada por inmunohistoquímica, altos niveles de expresión (al menos 50% de las células tumorales) predecían buena respuesta al tratamiento con pembrolizumab. Además, en estudios posteriores en los que se comparó la respuesta de pembrolizumab frente a quimioterapia, se vio que en pacientes con alta expresión de PD-L1 la respuesta de pembrolizumab era superior a la quimioterapia.^{26,27,28} Esto indicaría que la valoración de la **expresión de PD-L1 en las células tumorales** y su medida mediante inmunohistoquímica podría ser un **biomarcador útil** de respuesta al tratamiento.²⁹

Sin embargo, la evaluación de PD-L1 se hace mediante inmunohistoquímica (véase Anexo 1), una técnica **con una importante variabilidad**, lo que genera una gran heterogeneidad en la medida de PD-L1. La medición de PD-L1 se ve influenciada por citoquinas inflamatorias, que son dependientes del tiempo de toma, del análisis de la biopsia y de tratamientos previos. Además de ésta, otras alteraciones de PD-L1 están siendo investigadas como predictivas de respuesta al tratamiento inmunoterápico.³⁰

Aunque la expresión de PD-L1 tiene cierto valor predictivo para la utilización de los inhibidores de PD-1/PD-L1 **no presenta la suficiente consistencia ni precisión para ser utilizado como biomarcador en exclusividad**. Se ha observado que aproximadamente el 10% de pacientes con PD-L1 negativo responden a inmunoterapia, y, sin embargo, otros tumores que sí presentan los receptores PD-L1 no responden al tratamiento. Esto se debe a que se trata de un biomarcador dinámico, con variabilidad temporal, pero también espacial, difiriendo la expresión de PD-L1 entre diferentes pacientes con el mismo tipo de tumor e incluso entre diferentes biopsias tumorales del mismo paciente.^{30,31} Además, las distintas empresas farmacéuticas que han desarrollado los fármacos inhibidores de los *immune checkpoints*, utilizan distintas medidas de positividad de PD-L1, no existiendo unos valores de medida de consenso para todos, lo que aumenta aún más la variabilidad del biomarcador.⁷ En la actualidad existen cuatro anticuerpos comerciales que permiten medir PD-L1. Cada ensayo clínico emplea uno diferente, (*Dako 22C3*, *Dako 28-8*, *Ventana SP142*, y *SP263*), además de diferentes metodologías de medición (tanto medidas bioquímicas como anatomopatológicas). Se realizó un proyecto comparativo por parte del consorcio empresarial *Blueprint* en el que se compararon tres de estos anticuerpos en un mismo ensayo clínico. En este proyecto, se observó que la expresión de PD-L1 en las células tumorales medidas con tinción inmunohistoquímica, añadiendo los distintos anticuerpos (todos excepto SP142) tenían una gran variabilidad.^{7, 30} Por tanto, los resultados clasificados como positivos muchas veces no ofrecen una estratificación efectiva a la hora de predecir la respuesta de los fármacos en los distintos pacientes.^{23,28} Por todo ello, el pobre valor predictivo negativo de la inmunohistoquímica de PD-L1 también radica en que la funcionalidad y la expresión de este ligando se produce por diversas variables. La expresión de PD-L1 está regulada por MAPK y PI3K, entre otras vías de señalización intracelular. Por otra parte, en el microambiente tumoral pueden estar expresadas otras células del sistema inmune (véase Anexo 2).¹⁴

TMB

Se define la TMB como una medida cuantitativa del total del número de mutaciones somáticas diferentes presentes en el genoma del tumor. La importancia de la TMB como biomarcador predictivo de respuesta radica en que los neoantígenos, que generalmente se generan por mutaciones tumor-específicas, son reconocidos por los linfocitos T, generando una respuesta inmune. No todas las mutaciones que se producen en los tumores generan neoantígenos, pero sí que se ha visto que existe una correlación directa entre el número de mutaciones y los antígenos que se generan (véase Anexo 3).²⁶ De esta manera se ha demostrado que el número de neoantígenos del tumor se correlaciona bien con la TMB.^{7, 32} En este sentido, se ha demostrado en pacientes NSCLC que el factor exógeno que genera una TMB más alta es el tabaco (se ha visto que pacientes fumadores con este tipo de tumor tienen una TMB alta, mientras que los pacientes no fumadores con tumor presentan una TMB baja).^{32, 33}

Se ha visto que la inhibición de los *immune checkpoints* es más eficaz en tumores con una alta cantidad de mutaciones (alta TMB). Tumores con una alta TMB tienen una mayor probabilidad de expresar neoantígenos que induzcan una respuesta inmune más potente en la presencia de inhibidores de los *immune checkpoints*. Por tanto, la existencia de una alta TMB puede ser un biomarcador de eficacia de estas terapias.³¹ Una TMB alta se asocia con un microambiente tumoral inflamado y repleto de linfocitos T activados, potencialmente regulados por *immune checkpoints* y sus ligandos. También se asocia a una mayor tasa de respuesta a los anticuerpos anti-PD1/PD-L1 y un mayor tiempo de supervivencia libre de enfermedad por parte de los pacientes (respuesta parcial o total de al menos 6 meses).^{14, 29}

Esto se demostró en el ensayo *CkeckMate 227* en el que se vio una mayor progresión libre de enfermedad con nivolumab + ipilimumab frente a quimioterapia en primera línea de tratamiento en pacientes con NSCLC cuyos tumores presentaban niveles altos de TMB (>10 mut/Mb) independientemente de la expresión de PD-L1.³⁴ En el ensayo *CheckMate-012* en el que se administró nivolumab + ipilimumab en pacientes con NSCLC se cuantificó la TMB mediante la técnica WES, se vio que la progresión libre de enfermedad (17,1 meses con TMB alta frente a 3,7 meses con TMB baja) y el beneficio clínico mantenido (65% con TMB alta frente a 34% con TMB baja) eran significativamente mayores en aquellos pacientes que tenían una TMB por encima de la media frente a aquellos que la tenían por debajo de la media.³² Varios estudios han demostrado que una alta TMB se asocia con mejores resultados en un gran número de tumores, como NSCLC, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga y melanoma entre otros.²³ Otro aspecto importante, además de una alta TMB, es una baja heterogeneidad de neoantígenos intratumorales, que también se asocia a un aumento de la respuesta de los anti-PD1. *McGranahan et al* observaron que en NSCLC, tras analizar el TCGA, la combinación de una alta TMB y una baja heterogeneidad de neoantígenos (<1%) era más significativa en cuanto a una supervivencia mayor que cada una de las variables de forma individual.¹⁴

En un estudio de la TMB en diferentes pacientes (en fase de pre-tratamiento, cuando el tumor estaba avanzado y en la enfermedad metastásica) se observó un aumento significativo de la TMB asociado con el aumento de la edad del paciente, mientras que no existían diferencias en la media de la TMB en función de su sexo. En cambio, sí se encontraron diferencias en la TMB en función del tumor estudiado, siendo los mayores valores en tumores en los que era conocida la implicación de la exposición a mutágenos como por ejemplo NSCLC o melanoma.³³

La forma tradicional de **medir la TMB** ha sido mediante la medición del WES, que proporciona un panorama claro de la mayoría de las mutaciones en el código genético que pueden contribuir a la progresión del tumor. Sin embargo, se requiere de la secuenciación también de una muestra de tejido sano para poder comparar e identificar las mutaciones específicas del tumor, lo que implica un coste mayor de la prueba. Debido a este alto coste, a los grandes requerimientos de manejo de datos y de análisis y al largo tiempo requerido para obtener los resultados (entre 4 y 6 semanas) se ha desarrollado una prueba alternativa de medición de la TMB, basada en el uso de grandes paneles de secuenciación dirigidos a genes específicos de cada cáncer (que miden 315 genes, aproximadamente 1,1Mb del genoma), que ha demostrado ser tan eficaz como el WES.^{23, 33, 34} Para una evaluación precisa de la TMB es necesario valorar las variables pre-analíticas, analíticas y post-analíticas e interpretarlo de forma cuidadosa en el contexto general. Basado en la literatura actual, existen cinco parámetros principales que influyen en la TMB, que son: i) el tipo de tumor; ii) la indicación del fármaco administrado; iii) pre-análisis (incluida la valoración de la celularidad del tumor); iv) el método de medición de la TMB ya sea mediante WES o paneles de secuenciación de genes (incluyendo la composición, la profundidad de lectura y la cobertura); y, v) la bioinformática (análisis de los datos obtenidos). Los factores preanalíticos incluyen el material biopsiado, la celularidad tumoral y la cantidad y calidad del DNA. La evaluación de la celularidad del tumor por un patólogo permite garantizar la validez del material y por tanto ayudar a la interpretación posterior por métodos bioinformáticos.³⁵

Las **ventajas** que presenta la TMB frente a otros biomarcadores (expresión PD-L1 principalmente) son varias. La primera es la independencia del biomarcador con la expresión inmunohistoquímica de PD-L1. En el ensayo *Checkmate-227*, en el que se comprobó el tratamiento con nivolumab + ipilimumab frente a nivolumab en monoterapia en primera línea en pacientes con NSCLC, se demostró que la presencia de una TMB alta (>10 mut/Mb) aseguraba la existencia de mejores resultados en términos de supervivencia global, a pesar de que la expresión de PD-L1 presentase niveles disminuidos (<1% de expresión de PD-L1). Simultáneamente, en el ensayo *Keynote-189*, en el que se comparaba la administración en primera línea de pembrolizumab frente a pembrolizumab + quimioterapia en pacientes NSCLC, se demostró una eficacia aumentada con una TMB alta, incluso en pacientes con una expresión disminuida de PD-L1.^{36, 37}

Por otra parte, la TMB también presenta ciertas **limitaciones** en su utilización. Se ha visto que existen ciertos pacientes que responden de forma variable a los fármacos anti PD-1/PD-L1, con independencia de los valores de la TMB. Esto se debe a que los mecanismos subyacentes de producción de antígenos tumorales todavía no están completamente clarificados.³⁰ Entre los principales inconvenientes de utilizar la TMB como biomarcador predictivo de respuesta de los bloqueadores de los *immune checkpoints*, se encuentran problemas en la propia determinación de la TMB, como es la disponibilidad del material tumoral, la baja sensibilidad de la prueba (no todos los pacientes son candidatos), y en la actual falta de estandarización en la validación analítica y clínica de la TMB.^{32, 36} Un ejemplo de esto es la prueba *F1 CDxTM*, la cual requiere paneles de largas secuencias, lo que implica la necesidad de emplear una considerable cantidad inicial de muestra (un bloque de tumor o 10 portaobjetos de tumor sin teñir), así como que la muestra presente al menos un 20% de núcleos tumorales, lo cual no siempre es posible conseguir. El tiempo de respuesta es de aproximadamente dos semanas y el coste de entre 2500-5000 USD. Por otro lado, otra limitación es la variabilidad en la cantidad y calidad de la muestra que se puede encontrar. Además, otra limitación es que no todos los pacientes cumplen criterios para poder calcular la TMB.^{36, 37} En el ensayo *Checkmate-568* al 88% de los pacientes con NSCLC a los que se administró nivolumab + ipilimumab se les pudo evaluar la expresión de PD-L1 mediante inmunohistoquímica, mientras que únicamente a un 34% se les podía evaluar la TMB (mediante *F1 CDxTM*).³²

Además, las pruebas de TMB no están todavía estandarizadas para las diferentes tecnologías utilizadas y la definición de TMB alta varía en los diferentes estudios entre valores que van de ≥ 7.4 a 20 mut/Mb (cuantificadas mediante NGS). Por otra parte, la TMB no sólo mide los neoantígenos clonales (que aparecen en todo el tumor), sino que también mide los neoantígenos subclonales (aquellos que se producen en la muestra en concreto, pero que no encuentran en todo el tumor), lo que en ocasiones puede dar como resultado una TMB falsamente elevada. Hay que tener en cuenta que los linfocitos T únicamente reconocen los neoantígenos clonales y no los subclonales ya que si se especializan en los neoantígenos subclonales podrían no controlar bien el resto de mutaciones que sí que afectan a todo el tumor.^{32, 36}

NEOANTÍGENOS Y MUTACIONES TUMOR-ESPECÍFICAS.

Como ya se ha explicado anteriormente, una TMB alta se asocia con un aumento de neoantígenos que pueden ser reconocidos por el sistema inmune. Sin embargo, existen mutaciones específicas, generan una respuesta del sistema inmune y que son especialmente interesantes de destacar. El presente apartado se va a centrar en las **mutaciones del gen *MMR*, el aumento de la clonalidad del TCR de los linfocitos T, las mutaciones específicas en NSCLC** (en el gen *EGFR*, traslocaciones de *ALK* o comutación *TP53/KRAS*), **las mutaciones de *JAK1-JAK2* y la delección de la β -2-microglobulina.**

Existen múltiples causas que generan mutaciones somáticas en los tumores, como los errores intrínsecos en la maquinaria replicativa del DNA, la reparación defectuosa del DNA, modificaciones enzimáticas del DNA o la exposición a agentes exógenos. Las mutaciones en la mitosis se producen principalmente en los microsatélites y son corregidas posteriormente por los genes *MMR*. Mutaciones en estos

genes de reparación producen tumores hipermutados con una alta inestabilidad en los microsatélites (MSI alto).³² En el estudio de cohortes realizado por *Chalmers et al* en el que se comparó un grupo de pacientes tratados con anticuerpos anti PD-1/PD-L1 que presentaban un MSI alto frente a otro grupo con un MSI normal, se observó que un 83% de pacientes con un alto MSI presentaban una TMB alta y el 97% tenían una TMB con >10 mut/Mb. Sin embargo, a la inversa esto no sucedía, puesto que sólo el 16% de las muestras con TMB alta también eran clasificadas como MSI alto. Este estudio lo realizaron con pacientes que padecían diferentes tipos de tumores. Esta correlación entre MSI alto y una TMB alta es más frecuente en algunos tumores como tumores gastrointestinales, el adenocarcinoma duodenal y el carcinoma de intestino delgado, mientras que, en otros como el melanoma, el NSCLC y los tumores escamosos la TMB suele ser alta pero el MSI raramente está elevado.³³

Por otra parte, en un estudio realizado por *Whijae Roh et al* se estudiaron 56 pacientes con melanoma a los que se les trató inicialmente con un anticuerpo anti CTLA-4 y cuando presentaron resistencias y progresión tumoral se les administró terapia anti PD-1/PD-L1. Se realizó la secuenciación del TCR para comprender el papel del linfocito T como biomarcador predictivo de respuesta a esta terapia. Este biomarcador se basa en el estudio de variabilidad en el TCR de los mismos del microambiente tumoral, lo que denota una mayor capacidad de respuesta antitumoral por parte de los linfocitos T ante diferentes antígenos generados por el tumor. Aunque no se observaron diferencias significativas en la clonalidad del TCR cuando se les administró ipilimumab, sí que se observó un aumento en la clonalidad del TCR en pacientes a los que se les había administrado la terapia anti PD-1/PD-L1. Además, un paciente, inicialmente clasificado como no respondedor según los criterios del ensayo, presentaba un aumento de la clonalidad que parecía tener un beneficio clínico, demostrándose tras 24 dosis de anti PD-1/PD-L1 una remisión de la enfermedad. También se vio una relación positiva entre la clonalidad del TCR y aumento de la inmunidad antitumoral en el microambiente tumoral en mediciones posteriores al tratamiento anti-PD1/PD-L1.³⁸

Respecto al NSCLC, se han descrito mutaciones del *EGFR* y traslocaciones de *ALK* que podrían inducir una regulación positiva de la expresión PD-L1, por ejemplo, a través de la vía de señalización PIK3/AKT. Por su parte, la coexistencia de mutaciones inhibitorias del STK11/LKB1 en pacientes con el gen *KRAS* mutado se ha asociado a una presencia disminuida de la expresión de PD-L1, PD-1 y CTLA-4, así como a un microambiente inmunodeprimido. Por el contrario, comutaciones de *TP53* y *KRAS* en el adenocarcinoma de pulmón mostraron un aumento de la expresión de PD-L1, de los linfocitos CD8+ y de la TMB, generando un beneficio clínico notable de la inmunoterapia anti PD-1/PD-L1.³⁰

Otro tipo de resistencias de la inmunoterapia basada en PD-1/PD-L1 de forma inicial son las relacionadas con mutaciones en *JAK1-JAK2* o con la delección de la β -2-microglobulina.²⁷ En biopsias tumorales de algunos pacientes con melanoma se vio una delección en el exón 1 del componente de la β -2-microglobulina, componente del MHC de clase I, lo que generó una pérdida de su expresión en la membrana externa en comparación con las células del estroma del mismo paciente. La β -2-microglobulina contribuye al plegado y transporte adecuado de las moléculas de MHC de clase I en la superficie celular (permitiendo la presentación de antígenos a los linfocitos T CD8+), de manera que su deficiencia genera resistencias del tumor. Por otra parte, se observó que tanto en los estudios del paciente previos al inicio del tratamiento como en las recaídas

las muestras fueron negativas para MHC de clase II, lo que sugiere una falta de compensación de la expresión del MHC ante la deficiencia de β -2-microglobulina.^{29,39} Respecto a la vía de señalización JAK-STAT, ésta juega un papel importante en varias funciones inmunológicas, tal y como muestra la relación entre distintas mutaciones de la vía JAK-STAT y algunas enfermedades inmunológicas, especialmente en su papel en la respuesta inmune de IFN- γ . *Moon et al* mostraron que el aumento de la concentración de IFN- γ en los tumores gástricos y en melanoma generaba un aumento en la expresión de PD-L1 a través de la vía JAK-STAT. En el linfoma de *Hodgkin*, se ha descrito un aumento de los niveles de PD-L1 cuando se produce la amplificación de la región cromosómica de 9p24.1, que incluye los genes *PD-L1*, *PD-L2* y *JAK2*.⁴⁰

MICROAMBIENTE TUMORAL

El microambiente tumoral tiene un papel muy importante en la susceptibilidad o resistencia al bloqueo de los *immune checkpoints*. Diferentes factores influyen en la activación e inhibición del sistema inmune, entre los que destacan diversas **citoquinas** (principalmente IFN- γ), la **concentración de linfocitos T CD8+**, el **NLR** y la **concentración de LDH** y de **IDO1**.

Entre las citoquinas, destaca el papel de **IFN- γ** . Así, la expresión de genes que inducen un aumento de los niveles de IFN- γ nos indican que el ambiente tumoral es proinflamatorio y que posiblemente habrá una buena respuesta ante el tratamiento con inmunoterapia. La expresión del IFN- γ se asocia con un aumento de la probabilidad de presentación de neoantígenos de las células tumorales y, por tanto, de un aumento de la inmunidad antitumoral.^{27,40} En cambio, defectos en la vía de señalización del IFN- γ se han relacionado con mecanismos de mayor de resistencia al tratamiento con anticuerpos anti PD-1/PD-L1. El IFN- γ se encarga de promover el escape de la vía inhibitoria inducida por PD-L1 que ejerce el tumor frente a las células del sistema inmune, de promover la presentación antigénica y del reclutamiento de células inmunes efectoras.³¹ De hecho, en pacientes con melanoma metastásico tratados con pembrolizumab con valores disminuidos de IFN- γ en el microambiente tumoral adquieren resistencia al tratamiento inmunoterápico.³⁰ En un estudio en fase II con 35 pacientes con melanoma tratados con nivolumab, se vio que un aumento de IFN- γ , IL-6 e IL-10 se daba en pacientes respondedores. Además, tras el tratamiento disminuía la citoquina antiinflamatoria IL-10.⁴¹

Por otra parte, el número de **linfocitos T CD8+ infiltrados** en el microambiente tumoral que expresan PD-1 y CTLA-4 se asocia de forma directamente proporcional a una buena respuesta frente a los anticuerpos que los bloquean y podrían generar un aumento de la infiltración de estos linfocitos como respuesta al tratamiento.²⁷ La infiltración de linfocitos en las muestras de biopsia tumoral se ha asociado con una mejora de la supervivencia en diferentes estudios retrospectivos con diferentes tumores como el NSCLC, melanoma y cáncer colorrectal. El reconocimiento por parte del sistema inmune de estos tumores genera un fenotipo tumoral compuesto por linfocitos T activados que podría valorarse como biomarcador.¹⁴ La densidad de infiltración de linfocitos no se relaciona con el tipo de respuesta al tratamiento (total, parcial o mantenimiento de la enfermedad), pero sí que se ha asociado con una mejora de la actividad clínica del pembrolizumab, tal y como se ha visto en el ensayo clínico *Keynote-001* en pacientes con NSCLC.²⁷ En el contexto de NSCLC se ha desarrollado

el análisis de los haplotipos de HLA y su relación con la actividad de los linfocitos T CD8+ como método diagnóstico y pronóstico. Un reciente estudio realizado con biopsias de pacientes con adenocarcinoma pulmonar demostró que la infiltración de linfocitos T CD8+ se ha asociado con beneficio clínico con el tratamiento anti PD-1/PD-L1 únicamente cuando las células tumorales presenten una buena expresión de HLA-A y HLA-B/C y no expresen HLA-E. En este sentido, se ha visto que las mutaciones en el HLA favorecen la evasión inmune en cáncer.³⁰ Por otra parte, en pacientes con melanoma metastásico tratado con pembrolizumab, también se ha visto un aumento en la densidad de los linfocitos T CD8+ en los márgenes y parénquima tumoral, en las biopsias realizadas antes de iniciar el tratamiento; así como un aumento progresivo en la densidad de linfocitos T CD8+ en biopsias seriadas progresivas durante el tratamiento en pacientes respondedores.¹⁴

El **NLR** ha sido propuesto como una medida del estado inflamatorio en pacientes con diferentes tipos de cáncer. En pacientes con melanoma metastásico tratados con anticuerpos bloqueantes de los *immune checkpoints* (ipilimumab) un NLR bajo se ha asociado a beneficio terapéutico. Desde un punto de vista pronóstico, un estudio en biopsias de 485 pacientes con NSCLC revelan que los pacientes con altos niveles de neutrófilos CD10+ y bajos porcentajes de linfocitos B CD20+ infiltrados en el tumor se asociaron a una peor supervivencia global a los 5 años. También, en pacientes con NSCLC tratados con nivolumab, un índice de NLR>5 previo al tratamiento se ha asociado con una peor respuesta.³⁰

Por otra parte, el nivel de **LDH** se ha propuesto como factor pronóstico en pacientes con melanoma metastásico en pacientes tratados con pembrolizumab o nivolumab. Después de 9 meses de tratamiento, en pacientes que tenían un nivel de LDH basal elevado tenían una disminución significativa de la supervivencia en comparación con pacientes con niveles normales de LDH.¹⁷ Además, en pacientes con melanoma metastásico tratados con nivolumab o pembrolizumab, que presentaban un incremento relativo de >10% de la LDH basal tenían peor pronóstico que aquellos que tenían un descenso de la LDH basal >10%. Por ello, el nivel de LDH podría ser un predictor muy útil de respuesta, tanto previamente como durante el tratamiento para predecir la respuesta temprana o la progresión en pacientes con melanoma avanzado que reciben terapia anti PD-1/PD-L1.^{17, 26}

Finalmente, la **IDO1** es un inhibidor del sistema inmune inducible por el IFN- γ que convierte el triptófano en kineurinas y que se ha asociado a un estado de inmunosupresión en tumores. En un estudio en sarcomas se observó que la gran mayoría de los tumores estaban infiltrados por macrófagos M2 y que éstos expresaban IDO1, lo que podría explicar la falta de respuesta a los anticuerpos anti PD-1/PD-L1.⁴⁰

MICROBIOTA INTESTINAL Y ORAL

La microbiota intestinal y oral puede modular favoreciendo o impidiendo el desarrollo de la inflamación en la inmunidad antitumoral. Ciertas especies como el *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Alistipes* contribuyen en la diferenciación de los linfocitos T y en la producción de citoquinas inflamatorias, mientras que *Staphylococcus aureus* induce la formación de los linfocitos T reguladores. En este sentido, *Gopalakrishnan et al.* describieron que pacientes con melanoma metastásico respondedores a los anticuerpos anti PD-1 presentaban una mayor cantidad de *Ruminococcaceae*, así como

de *Bifidobacterium*.⁴¹ Por otra parte, *Derosa et al* han descrito que pacientes con tumores epiteliales tratados con nivolumab, cuando eran tratados además con antibiótico presentaban una menor supervivencia libre de progresión y menor supervivencia global que aquellos que no eran tratados.⁴⁰

BIOMARCADORES DE SANGRE PERIFÉRICA

Se ha observado que la existencia de marcadores predictivos de respuesta en el microambiente tumoral puede reflejarse de forma similar en sangre periférica. Un conocimiento preciso de la presencia de células inmunes en ambos compartimentos (el microambiente tumoral y la sangre periférica) permite aumentar las posibilidades de encontrar biomarcadores útiles.⁴² La capacidad de poder determinar biomarcadores de respuesta a los bloqueantes de los *immune checkpoints* mediante estudios de sangre periférica presenta un gran potencial, por la facilidad de obtención de este tipo de muestras.¹⁴

El número de **células NK y linfocitos CD8+** funcionales y competentes que **circulan en sangre periférica** podría representar un parámetro predictivo de beneficio en la terapia anti PD-1/PD-L1. Esto se ha visto en un estudio en el que se compararon dos grupos de pacientes con NSCLC tratados con nivolumab, uno con beneficio clínico (CB; que incluía pacientes con respuesta completa, parcial y enfermedad estable) y otro con pacientes no respondedores (NR) al tratamiento. En este estudio, se observó que el número absoluto de células NK CD56+ circulantes era el doble en el grupo CB con respecto al grupo NR. Además, también se constató un aumento del doble tanto del número absoluto como del porcentaje de linfocitos CD8+ circulantes que expresaban PD-1 en el grupo de pacientes CB.⁴²

Por lo tanto, existen poblaciones de células inmunes específicas circulantes que se pueden utilizar como biomarcadores, como son los linfocitos T, linfocitos B, células NK, monocitos y células dendríticas. Los linfocitos T circulantes en sangre periférica representan el microambiente tumoral, de manera que la existencia de neoantígenos genera una activación de los linfocitos T CD8+ que salen a sangre periférica, lo que se relaciona con una mejor respuesta a los bloqueantes de los *immune checkpoints*. De la misma manera, los TCR de los linfocitos circulantes son muy similares a los que existen en el microambiente tumoral, por lo que su estudio nos puede dar indicaciones sobre la inmunogenicidad del tumor. Por otra parte, las células supresoras mieloides se encargan de la inmunosupresión, puesto que generan citoquinas como TGF- β e IL-10 que inhiben al sistema inmune. Un aumento de estas células en sangre periférica se ha asociado a un pronóstico más desfavorable en pacientes con melanoma tratados con nivolumab.⁴¹

Por otra parte, la molécula PD-L1 soluble (**sPD-L1**) se encuentra en la sangre de pacientes con tumores como el de pulmón, linfoma y carcinoma hepatocelular. Altos niveles de esta molécula se relacionan con un peor pronóstico, pero, por otra parte, también se ha visto que los pacientes que la presentan tienen una mayor tasa de respuesta a los anticuerpos que bloquean los *immune checkpoints*.⁴¹ Se ha observado que la expresión de sPD-L1 se produce por parte de algunas células del sistema inmune presentes en el microambiente tumoral, como los linfocitos T CD4+, los cuales secretan IL-2, lo que a su vez genera la expresión de sPD-L1. Todo esto permite deducir que es el propio sistema inmune quien tiene el potencial de regular el microambiente tumoral

independientemente de la expresión de PD-L1 de membrana (de las células tumorales).⁴¹

Finalmente, la **valoración del ctDNA** mediante la realización de una biopsia líquida de sangre periférica puede ser una alternativa a la biopsia de tejido tumoral para la medición de la TMB como biomarcador predictivo de respuesta a tratamiento, siendo más fácil de obtener en ciertos tipos de tumores y además más eficiente. Sin embargo, en un estudio realizado por *Koeppel et al.* se vio que la sensibilidad del cálculo aislado del ctDNA a partir de la sangre de pacientes con NSCLC metastásica era del 53% en comparación a la sensibilidad obtenida en la misma muestra mediante WES.⁴³ Se ha demostrado que pacientes con tumores hipermutados (ctDNA > 6 GAs) tienen una mayor tasa de respuesta a los anticuerpos bloqueantes de los *immune checkpoints*.^{41, 44}

Biomarcadores de respuesta y de resistencia al tratamiento.

Además de la existencia y desarrollo de biomarcadores predictivos de respuesta a los tratamientos bloqueantes de los *immune checkpoints*, que nos permiten realizar una indicación de este tratamiento con más especificidad; también existen biomarcadores de respuesta o resistencia que aparecen de forma posterior al tratamiento inmunoterápico. Estos biomarcadores refieren la presencia de respuesta al tratamiento administrado, de forma posterior a la administración, o la aparición de resistencia al tratamiento con el que previamente se habían obtenido resultados.

Se ha visto que una pérdida de neoantígenos y un aumento de clones tumorales con esa falta de neoantígenos promueve una respuesta inmunosupresora que puede explicar los mecanismos de resistencia. De esta manera, la caracterización de neoantígenos es un marcador predictivo de beneficio inmunoterápico y la pérdida de los mismos se asocia con una falta de respuesta a los anticuerpos anti PD-1/PD-L1.³¹ Otro tipo de biomarcador se encuentra en el aumento de la actividad del sistema inmune tras el tratamiento. La secuenciación del TCR previo y posterior al tratamiento permite ver si hay diversidad en el TCR, con lo que se puede deducir que ha habido un desbloqueo de diversos clones de linfocitos T, que se han activado y han iniciado su actividad antitumoral. Aunque esto también puede conllevar un aumento de la toxicidad por hiperreactividad del sistema inmune.²⁷

Por otra parte, también existen predictores de respuesta durante el tratamiento. En pacientes con NSCLC tratados con nivolumab se apreció un aumento de células NK en sangre periférica de pacientes respondedores, principalmente entre la segunda y cuarta administración del anticuerpo monoclonal. Además, también se observó un aumento de linfocitos T CD8+ en sangre periférica de pacientes respondedores, mientras que la concentración de linfocitos T reguladores no varió durante la administración del nivolumab.⁴² Por otra parte, en pacientes con melanoma que habían recaído tras la terapia con pembrolizumab, sus biopsias mostraron que la infiltración de linfocitos T CD8+ y la expresión de PD-L1 se concentraban en los márgenes del tumor. Se vio que las células del tumor eran negativas en la expresión de PD-L1 incluso las adyacentes a los linfocitos T, mientras que los macrófagos y el estroma sí que expresaban este ligando.³⁹ Además, en otro estudio reciente se ha visto que aproximadamente el 25% de los pacientes con melanoma que habían obtenido respuesta objetiva a la terapia de bloqueo de PD-1 tuvieron progresión de la enfermedad

en una mediana de seguimiento de 21 meses. Los mecanismos por los que se había producido esta resistencia son en su mayoría desconocidos. Se ha visto que dos mecanismos de adquisición de resistencia son la pérdida de β -2-microglobulina y alteraciones en la señalización del IFN- γ .³⁹

Por otra parte, la recaída rápida en algunos pacientes generó la hipótesis de que se producía por una selección clonal mediada por el sistema inmune y el crecimiento tumoral. Se observó en pacientes con diferentes tumores con recaída que todos generaron una nueva mutación homocigota en la que se perdía la función de las quinasas *JAK1* y *JAK2*. Las consecuencias funcionales de esta mutación eran una falta de respuesta al IFN- γ , sin cambios en la sensibilidad a los IFN- α y β . Este déficit de la señalización IFN- γ produce una disminución de la presentación de los antígenos, además de favorecer el crecimiento tumoral por falta de respuesta al tratamiento inmunoterápico (hay que recordar que el IFN- γ favorece la respuesta a anti PD-1).³⁹

Nuevas perspectivas de utilización de los biomarcadores

La meta actual en el campo del desarrollo de biomarcadores predictivos de respuesta en inmunoterapia consiste en el desarrollo de un método que permita estudiar los biomarcadores de forma conjunta de manera que proporcione una visión global más objetiva de las probabilidades de respuesta a la inmunoterapia.

Para definir las interacciones del sistema inmune de una forma global y cómo pueden influir éstas en la respuesta a la inmunoterapia en distintos pacientes se ha desarrollado el **inmunograma del cáncer** (véase Anexo 4). Se trata de una herramienta que incluye diferentes parámetros específicos que permiten valorar el estado inmunológico del paciente de forma global y, por tanto, la posibilidad de aplicar los tratamientos inmunoterápicos de un modo más específico. La secuenciación completa del exoma y la secuenciación del RNA se han utilizado para desarrollar un inmunograma que integra algunos de los biomarcadores desarrollados anteriormente, como los obtenidos de las células tumorales (la expresión de PD-L1 o la TMB), factores que se expresan en el microambiente tumoral (LDH, IL-6, IFN- γ o la infiltración de células del sistema inmune en el propio microambiente), y también algunos parámetros que pueden medirse en sangre periférica. Por último, otro parámetro a medir podría ser la microbiota intestinal u oral. En un estudio reciente, *Karasaki et al.* han desarrollado un inmunograma renovado que presenta ocho posibles puntuaciones del inmunograma basados en el ciclo inmunitario del cáncer. Mediante el estudio de la secuenciación completa del RNA de 20 pacientes con NSCLC los investigadores han establecido tres patrones inmunológicos: i) ricos en linfocitos T; ii) pobres en linfocitos T; iii) intermedios en linfocitos T. Las relaciones entre estos fenotipos inmunológicos y los resultados de los tratamientos anti PD-1/PD-L1 no están del todo bien definidos. La difusión de la utilización de biomarcadores no invasivos podría promover el establecimiento de diferentes inmunogramas del cáncer.^{30, 41} Estos inmunogramas permitirían detectar los puntos débiles de la terapia anti PD-1/PD-L1 desde diferentes perspectivas. Este concepto hace posible el utilizar otro tipo de terapias más agresivas, como la quimioterapia, únicamente si los biomarcadores predictivos fuesen negativos.⁴¹

DISCUSIÓN

A la vista de los resultados obtenidos, parece que el biomarcador más evidente de respuesta a los anticuerpos bloqueantes de la vía anti PD-1/PD-L1 es la expresión ligando de PD-1: **PD-L1**, un receptor que expresan las células tumorales y también algunas células del sistema inmune y que, mediante su unión a PD-1, inhibe la activación de los linfocitos T. La existencia de altos niveles de PD-L1 en el microambiente tumoral se asocia a una mayor respuesta de los anticuerpos anti PD-1 nivolumab y pembrolizumab. Esto se explica porque si existe una alta expresión de PD-L1 en el microambiente tumoral, es muy probable que también haya una gran cantidad de linfocitos T que expresen PD-1. Estos linfocitos T, al unir sus receptores PD-1 a PD-L1 de las células tumorales se inhiben, fomentando la evasión tumoral. Debido a esta premisa, es entendible por qué los anticuerpos que inhiben la vía PD-1/PD-L1 tienen una mayor tasa de respuesta si hay una alta expresión de PD-L1.

Sin embargo, existen pacientes que expresan PD-L1 en sus células tumorales, pero no responden a la inmunoterapia, y viceversa, pacientes cuyo tumor no expresa PD-L1 y sí que responden a estos tratamientos. Una explicación para estos casos contradictorios puede ser la gran variabilidad que existe tanto en los niveles de expresión de PD-L1 en el microambiente tumoral como en la determinación de dichos niveles. Como ya se ha dicho, existe variabilidad en los niveles de expresión de PD-L1 en el microambiente tumoral. Esta variabilidad se constata a distintos niveles, variando en los distintos tipos de tumor e incluso variando en cada paciente, en función de la región tumoral biopsiada o a lo largo del tiempo en dependencia de la etapa en la que se encuentre el tumor del paciente. Estas diferencias se producen por la existencia de citoquinas que aumentan o disminuyen las concentraciones de PD-L1 o por mutaciones genéticas que alteran la expresión de PD-L1. Todo esto impide una correcta homogeneización de los valores de positividad de la expresión PD-L1 en los diferentes pacientes y por tanto dificulta la estratificación de los pacientes en respondedores o no respondedores a la inmunoterapia anti PD-1/PD-L1.

Por otra parte, como ya se ha dicho, también existe variabilidad en la forma de cuantificar la expresión de PD-L1. El análisis de este receptor se realiza mediante inmunohistoquímica, para lo que actualmente se pueden emplear cuatro tipos de anticuerpos diferentes. En cada ensayo clínico se utilizan unos anticuerpos diferentes que tienen puntos de corte diferentes, de manera que la estratificación de los pacientes no es igual en los distintos ensayos. La solución podría venir con la medición de PD-L1 con todos los anticuerpos disponibles, sin embargo, aunque de esta manera mejoraría la sensibilidad no lo haría el valor predictivo negativo que es lo que interesa aumentar en patologías como el cáncer.

Por otra parte, otro biomarcador prometedor en la predicción de respuesta a los tratamientos inmunoterápicos es la **TMB**, que se define como la cantidad de mutaciones que se producen en el DNA de la célula neoplásica y se asocian con neoantígenos que pueden ser reconocidos por el sistema inmune. Esto se explica porque los neoantígenos producidos por el tumor son presentados por las moléculas de MHC de tipo I o de tipo II de las APC y reconocidos por los linfocitos T CD8+ y CD4+ respectivamente, encargados de la destrucción de las células tumorales. Así, una TMB alta implica una mayor probabilidad de presencia de neoantígenos que sean reconocidos por el sistema inmune adquirido.

Este aumento de la inmunogenicidad tumoral probablemente no genere una respuesta antitumoral completa o adecuada por los mecanismos de evasión tumorales previamente desarrollados, pero sí que se puede esperar una mayor tasa de respuesta a los anticuerpos bloqueantes de los *immune checkpoints*, puesto que la infiltración de células del sistema inmune en el microambiente tumoral probablemente sea mayor. Además, estos neoantígenos también inducen la producción de citoquinas proinflamatorias que favorecen la activación del sistema inmune (además de favorecer la respuesta a los tratamientos anti-PD1/PD-L1). Cuanto mayor sea el número de neoantígenos en un determinado tumor, mayor será la oportunidad de que los linfocitos T inicien una respuesta antitumoral. También resulta importante, a la hora de dar un valor predictivo positivo de respuesta, no sólo que la TMB sea alta, sino que las mutaciones sean homogéneas y, por ello, que sea más sencillo para el sistema inmune reconocerlas.

La medición de este biomarcador se realiza mediante dos técnicas principalmente: WES y paneles de secuenciación de genes. Los primeros permiten una medición más sensible y específica, pero por el contra requieren mayor cantidad de biopsia, son más caros y más lentos en aportar un resultado predictivo. Por otra parte, los paneles de secuenciación de genes se centran en el reconocimiento de las mutaciones más frecuentes e importantes que se producen en los tumores, de manera que, aunque son igual de específicas que las técnicas WES, son menos sensibles, pero por contra los resultados son más sencillos de obtener, más rápidos y más baratos. Probablemente, es por eso que esta última técnica es la que se está comenzando a emplear con mayor frecuencia en la actualidad.

Entre las ventajas que presenta la medición de la TMB como biomarcador, la más importante es la independencia de la expresión de PD-L1 para su medición y el hecho de ser una determinación cuantitativa, lo que permite una estratificación más objetiva. Además, se están desarrollando técnicas que permitan determinar la TMB mediante muestras sanguíneas, lo que se denomina biopsia líquida.³⁶ Por otra parte, también se encuentran ventajas inherentes a su naturaleza cuantitativa, la cual evita la necesidad de una interpretación subjetiva y puede ser estandarizada, evitando la confusión que surge de la selección de anticuerpos y la variabilidad en su interpretación, como ocurre en la medición de la expresión de PD-L1.²³ Por otra parte, la TMB también presenta inconvenientes que impiden usarla como biomarcador de referencia. Entre ellos, el principal inconveniente se encuentra en que todavía no se conoce con exactitud cuál es el mecanismo de producción de estos antígenos en relación a la TMB. Esto quiere decir que en ocasiones puede no haber respuesta al tratamiento bloqueante de los *immune checkpoints* pese a que el valor de la TMB sea alto. Por otra parte, las mayores limitaciones provienen de su forma de medición. Todavía no se ha desarrollado una técnica que permita una determinación lo suficientemente sensible y específica, y aunque la NSG resulta una estrategia bastante prometedora, todavía no existe una estandarización en cuanto a sus valores de positividad, además de que este panel reconoce tanto los neoantígenos de todo el tumor que sí que predisponen a una activación del sistema inmune, como aquellos que se producen en la región específica de la muestra y que no tienen representatividad para el sistema inmune, lo que lleva a un aumento de los falsos positivos de esta prueba.

Por otra parte, existen **mutaciones concretas** que se asocian a un aumento o descenso de la respuesta a la terapia de bloqueo de los *immune checkpoints* y que, por tanto, podrían considerarse biomarcadores predictivos de la respuesta a esta inmunoterapia. Una alteración de los genes *MMR* se asocia a una mayor cantidad de mutaciones y, por tanto, más neoantígenos, funcionando como biomarcador positivo de respuesta. Un aumento de la clonalidad del TCR de los linfocitos T también se asocia a una mayor capacidad de respuesta de los anticuerpos anti PD-1/PD-L1. En tumores como el NSCLC, mutaciones en genes como *EGFR* o *ALK* se asocian a una mayor respuesta al bloqueo de la vía PD-1/PD-L1 puesto que se ha observado que aumentan la expresión de PD-L1. Por otra parte, una mutación en la proteína β -2-microglobulina da lugar a una falta de respuesta a estos anticuerpos, puesto que genera un mal plegado de las moléculas de MHC de clase I, lo que impide una correcta activación de los linfocitos T CD8+. Por último, una mutación de los genes *JAK-1/JAK-2* se asocia a menor tasa de respuesta a los anticuerpos anti PD-1/PD-L1.

En caso de tener una de estas mutaciones específicas, resulta más sencillo realizar una predicción de respuesta, puesto que se conoce con exactitud su vía de señalización y las consecuencias que generan en el microambiente tumoral. Por lo tanto, se trata de biomarcadores de respuesta muy específicos, pero poco sensibles, porque no discriminan una gran cantidad de pacientes que, aunque no presentan estas mutaciones, sí que poseen otras características que los hacen candidatos a tratamiento inmunoterápico. Por todo esto, este tipo de biomarcadores, junto con los descritos anteriormente, tampoco podría utilizarse de forma única como biomarcadores de respuesta.

En el **microambiente tumoral** existen diversas alteraciones que se han estudiado como posibles biomarcadores de respuesta a los anticuerpos anti PD-1/PD-L1. Entre los factores más importantes, destaca la citoquina proinflamatoria IFN- γ , cuyo aumento predice una buena respuesta al tratamiento, puesto que se asocian con la presencia de altas concentraciones de PD-1 en los linfocitos T. Por otra parte, una alta concentración de linfocitos T CD8+ infiltrados en el microambiente tumoral también se relaciona con un aumento de la respuesta al tratamiento inmunoterápico, principalmente en tumores como el melanoma, NSCLC y cáncer colorrectal. Este es también un marcador lógico, puesto que si existen linfocitos que están siendo inhibidos a través de la vía PD-1/PD-L1 en el microambiente tumoral, en el momento en el que se bloqueen estos receptores, estos linfocitos potenciarán su actividad. Sin embargo, una alta densidad de linfocitos no se asocia con más o mejor respuesta, pero sí con una existencia de respuesta. La existencia de una mejor respuesta se podría deducir mediante la variabilidad en la clonalidad en el TCR, que evidenciaría la mayor capacidad de respuesta de los linfocitos T ante un número mayor de antígenos. Sin embargo, el aumento de la concentración de linfocitos T únicamente nos indica que la respuesta va a existir, pero no se conoce ante qué antígenos son capaces de responder estos linfocitos T. También en el microambiente tumoral, otro biomarcador potencialmente útil es el NLR, puesto que representa el estado inflamatorio del paciente. Valores elevados pueden representar una peor respuesta, puesto que se asocian a un aumento de neutrófilos frente a los linfocitos y dado que los anticuerpos anti-PD1 actúan sobre los éstos últimos, el grado de respuesta será menor.

Por otro lado, valores elevados de LDH se asocian a un peor pronóstico, mientras que un descenso de los valores posterior al tratamiento se asocia con una respuesta temprana al tratamiento. Lo mismo ocurre con los niveles de IDO1, cuyos valores elevados se asocian a un peor pronóstico y disminución de la eficacia de los anticuerpos bloqueantes de los *immune checkpoints*. Esto se debe a que IDO1 tiene una función inmunosupresora.

En cuanto a la **microbiota intestinal y oral**, la presencia de ciertos microorganismos se asocia con aumento o disminución de la inmunidad, lo que podría afectar a la respuesta inmune frente al tumor y podría ser empleado como biomarcador predictivo de respuesta. La importancia de la microbiota en la inmunidad antitumoral y en la respuesta a los tratamientos de bloqueo de los *immune checkpoints* queda patente ya que la eliminación de la misma tras el uso de antibióticos influye en la supervivencia libre de progresión cuando se emplea este tipo de inmunoterapia.⁴⁰ El estudio de la microbiota de cada paciente nos permitiría predecir cómo está su sistema inmune y si dicho paciente podría beneficiarse de la inmunoterapia con los anticuerpos anti PD-1/PD-L1.

Por otra parte, aunque la medición de **biomarcadores en sangre periférica** no representa la determinación de nuevos biomarcadores, sí que representa una nueva forma de valoración de los mismos. La posibilidad de obtenerlos a partir de una extracción de sangre periférica representaría una solución menos invasiva para el paciente, puesto que se podrían evitar la toma de biopsias, más cruentas e invasivas. Además, la medición de biomarcadores de sangre periférica daría la posibilidad de obtener marcadores de múltiples tipos de tumores, puesto que la realización de biopsias resulta complicada en algunos tumores que son de difícil acceso o incluso inaccesibles, además de representar un riesgo muy elevado para el paciente. Por otra parte, este tipo de métodos también son más coste-eficientes, puesto que tanto la extracción sanguínea como el tratamiento de las muestras es más asumible económicamente y sería más fácil incorporarlo a la práctica clínica habitual. Pese a todas estas ventajas, la medición de biomarcadores en sangre periférica presenta la gran limitación de que la sensibilidad de medición de estas pruebas es significativamente menor comparado con la medición de las mismas obtenidas mediante biopsia, lo que se explica por la menor concentración de los diferentes biomarcadores en sangre periférica frente a la concentración que existe en el propio microambiente tumoral. Es por ello que la solución de esta limitación supone una vía de estudio muy activa en la actualidad.

Además, resulta interesante obtener biomarcadores que nos permitan conocer si la terapia con anticuerpos bloqueantes de los *immune checkpoints* que ya se están administrando está siendo activa, además de comprender por qué algunos pacientes que previamente han respondido a tratamiento inmunoterápico comienzan a presentar resistencias. Para ello se han desarrollado los **biomarcadores de respuesta y resistencia**, que son biomarcadores que se medirían una vez instaurado el tratamiento. En cuanto a los biomarcadores de respuesta, se proponen aquellos que muestran un incremento de la actividad del sistema inmune posterior al tratamiento, como son principalmente el aumento de células NK y linfocitos CD8+. De otro modo, los biomarcadores de resistencia serían aquellos que indican un descenso en la cantidad o la variabilidad de los neoantígenos producidos por el tumor. Al considerar por qué algunos pacientes son resistentes a las terapias anti PD-1/PD-L1, es necesario conocer los mecanismos de acción de estas moléculas. La respuesta a la inmunoterapia que

inhibe los *immune checkpoints* requiere de la existencia de linfocitos T específicos que estén sensibilizados y reconozcan el ligando tumoral (PD-L1). PD-L1 produce una disminución en la función de los linfocitos T y esto les impide llevar a cabo una respuesta antitumoral efectiva. Estos anticuerpos inmunoterápicos actúan limitando la interacción de PD-1 con PD-L1, de manera que permiten que los linfocitos T puedan producir una respuesta antitumoral efectiva. Por lo tanto, si se han desarrollado resistencias a este tipo de terapias, significa que previamente el tratamiento ha tenido efecto.⁴⁵ Entre estos biomarcadores se encontrarían, por ejemplo, una pérdida de la función de *JAK1*, un descenso en la diversidad del TCR o en la expresión de PD-L1 en los linfocitos T CD8+ que infiltran el tumor. Por otra parte, también se asocia a resistencia la existencia de una disminución en la concentración de moléculas como β -2-microglobulina y defectos en la señalización del IFN- γ , que como ya se ha expuesto anteriormente, intervienen en la activación del sistema inmune.

Todo lo desarrollado a lo largo de este trabajo de revisión nos permite deducir que la expresión de PD-L1 y la valoración de la TMB son los dos biomarcadores más desarrollados hasta la actualidad. Por un lado, la expresión de **PD-L1 es más sensible, presenta un valor predictivo positivo mayor** y su determinación es **más directa y barata**, dado que la medición de la **TMB** resulta en la actualidad muy lenta y cara. En este sentido, aunque todavía está en desarrollo la medición de la TMB en sangre periférica, esto podría acelerar el resultado y abaratar los costes. Por otro lado, la TMB resulta **más objetiva**, puesto que no depende de la determinación de PD-L1, que presenta una gran variabilidad entre pacientes, entre tipos tumorales y también en las diferentes etapas del propio tumor, así como presenta un **valor predictivo negativo mayor**. Además, la TMB presenta la desventaja frente a PD-L1 de que no se conoce perfectamente su mecanismo de acción, por lo que una falta de respuesta ante una TMB alta no se sabe discernir cuál es el mecanismo subyacente que la produce.

En cuanto al resto de biomarcadores, por sí solos no podrían ser empleados puesto que no son suficientemente específicos, pero de forma conjunta con la expresión de PD-L1 y de la TMB apoyarían en la predicción y mostrarían una visión más global de la situación inmunológica del paciente a la hora de administrar estos anticuerpos bloqueantes de los *immune checkpoints*. En cuanto a las perspectivas de futuro, un método muy interesante sería el **inmunograma del cáncer** en el que se incluyen diferentes parámetros específicos que permitirían valorar el estatus inmunológico del paciente de forma global unificando varios de los biomarcadores desarrollados hasta la actualidad. El inmunograma del cáncer proporcionaría un resultado con una sensibilidad y especificidad mucho mayor a la hora de predecir si la inmunoterapia sería eficaz. De otra manera, este método predictivo también permitiría administrar un tratamiento más específico a cada paciente.

CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo son:

1. Los biomarcadores predictivos de respuesta más desarrollados hasta la actualidad son la expresión de PD-L1 y la TMB. En ambos biomarcadores valores elevados indican una mayor probabilidad de respuesta al tratamiento inmunoterápico.
2. La expresión de PD-L1 y la TMB no pueden emplearse en la práctica clínica de forma exclusiva porque no son lo suficiente predictivos; mientras que PD-L1 es poco específico y su medición es más cualitativa; la TMB es poco sensible y cara.
3. Otros biomarcadores analizados (mutaciones de oncogenes concretos, alteraciones del microambiente tumoral o la microbiota intestinal) de momento presentan limitaciones que vienen dadas por la realización de menos estudios en torno a ellas y su menor especificidad.
4. La obtención de biomarcadores en la sangre del paciente es una línea de estudio importante en la actualidad, que facilitaría la determinación de estos biomarcadores en la práctica clínica debido a su carácter menos invasivo y más económico.
5. Los biomarcadores de respuesta y resistencia al tratamiento permiten asegurar que el tratamiento está siendo efectivo en el paciente durante la administración de la terapia o determinar el fallo terapéutico tras la administración de la misma.
6. Las perspectivas de futuro se encaminan al desarrollo del inmunograma, una prueba diagnóstica que comprendería la conjunción en una única prueba de varios de los biomarcadores expuestos, obteniendo así un test diagnóstico con una mayor sensibilidad y especificidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dunn, G.P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L.J., & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*. (2002) 3(11): 991–998.
2. Schreiber, R.D., Old, L.J., & Smyth, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*. (2011) 331(6024): 1565–1570.
3. Narender B.L., Reddy K.E., Shantikumar S., Ramakrishna S. Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm Res*. (2013) 62 (9): 823-834.
4. Muenst S, Laubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. *J. Intern Med*. (2016) 279 (6): 541-562.
5. Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM et al. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8+ dendritic cells. *J. Exp Med*. (2011) 208 (10): 2005-2016.
6. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. (2013) 39 (1):1-10.
7. Lim, J. S., Sundar, R., Cenar-Poirier, M., Lopez, J., & Yap, T. A. Emerging biomarkers for PD-1 pathway cancer therapy. *Biomarkers in Medicine*. (2017) 11(1): 53–67.
8. Galon J, Angell HK, Bedognetti D, Marincola FM. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive and mechanistic signatures. *Immunity*. (2013) 39 (1): 11-26.
9. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. (2014) 27: 16-25.
10. Lesokhin AM, Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD. On being less tolerant: enhanced cancer immunosurveillance enabled by targeting checkpoints and agonists of T cell activation. *Sci Transl Med*. (2015) 7 (280): 280 sr1.
11. Wellenstein, M. D., & de Visser, K. E. Cancer-Cell-Intrinsic Mechanisms Shaping the Tumor Immune Landscape. *Immunity*. (2018) 48(3): 399–416.
12. Spranger, S. Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment. *International Immunology*. (2016) 28(8): 383–391.
13. Anton A., Anel A., Martínez-Lostao L, Pardo J., Pazo R. *Inmunología tumoral e inmunoterapia del cáncer*. Zaragoza (España): Amazing Books (2018) ISBN: 976-84-17403-06-5. 1ª Edición.
14. Chikuma, S. Basics of PD-1 in self-tolerance, infection, and cancer immunity. *International Journal of Clinical Oncology*. (2016) 21(3): 448–455.
15. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *American journal of clinical oncology*. (2016) 39(1): 98-106.
16. Nishino, M., Ramaiya, N. H., Hatabu, H., & Hodi, F. S. Monitoring immune-checkpoint blockade: response evaluation and biomarker development. *Nature Reviews Clinical Oncology*. (2017) 14(11): 655–668.
17. Riether C, Schurch C, Orhsenbein AF From magic bullets to specific cancer immunotherapy. *Swiss Med Wkly*. (2013)

18. Sukari A, Nagasaka M, Al-Hadidi A, Lum LG. Cancer Immunology and Immunotherapy. *Anticancer Res. Nov.* (2016) 36 (11): 5593-5606.
19. Xu-Monette, Z. Y., Zhang, M., Li, J., & Young, K. H. PD-1/PD-L1 Blockade: ¿Have We Found the Key to Unleash the Antitumor Immune Response? *Frontiers in Immunology.* (2017) 8.
20. Mahoney KM, Freeman GJ, McDermott DF. The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma. *Clinical therapeutics.* (2015) 37(4): 764-782.
21. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *The New England journal of medicine.* (2015) 372(4): 320-330.
22. Gibney, G. T., Weiner, L. M., & Atkins, M. B. Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *The Lancet Oncology.* (2016) 17(12): e542–e551.
23. Truesdell J., Miller V.A., Fabrizio D. Approach to evaluating tumor mutational burden in routine Clinical practice. *Transl Lung Cancer.* (2018) 7 (6): 678-681.
24. Tarhini, A., & Kudchadkar, R. R. Predictive and on-treatment monitoring biomarkers in advanced melanoma: Moving toward personalized medicine. *Cancer Treatment Reviews.* (2018) 71: 8–18.
25. Samstein, R. M., Lee, C.-H., Shoushtari, A. N., Hellmann, M. D., Shen, R., Janjigian, Y.Y., Omuro, A. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nature Genetics.* (2019)
26. Yuasa, T., Masuda, H., Yamamoto, S., Numao, N., & Yonese, J. Biomarkers to predict prognosis and response to checkpoint inhibitors. *International Journal of Clinical Oncology.* (2017) 22(4): 629–634.
27. Jeffrey S Webber. Biomarkers for Checkpoint inhibition.ASCO Meeting Library. (2017).
28. Evans M., O'Sullivan B., Smith M. Predictive markers for anti-PD1/PD-L1 therapy in non small cell lung cancer-where we are? *Transl Lung Cancer.* (2018) 7 (6): 682-690.
29. McGranahan, N., Furness, A. J. S., Rosenthal, R., Ramskov, S., Lyngaa, R., Saini, S.K., Swanton, C. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science.* (2016) 351(6280): 1463–1469.
30. Grizzi, G., Caccese, M., Gkountakos, A., Carbognin, L., Tortora, G., Bria, E., & Pilotto, S. Putative predictors of efficacy for immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer: facing the complexity of the immune system. *Expert Review of Molecular Diagnostics.* (2017) 17(12): 1055–1069.
31. Cyriac, G., & Gandhi, L. Emerging biomarkers for immune checkpoint inhibition in lung cancer. *Seminars in Cancer Biology.* (2018)
32. Hendriks L.E., Roulaeu E., Besse B. Clinical utility of tumor mutational burden in patients with non-small cell lung cancer treated with immunotherapy. *Transl Lung Cancer.* (2018) 7 (6): 647-660.
33. Chalmers, Z. R., Connelly, C. F., Fabrizio, D., Gay, L., Ali, S. M., Ennis, R., Frampton, G.M. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Medicine.* (2017) 9(1).
34. Melendez B., Van Campenhout C., Rorive S. Methods of measurement for tumor mutational burden in tumor tissue. *Transl Lung Cancer.* (2018) 7 (6): 661-667.
35. Allgäuer M., Budczies J., Chistopoulos P. Implementing tumor mutational burden (TMB) analysis in routine diagnostics- a primer for molecular pathologists and clinicians. *Transl Lung Cancer.* (2018) 7 (6): 703-715.

36. Heeke S, Hofman P. Tumor mutational burden assessment as a predictive biomarker for immunotherapy in lung cancer patients: getting ready for prime-time or not? *Transl Lung Cancer*. (2018) 7 (6): 631-638.
37. Gernerith, G., Kocher, F., Rudzki, J., & Pircher, A. ASCO 2018 NSCLC highlights—combination therapy is key. *Memo - Magazine of European Medical Oncology*. (2018) 11(4): 266–271.
38. Roh, W., Chen, P.-L., Reuben, A., Spencer, C. N., Prieto, P. A., Miller, J. P., ... Futreal, P. A. Integrated molecular analysis of tumor biopsies on sequential CTLA-4 and PD-1 blockade reveals markers of response and resistance. *Science Translational Medicine*. (2017) 9(379).
39. Zaretsky, J. M., Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Escuin-Ordinas, H., Hugo, W., Hu-Lieskovan, S., ... Ribas, A. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *New England Journal of Medicine*. (2016) 375(9): 819–829.
40. Conway, J. R., Kofman, E., Mo, S. S., Elmarakeby, H., & Van Allen, E. Genomics of response to immune checkpoint therapies for cancer: implications for precision medicine. *Genome Medicine*. (2018) 10(1).
41. Mitsuhashi, A., & Okuma, Y. Perspective on immune oncology with liquid biopsy, peripheral blood mononuclear cells, and microbiome with non-invasive biomarkers in cancer patients. *Clinical and Translational Oncology*. (2018) 20(8): 966–974.
42. Mazzaschi G., Facchinetti F., Missale G., Canetti D., Madeddu D., Zecca A., Tiseo, M. The Circulating Pool of Functionally Competent NK and CD8+ Cells Predicts the Outcome of anti-PD1 Treatment in Advanced NSCLC. *Lung Cancer*. (2018).
43. Fenizia F., Pasquale R., Roma C. Measuring tumor mutation burden in non-small cell lung cancer: tissue versus liquid biopsy. *Transl Lung Cancer*. (2018) 7 (6): 668-677.
44. Bergerot, P. G., Hahn, A. W., Bergerot, C. D., Jones, J., & Pal, S. K. The Role of Circulating Tumor DNA in Renal Cell Carcinoma. *Current Treatment Options in Oncology*. (2018) 19(2).
45. O'Donnell, J. S., Long, G. V., Scolyer, R. A., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. *Cancer Treatment Reviews*. (2017) 52: 71–81.
46. Schumacher, T. N., & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science*. (2015) 348(6230): 69–74.

ANEXOS

Anexo 1

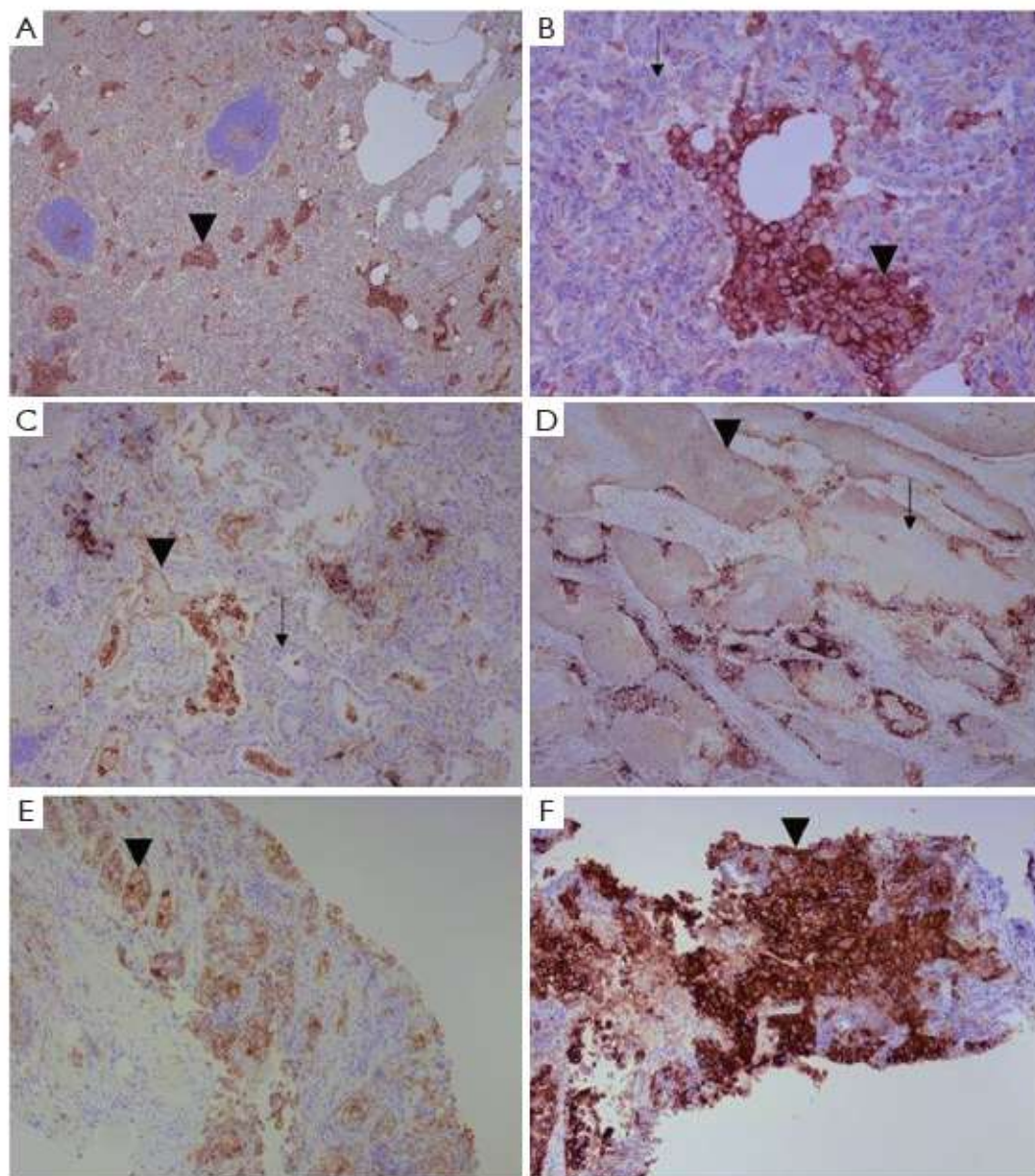


Figura 6- Ejemplo de tinción inmunohistoquímica para valorar la expresión de PD-L1 en diferentes muestras tumorales. Se trata de muestras de NSCLC en los que se utiliza el anticuerpo 22C2 de pharmDx assay. En la imagen A se ve que la tinción de las células es <1%, siendo las zonas más oscuras agregados de macrófagos que no se incluyen esta evaluación. En la imagen B se puede ver también una escasa tinción, viendo células tumorales negativas (flecha) y macrófagos positivos (punta de flecha). En la imagen C se aprecia que la tinción de las células es del 25%, donde la mayoría de las células son negativas (flecha), siendo una minoría positivas (punta de flecha). En la imagen D la tinción es del 75%, encontrándose células positivas (punta de flecha) y negativas (flecha). En la imagen E la tinción es del 100%, al igual que la imagen F, pero se ve como ésta última presenta una mayor intensidad de tinción inmunohistoquímica (representadas ambas con la punta de la flecha).

Anexo 2

Tabla 3- Cuadro resumen de las limitaciones de PD-L1 como biomarcador predictivo de respuesta al tratamiento inmunoterápico debido a su amplia variabilidad en diferentes aspectos.

Factor que modifica la expresión de PD-L1	Por qué se produce
Variabilidad asociada al mecanismo de expresión de PD-L1 (35)	Diferentes vías que producen la expresión de PD-L1 (MAPK, PIK3) Diferentes células que expresan PD-L1 (tumor, sistema inmune)
Variabilidad asociada al microambiente tumoral (21)	Existencia de citoquinas pro-inflamatorias o anti-inflamatorias
Variabilidad temporal y espacial de la muestra (3, 21)	En diferentes etapas del desarrollo tumoral existe variabilidad en la expresión de PD-L1. En distintas muestras tumorales existe variabilidad en la expresión de PD-L1 En diferentes pacientes existe variabilidad en la expresión de PD.L1
Variabilidad asociada a la medición (5, 21)	Diferentes anticuerpos (<i>Dako 22C3, Dako 28-8, el Ventana SP142, y el SP263</i>) que presentan distintos valores de positividad de PD-L1 y diferentes métodos de obtención de la muestra (bioquímicos , anatomopatológicos)

Anexo 3

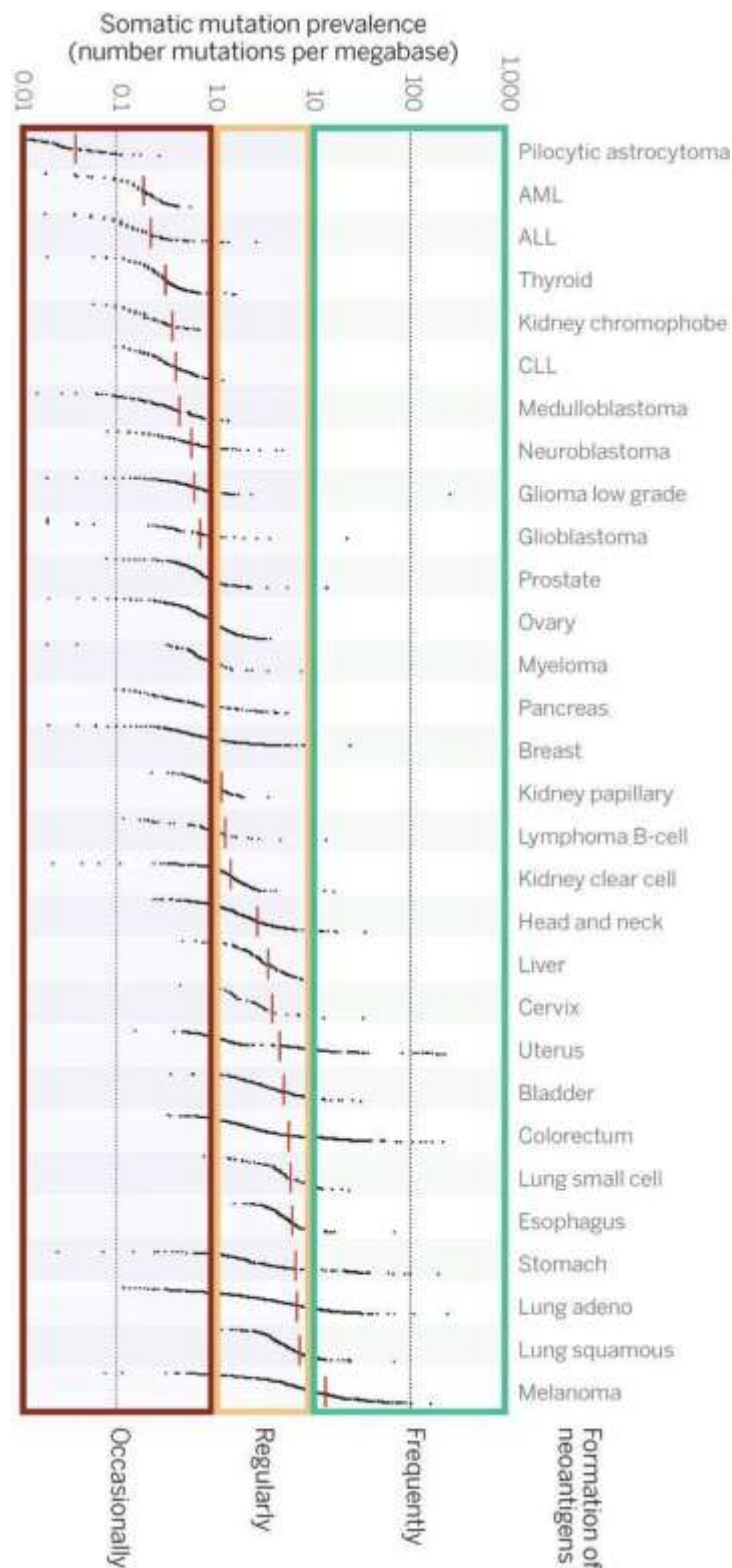


Figura 7-Relación entre la prevalencia de mutaciones somáticas (TMB) y la formación de neoantígenos. En la parte superior aparecen diferentes tumores, ordenados en orden creciente de prevalencia de mutaciones somáticas. Se aprecia que los que tienen una mayor prevalencia, presentan formación de neoantígenos con más frecuencia.⁴⁶

Anexo 4

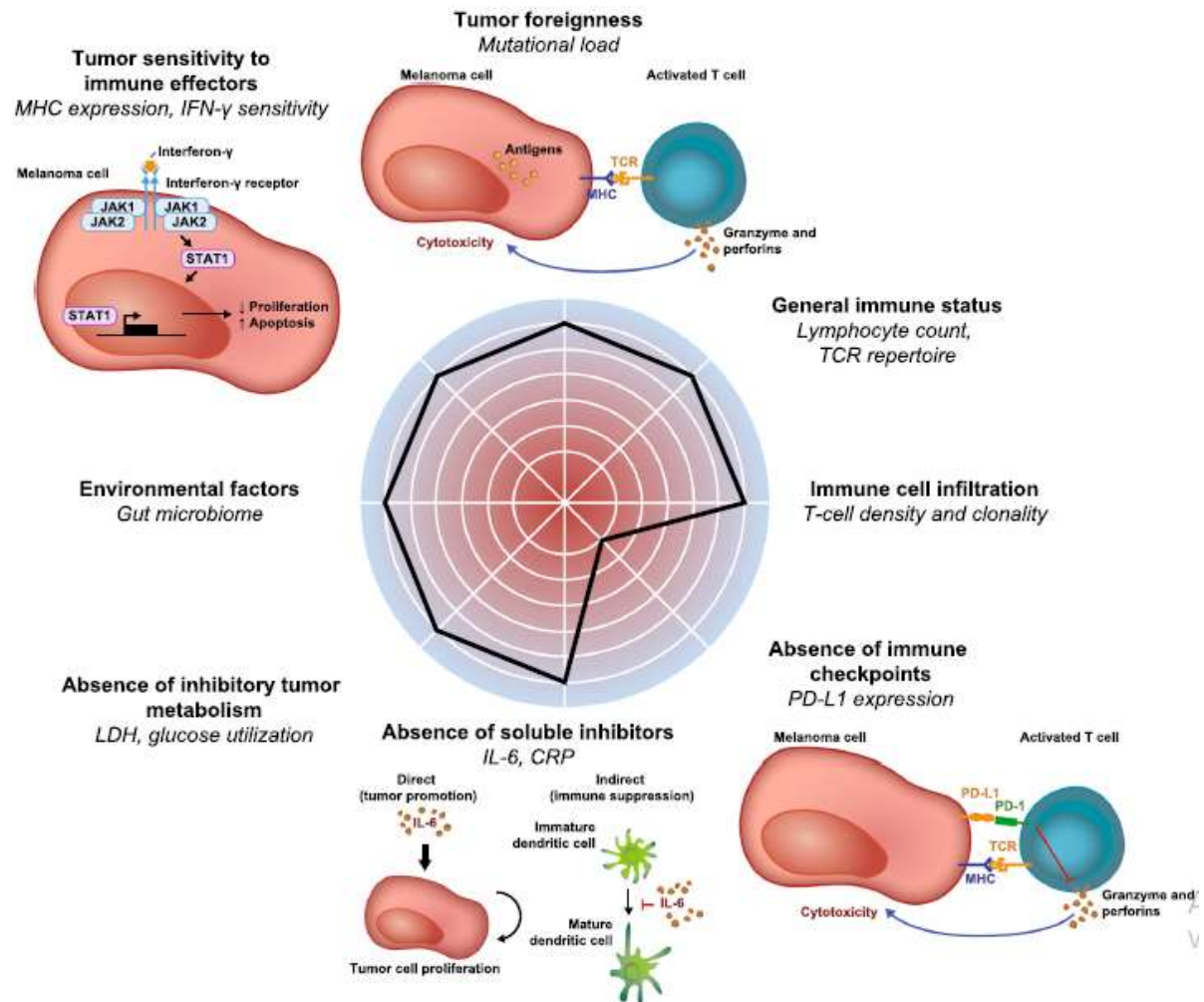


Figura 8- Inmunograma del cáncer que muestra diferentes biomarcadores predictivos de respuesta al tratamiento inmunoterápico. Se muestran condiciones favorables (azul) y desfavorables (rojas) de la interacción del sistema inmune y el cáncer a través de la medición de 8 parámetros en un paciente hipotético. En esta figura se muestran de forma esquemática diferentes parámetros del inmunograma a nivel celular.²⁴