



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina
Departamento de Medicina
Programa de doctorado en Medicina 3139

TESIS DOCTORAL

Factor soluble de PDL1 en pacientes con carcinoma de pulmón no
microcítico avanzado tratados con inhibidores de PD1/PDL1:
determinación de su papel como biomarcador

BEATRIZ HONRUBIA PERIS

DIRIGIDA POR:
DR. ANTONIO LLOMBART CUSSAC
DR. JAVIER GARDE NOGUERA

TUTORA:
PROF. DRA ANA LLUCH HERNÁNDEZ

OCTUBRE 2023

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: LLOMBART CUSSAC, ANTONIO N.I.F. 19850939F, Departamento/Instituto: ONCOLOGÍA MÉDICA Centro: HOSPITAL ARNAU DE VILANOVA DE VALENCIA

2.- Apellidos y nombre: GARDE NOGUERA, JAVIER N.I.F. 48473834-E, Departamento/Instituto: ONCOLOGÍA MÉDICA Centro: HOSPITAL ARNAU DE VILANOVA DE VALENCIA

Tutor o tutora (si procede)

Apellidos y nombre LLUCH HERNÁNDEZ, ANA .N.I.F. 22503898-P, Departamento/Instituto: ONCOLOGÍA MÉDICA Centro: HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA

Directores y tutora, respectivamente, de la tesis doctoral: "FACTOR SOLUBLE DE PD-L1 EN PACIENTES CON CARCINOMA DE PULMÓN NO MICROCÍTICO AVANZADO TRATADOS CON INHIBIDORES DE PD-1/PD-L1: DETERMINACIÓN DE SU PAPEL COMO BIOMARCADOR."

de D/ña. BEATRIZ HONRUBIA PERIS,

estudiante del Programa de Doctorado 3139 Medicina (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe FAVORABLE para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 24 DE OCTUBRE DE 2023

Antonio
Llombart
Cussac
-19850939F

Firmado
digitalmente por
Antonio Llombart
Cussac -19850939F
Fecha: 2023.10.26
08:12:21 +02'00'

JAVIER
GARDE
NOGUERA

Firmado
digitalmente por
JAVIER GARDE
NOGUERA
Fecha: 2023.10.26
14:30:14 +02'00'

ANA MARIA
LLUCH
HERNANDEZ
Z

Firmado
digitalmente por
ANA MARIA LLUCH
HERNANDEZ
Fecha: 2023.10.26
14:14:38 +02'00'

Fdo.: ANTONIO LLOMBART CUSSAC

Fdo.: JAVIER GARDE NOGUERA

Fdo.: ANA LLUCH HERNÁNDEZ

Director

Director

Tutora

ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia, Av. Blasco Ibañez n° 15, 46100-Valencia, Tel. 963864100 - Fax: 963864173
email: doctorado.medicina@uv.es
Web: www.uv.es/doctoradomedicina

A mi marido y mis hijos

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mis agradecimientos a todas las personas que han contribuido a que esta tesis doctoral haya sido posible.

En primer lugar, a mis directores y tutora:

Al Dr. Antonio Llombart Cussac. Mi jefe y ejemplo durante el periodo de residencia en el Hospital Arnau de Vilanova, donde me formé como oncóloga médica con sus valores de esfuerzo, constancia, respeto y humildad.

Al Dr. Javier Garde Noguera. Mi adjunto de referencia durante el periodo de residencia y ahora compañero y amigo al que admiro. Estaré siempre agradecida no solo por su ayuda para realizar esta tesis, sino también por su dedicación y generosidad para hacerme crecer como profesional y como persona.

A la Dra. Ana Lluch Hernández por inspirarnos y ser referente para los que empezamos en este largo camino de la Oncología.

Al Dr. José Vidal Martínez y a la Dra. Leonor Fernández Murga, grandes profesionales a los que he tenido la suerte de cruzarme durante la realización de este trabajo, ofreciéndome sus conocimientos y su tiempo de manera desinteresada.

Al Dr. Delvys Rodríguez, por acogerme como una más en su equipo desde el primer día, enseñarme la importancia de la investigación, pero sobre todo, por mostrarme la parte más humana de la Oncología.

Al servicio de Biología Molecular del Hospital General Universitario de Valencia, por su generosidad al contribuir en este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento para todos aquellos pacientes que han colaborado en este trabajo y a los que se han cruzado en mi camino a lo largo

de estos años. Por ayudarnos a continuar con la investigación, por impulsarnos a mejorar cada día y por regalarnos momentos mágicos de complicidad.

Al servicio de Oncología Médica del Hospital de Sagunto, tanto médicas como enfermeras y auxiliares, al que me siento orgullosa de pertenecer. Por el maravilloso equipo que formamos, por toda la ayuda que me ofrecen día a día y por su maravilloso trato humano con el paciente.

A mis antiguos compañeros del servicio de Oncología Médica del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia, Hospital de La Ribera y Hospital Lluís Alcanyís de Xàtiva, gracias por contribuir en mi aprendizaje.

A mis amigas y a mi prima Ana, por acompañarme desde el primer día en que decidí empezar esta aventura, siempre con palabras de ánimo y cariño.

A mis padres, Jerónimo y Rosa, por su amor incondicional, por ser el mayor y mejor ejemplo y por transmitirme sus valores de trabajo y esfuerzo para poder entender la vida como lo hago ahora.

A mi marido, Jaime, el mejor compañero de viaje, de vida y de hogar, por su amor y ánimo incondicional e incansable.

A Lucas, mi pequeña gran revolución. Gracias por hacerme tan feliz y enseñarme a valorar las cosas que de verdad importan. Vas a ser el mejor hermano mayor.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	11
1. CONCEPTO DE CÁNCER	11
2. CÁNCER DE PULMÓN.....	11
2.1. Epidemiología.....	11
2.2. Factores de riesgo.....	13
<i>Factores de riesgo genéticos.....</i>	<i>13</i>
<i>Factores de riesgo ambientales.....</i>	<i>14</i>
2.3. Clasificación anatomopatológica.....	17
2.4. Patrones de diseminación y estadificación.....	20
2.5. Tratamiento.....	22
<i>Estadios precoces.....</i>	<i>22</i>
<i>Estadios avanzados.....</i>	<i>24</i>
3. Biología Molecular del Cáncer de Pulmón	27
3.1. Características moleculares del cáncer	27
3.2. Alteraciones moleculares del Cáncer de Pulmón.....	29
<i>Oncogenes.....</i>	<i>30</i>
<i>Genes supresores.....</i>	<i>30</i>
3.3. Caracterización Molecular del Carcinoma de Pulmón	31
4. INMUNOTERAPIA	37
4.1. Inhibidores de puntos de control inmunitario	40
4.2. Virus oncolíticos	41
5. BIOMARCADORES DE INMUNOTERAPIA	42
5.1. Biomarcadores en tejido	42
5.2. Biomarcadores solubles.....	46
II. OBJETIVOS.....	51
Objetivos primarios.....	51
Objetivos secundarios.....	51
III. METODOLOGÍA	52
1. Población de estudio.....	52
<i>Características de los Pacientes.....</i>	<i>52</i>
<i>Variables Clínicas.....</i>	<i>52</i>
2. Análisis de la expresión de sPD-L1 por ELISA.....	54
3. Análisis de la expresión de PD-L1 por Inmunohistoquímica	55
4. Análisis estadístico	56
<i>Variables del estudio.....</i>	<i>56</i>
<i>Cálculo de la muestra.....</i>	<i>56</i>
<i>Fases del estudio.....</i>	<i>57</i>
<i>Métodos estadísticos.....</i>	<i>57</i>
IV. RESULTADOS.....	59
1. Análisis descriptivo de las características clínico-patológicas generales de la población.....	59
<i>Toxicidad y efectos de la inmunoterapia</i>	<i>62</i>
2. Expresión de sPD-L1 como biomarcador pronóstico en CPNCP avanzado	63
2.1. Características de los pacientes.....	63
<i>Características según la mediana de expresión sPD-L1.....</i>	<i>63</i>
2.2. Tratamiento y Tasa de Respuesta	65

2.3. Supervivencia Global y Supervivencia Libre de Progresión	66
3. Expresión de PD-L1 por Inmunohistoquímica en pacientes con CPNCP avanzado.....	67
3.1. Características de los pacientes.....	67
<i>Características según expresión de PD-L1 del <1%, 1-49% y >50%</i>	67
<i>Características según expresión de PD-L1 <1% o ≥1%</i>	69
3.2. Tasa de Respuesta.....	71
3.3. Supervivencia Global y Supervivencia Libre de Progresión	72
4. Correlación de expresión de PD-L1 por IHC y de sPD-L1	73
5. Análisis de las variables clínico-patológicas y moleculares pronósticos de supervivencia.....	74
5.1. Supervivencia Global.....	74
V. DISCUSIÓN	76
1. Expresión de sPD-L1 como biomarcador pronóstico y predictivo de respuesta a CPNCP avanzado	76
2. Expresión de PD-L1 en tejido como biomarcador pronóstico y predictivo de respuesta a CPNCP avanzado	78
2.1. Relación entre toxicidad a inmunoterapia y eficacia.....	79
3. Análisis de correlación entre el factor soluble de PD-L1 y PD-L1 en tejido tumoral 80	
VI. CONCLUSIONES FINALES	83
VII. BIBLIOGRAFÍA	84
VIII. ANEXOS	103
1. Dictámenes: Comisión de investigación y Comité Ético de Investigación Clínica. 103	
2. Certificado de concesión de beca de investigación del Grup d'Investigació i Divulgació Oncològica (GIDO).....	104
3. Publicación derivada de la tesis doctoral.	105

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

AJCC/UICC: American Joint Committee on Cancer/Unión Internacional contra el Cáncer

ALK: Kinasa del linfoma anaplásico

aTNM: Estadificación TNM tras la autopsia

APC: Células presentadoras de antígenos

BRAF: B-raf proto-oncogen

CPCP: Carcinoma de célula pequeña

CPH: Complejo principal de histocompatibilidad

CPNCP: Carcinoma de pulmón no célula pequeña

ctADN: ADN circulante

CTCs: Células tumorales circulantes

cTNM: Estadificación clínica TNM

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EMA: Agencia Europea de Medicamentos

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

FISH: Hibridación fluorescente in situ

HR: Hazard ratio

IC: Intervalo de confianza

ICI: Inhibidores de puntos de control inmunitario

IHC: Inmunohistoquímica

IL-: Interleucina

IFN: Interferón

IT: Inmunoterapia

ITK: Inhibidores tirosina quinasa

LDH: Lactato deshidrogenasa

MDSC: Células mieloides supresoras

MSI: Inestabilidad de microsatélites

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

NCI-CTC: National Cancer Institute Common Toxicity Criteria

NGS: Next Generation Sequencing (técnica de secuenciación masiva)

NK: Células Natural Killer
OMS: Organización Mundial de la Salud
OR: Odds ratio (razón de probabilidades)
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1/PD-L1: Proteína de muerte programada 1 y su ligando
PS: Performance Status
pTNM: Estadificación patológica TNM
QT: Quimioterapia
RB1: Proteína retinoblastoma
RNL: Ratio neutrófilo/linfocito
ROS1: Protooncogen proteína tirosina quinasa ROS
RR: Riesgo relativo
RT: Radioterapia
rTNM: Estadificación TNM tras recidiva tumoral
SBRT: Radioterapia estereotáxica
SG: Supervivencia global
SIDA: Síndrome inmunodeficiencia adquirida
SLP: Supervivencia libre de progresión
sPDL1: Factor soluble de PDL1
TAC: Tomografía computarizada
TCR: Receptor de linfocitos T
TGF: Factor de crecimiento
TIL: Linfocitos infiltrantes del tumor
TMB: Carga Mutacional Tumoral
TNM: Tumor/nódulos/metástasis
TR: Tasa de Respuesta
TRK: Receptor quinasa de tropomiosina
TTF-1: factor de transcripción tiroideo
T-VEC: Talimogene Laherparepvec
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular
VIH: Virus Inmunodeficiencia Humana
VPH: Virus Papiloma Humano
yTNM: Estadificación TNM tras tratamiento de inducción

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. CONCEPTO DE CÁNCER

Dentro del nombre de cáncer se engloban un conjunto de patologías que pueden afectar a distintos tipos de células y que tienen en común el crecimiento descontrolado de células neoplásicas. Presentan capacidades biológicas adquiridas para su desarrollo que incluyen, mantener la señalización proliferativa, evadir la supresión del crecimiento resistiendo la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa induciendo la angiogénesis y activar la invasión y la metástasis. Detrás de estos sellos se encuentra la inestabilidad del genoma, que genera la diversidad genética y que acelera su inflamación. Además de las células cancerosas, los tumores presentan otra dimensión de complejidad: contienen un repertorio de células reclutadas aparentemente normales que contribuyen a la adquisición de rasgos distintivos mediante la creación del microambiente tumoral (1).

2. CÁNCER DE PULMÓN

2.1. Epidemiología

El cáncer de pulmón sigue constituyendo una de las principales causas de morbi-mortalidad en el mundo, con aproximadamente 18,1 millones de casos nuevos en todo el mundo en el año 2018 (2). Los tipos de tumores que más se diagnosticaron en el mundo en el año 2018 fueron los de pulmón, mama, colon y recto, próstata y estómago. Los cánceres que produjeron más defunciones en 2018 fueron los de pulmón, colorrectal, páncreas, mama, próstata, hígado, vías biliares y estómago (3) (figura 1). El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en los hombres en todo el mundo y la segunda en las mujeres. A nivel mundial, el cáncer de pulmón se produjo en aproximadamente 2,1 millones de personas en 2018 y causó 1,8 millones de muertes (4).

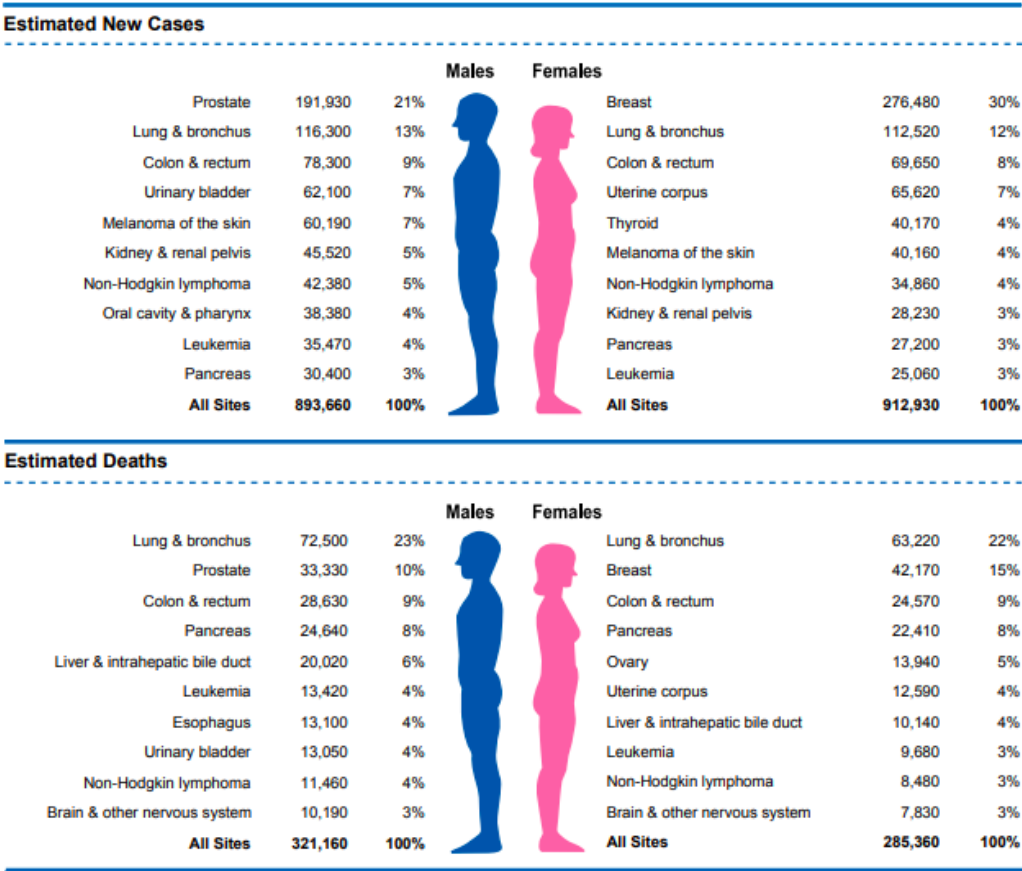
Entre los hombres, el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte en la mayoría de los países de Europa del Este, Asia Occidental, África del Norte, China y Asia Sudoriental. Las tasas de incidencia entre los hombres siguen siendo generalmente bajas en África, aunque son más elevadas en Marruecos y Sudáfrica (2).

Entre las mujeres, el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en 28 países. La mayor incidencia está en América del Norte, Norte y

Oeste de Europa y Australia/Nueva Zelanda. Cabe señalar, que las tasas de incidencia entre las mujeres procedentes de China, no difieren de las observadas entre las mujeres de varios países de Europa Occidental, a pesar de una considerable diferencia en la prevalencia del tabaquismo entre las dos poblaciones. Esto parece estar relacionado con la combustión del carbón para calentar y cocinar. Entre las mujeres, la epidemia está menos desarrollada y a diferencia de los hombres, la mayoría de los países todavía están observando una tendencia creciente en la incidencia. En Estados Unidos, las tasas de incidencia de cáncer de pulmón son ahora más altas entre las mujeres jóvenes que entre los hombres jóvenes. En China e Indonesia, el tabaquismo sigue aumentando, y en varios países africanos es probable que las tasas de cáncer de pulmón continúen aumentando al menos durante las próximas décadas, salvo que se realicen intervenciones para acelerar el abandono del hábito tabáquico o reducirlo (2).

A pesar de las tendencias diferenciales por sexo, las tasas en hombres y mujeres están convergiendo en varios países europeos y se postula que esto es el resultado de las diferencias específicas por sexo en la distribución de subtipos histológicos y por la prevalencia del tabaquismo. Con más del 80% de los cánceres de pulmón en las poblaciones occidentales atribuidos al tabaquismo, la enfermedad, en gran medida, puede ser prevenida mediante el control del consumo de tabaco. Medidas como aumentar impuestos especiales a productos de tabaco, así como la implantación de empaquetado con advertencias sanitarias gráficas y la aplicación de prohibiciones en la publicidad del tabaco, han sido incorporadas al marco de la OMS.

Figura 1. Estimación mundial de nuevos casos y muertes por cáncer en 2020 según los principales tipos de localización del cáncer (Siegel et al., 2020) (2).



2.2. Factores de riesgo

Existen factores genéticos y ambientales que pueden aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón a lo largo de la vida. Aunque pueda haber factores genéticos que predisponen, la mayor parte de ellos son esporádicos.

Factores de riesgo genéticos

El papel de los factores genéticos como causa del cáncer de pulmón no es del todo conocido. Los familiares de primer grado de personas con cáncer de pulmón tienen un mayor riesgo de desarrollarlo. Un metaanálisis con 28 estudios de casos y controles y 17 estudios de cohortes observacionales, reveló un aumento del riesgo de cáncer de pulmón asociado con tener un familiar afecto (RR 1,8; IC del 95%: 1,6-2) (5). Como resultado, presentaron mayor riesgo las personas con familiares diagnosticados de cáncer de pulmón a una edad temprana y aquellos con múltiples familiares afectados. El aumento del riesgo en familiares de pacientes con cáncer de pulmón de inicio temprano parece extenderse a neoplasias

malignas de origen no pulmonar (6). Se precisa de mayor investigación para identificar los genes involucrados con un riesgo más elevado.

Factores de riesgo ambientales

La mayoría de los datos en epidemiología del cáncer de pulmón, provienen de países desarrollados, donde el tabaquismo es el factor de riesgo predominante. El tabaquismo, se estima que representa aproximadamente el 90% de todos los cánceres de pulmón (7). Es probable que los esfuerzos en el control del tabaquismo reduzcan la incidencia de cáncer de pulmón. En un estudio comparativo que utilizó datos de Estados Unidos sobre el tabaquismo y la mortalidad por cáncer de pulmón desde 1960 hasta principios de 2010, se estimó que la tasa anual por cáncer de pulmón ajustada por edad, descendería en un 79% entre 2015 y 2065 (8). Sin embargo, todavía se espera que ocurran 4,4 millones de muertes por cáncer de pulmón durante este período.

Fumar tabaco, principalmente cigarrillos, es el factor de riesgo más importante para el desarrollo del cáncer de pulmón. El tabaquismo pasivo también es una causa importante. La estimación del RR de cáncer de pulmón en el fumador crónico en comparación con el nunca fumador, pasa de 10 a 30. El riesgo acumulado de cáncer de pulmón entre los grandes fumadores puede llegar al 30%, en comparación con un riesgo de por vida de menos del 1% en los nunca fumadores (9). El abandono del hábito tabáquico puede ser beneficioso incluso entre pacientes que ya han sido diagnosticados de cáncer de pulmón. En un metaanálisis, el tabaquismo continuo en los pacientes con cáncer de pulmón en estadio precoz, se asoció con una mayor probabilidad de mortalidad por recurrencia del tumor y desarrollo de un segundo tumor primario (10). Incluso si los pacientes no pueden abandonar el hábito, que lo disminuyan, puede resultar en una reducción del daño y un menor riesgo de cáncer de pulmón. Esto se observó en un estudio observacional que incluyó a 19.714 adultos, en el cual se encontró que los fumadores que consumían > 15 cigarrillos u otra forma equivalente de tabaco, pero lo reducían al menos un 50%, reducían su riesgo por cáncer de pulmón en un 27% después de un seguimiento medio de 18 años (11). El efecto de los cigarrillos electrónicos sobre la incidencia del cáncer de pulmón no está bien establecido, debido a otros factores de confusión a la hora de desarrollar estudios.

Respecto a la detección precoz del cáncer de pulmón, existen dos estudios (12,13) que han demostrado que el TAC pulmonar en población de riesgo (grades fumadores) puede detectar de forma precoz el cáncer de pulmón y reducir el riesgo de muerte asociado a esta enfermedad, pero hasta el momento no ha sido aprobado en la en la mayoría de países europeos. Este método, presenta ciertos daños potenciales como son el hallazgo de lesiones benignas que precisarían de estudios invasivos para ser confirmadas, la exposición a irradiación, la ansiedad generada al paciente o el sobrediagnóstico, que dificultan su validación. Algunos expertos recomiendan los programas de detección precoz en poblaciones muy bien definidas, que incluyen sobretodo personas con largo historial de hábito tabáquico (14). Es importante destacar que la radiografía de tórax no es una herramienta útil y tampoco existe ningún parámetro analítico que permita el diagnóstico precoz de cáncer de pulmón.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), se debe principalmente al tabaquismo. Sin embargo, se asocia de forma independiente con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, probablemente relacionado con la inflamación y la cicatrización que forman parte del desarrollo de la EPOC. Es el factor de riesgo independiente más común, además del tabaquismo, lo que aumenta el riesgo de cáncer de pulmón entre 6 y 13 veces (15). Además, otras enfermedades pulmonares benignas se han asociado con un mayor riesgo de cáncer de pulmón, que parece estar relacionado de la misma manera, con la inflamación crónica. Los datos más extensos provienen de un análisis combinado del Consorcio Internacional de Cáncer de Pulmón, que analizó 24.607 casos de cáncer de pulmón y 81.829 controles en 17 estudios. El riesgo de cáncer de pulmón fue elevado en pacientes con antecedentes de enfisema (OR 2,44; IC del 95%: 1,64-3,62), bronquitis crónica (OR 1,47; IC del 95%: 1,29-1,68), neumonía (OR 1,57; IC del 95%: 1,22-2,01) y tuberculosis (OR 1,48; IC del 95%: 1,17-1,87). El aumento del riesgo se observaba en todas las histologías de cáncer de pulmón y fue similar en nunca fumadores, exfumadores y fumadores (excepto en la bronquitis crónica en no fumadores) (16).

Otros numerosos carcinógenos ocupacionales y ambientales aumentan el riesgo de cáncer de pulmón. Los elementos más conocidos son el amianto y el radón (17,18) Otras exposiciones que se han asociado al cáncer de pulmón incluyen

arsénico, éter, cromo, formaldehído, radiación ionizante, níquel, hidrocarburos aromáticos policíclicos, polvo de metales duros y cloruro de vinilo. Muchos de estos factores actúan de forma sinérgica con el humo del tabaco para desarrollar cáncer de pulmón y también son factores de riesgo independientes en no fumadores (17,19–21). También se ha observado la relación de la contaminación atmosférica con el cáncer de pulmón (22). La radioterapia, puede aumentar el riesgo de un segundo cáncer de pulmón primario en pacientes que han sido tratados por otras neoplasias malignas. Este aumento del riesgo parece ser mayor en los fumadores (23).

La incidencia del cáncer de pulmón es diferente según la etnia o raza. Las personas hispanas tiene menor probabilidad de padecerlo que las personas de raza blanca no hispana, aunque esta diferencia se debilita en los análisis multivariados, lo que sugiere que otros factores están involucrados (características del tabaquismo, actividad física, etc) (24). Algunos comportamientos potencialmente modificables como la dieta rica en frutas y verduras, se consideran una de las causas que explican la heterogeneidad en el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón entre personas con factores de riesgo similares, pero estos datos no se han reproducido en ensayos clínicos. Por otra parte, los suplementos de vitamina B6 y B12 podrían estar asociados a un mayor riesgo de cáncer de pulmón entre los hombres, pero no entre las mujeres (25), aunque se necesitan más estudios para evaluar este riesgo. Se ha estudiado el betacaroteno como agente quimiopreventivo, sin embargo no se ha demostrado ningún beneficio en los suplementos. En un metaanálisis de ensayos de quimioprevención, se observó que la suplementación con dosis altas de betacaroteno aumentaba significativamente la incidencia de cáncer de pulmón en pacientes fumadores (OR 1,24; IC 95%: 1,10-1,39). Entre los exfumadores, la diferencia no fue significativa (OR 1,10; IC 95%: 0,84-1,85) (26). Existen también datos sobre el impacto del estrógeno y la progesterona en el desarrollo del cáncer de pulmón, aunque su papel no está bien definido (27).

Los virus oncogénicos no tienen un papel establecido como agentes etiológicos en el desarrollo de cáncer de pulmón. Se ha planteado la relación entre VPH y el carcinoma de células escamosas de pulmón, debido a la presencia de ADN del virus en carcinoma de células escamosas de otros tumores, como en cuello

uterino, ano, piel, esófago y vías respiratorias superiores (28), pero estos estudios no han dado resultados claros. Parece que los pacientes con VIH tienen un mayor riesgo de cáncer de pulmón, pero sin embargo, el cáncer de pulmón se considera un cáncer que no define al SIDA.

2.3. Clasificación anatomopatológica

La clasificación anatomopatológica del cáncer de pulmón se basa en técnicas histológicas y patológicas. La clasificación de los carcinoma de pulmón por subtipo histológico proporciona información importante sobre el pronóstico, es necesaria para la decisión terapéutica y se realiza sobre muestras de tejido de biopsia obtenidas mediante broncoscopia, punciones o procedimientos quirúrgicos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció la clasificación del cáncer de pulmón que se proporciona en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación del Carcinoma de Pulmón de la OMS (2015) (29).

Adenocarcinoma
<ul style="list-style-type: none"> • Lepídico • Acinar • Papilar • Micropapilar • Sólido • Invasivo mucinoso • Fetal • Entérico • Mínimamente invasivo • Preinvasivo (hiperplasia atípica adenomatosa, in situ)
Adenoescamoso
Escamoso
<ul style="list-style-type: none"> • Papilar • Célula clara (característica citológica) • Basaloide • Queratinizante y no queratinizante
Célula grande
Sarcomatoide
Neuroendocrino
<ul style="list-style-type: none"> • Célula pequeña • Carcinoide típico y atípico

El Carcinoma de Pulmón No Célula Pequeña (CPNCP) representa aproximadamente el 80% de todos los cánceres de pulmón, y un tercio de ellos presentan enfermedad localmente avanzada o metastásica en el momento del diagnóstico (30).

El adenocarcinoma es el tipo histológico más frecuente de cáncer de pulmón actualmente y representa aproximadamente la mitad de los casos. En el diagnóstico histológico se requiere de formación de glándulas neoplásicas, expresión de marcadores de neumocitos (TTF-1 +/- napsina) o mucina intracitoplasmática. Existe una variación significativa de la arquitectura de las glándulas neoplásicas y los subtipos principales muestran un patrón de crecimiento acinar, micropapilar, lepidico, sólido o con expresión de marcadores de mucina. Entre ellos, los patrones menos comunes son el cribiforme, coloide, entérico y fetal. Los patrones cribiforme, sólido y micropapilar tienen un pronóstico adverso (31), aunque los patrones sólido y micropapilar también pueden predecir mayor beneficio al tratamiento de quimioterapia adyuvante tras resección completa (32). Por otro lado, los avances en la comprensión de las vías moleculares específicas del adenocarcinoma han abierto nuevas vías de tratamiento, y la caracterización molecular de los pacientes está dando como resultado el uso de agentes con altos niveles de actividad antitumoral, en particular para aquellos con mutaciones.

Los carcinomas adenoescamosos tiene una incidencia que va del 0,4% al 4%, y se definen como tumores con más del 10% de componentes glandulares y escamosos malignos, por lo que su histología mixta representa la heterogeneidad de los carcinomas de pulmón (33). Es un tumor agresivo y parece tener un pronóstico más desfavorable que el adenocarcinoma o el carcinoma de células escamosas (34). Como estos tumores están constituidos por un componente glandular, se recomienda realizar el estudio molecular.

El diagnóstico del carcinoma de células escamosas, se basa en la presencia de producción de queratina por las células tumorales y/o desmosomas intercelulares denominados puentes intercelulares, o por inmunohistoquímica compatible, como la expresión de p40, p63, CK5/6 o desmogleína. La expresión

de p63 no es completamente específica y se puede observar reactividad también en adenocarcinomas, por ello, la OMS recomienda utilizar p40 (29). El 60-80% de las células escamosas surgen en las porciones proximales del árbol traqueobronquial por metaplasia o displasia, y pueden mostrar una necrosis central extensa con cavitación (35). Por otra parte, la mayoría de los pacientes con carcinoma de células escamosas con patrón endobronquial exofítico, se diagnostican en estadio precoz y por tanto presentan mejor pronóstico, siendo las tasas de supervivencia a cinco años superiores al 60% (36).

En cuanto al diagnóstico por IHC, cabe destacar que el adenocarcinoma suele ser positivo para el factor de transcripción tiroideo (TTF-1), mucina, napsina-A, surf-A, surf-B, PAS-D y CK7. Sin embargo, el carcinoma de células escamosas, suele ser positivo para p40, p63 y citoqueratina 5/6 (CK5/6) y por lo general, negativo para CK7. Es importante diferenciar el carcinoma escamoso de otros carcinomas de células no pequeñas, en particular del adenocarcinoma y sobre todo en los pacientes con enfermedad en estadio avanzado, ya que ciertos agentes, como el Pemetrexed están contraindicados para pacientes con histología escamosa debido a su menor eficacia, o por su potencial aumento de toxicidad como ocurre con el Bevacizumab.

Existen otros tipos histológicos menos frecuentes, como el carcinoma de células grandes, que carece de diferenciación glandular, escamosa o neuroendocrina por inmunohistoquímica y también de características del carcinoma de células pequeñas por citología. Suele presentarse como una gran masa periférica con predominante necrosis. Otro tipo es el carcinoma sarcomatoide, que representa un grupo heterogéneo de carcinomas de pulmón de células no pequeñas, y tienen componente epitelial y de sarcoma (37).

Por último, los Carcinomas de Células Pequeñas (CPCP) y los carcinomas neuroendocrinos de células grandes, se caracterizan clínicamente por su agresividad y patológicamente por tener una tasa mitótica más elevada en comparación con los carcinoides pulmonares (11 o más mitosis por 10 campos de gran aumento). El índice de proliferación (Ki67) puede ayudar en el diagnóstico diferencial de carcinoma neuroendocrino de células pequeñas y de

células grandes de los carcinoides, pero no forma parte de los criterios de diagnóstico (29). El CPCP engloba aproximadamente el 15% de los carcinomas broncogénicos y tiene una fuerte correlación con el hábito tabáquico, llegando a ser extremadamente raros en personas nunca fumadoras. Son tumores heterogéneos y quimiosensibles. Otra de sus características es que las células son frágiles y los tumores son generalmente muy necróticos, lo que puede dificultar su diagnóstico histológico en muestras pequeñas. Las células tumorales suelen ser positivas para cromogranina o sinaptofisina (29).

El estudio de las alteraciones moleculares del cáncer de pulmón contribuye a entender mejor el proceso de carcinogénesis. La aplicación de técnicas de biología molecular unidas al conocimiento de las neoplasias, permite la identificación de múltiples mutaciones clínicamente relevantes que nos abren un camino hacia una nueva clasificación molecular de estas neoplasias. Estas alteraciones moleculares se describirán con más detalle en el apartado 3.3 “Caracterización Molecular del Cáncer de Pulmón”.

2.4. Patrones de diseminación y estadificación

El cáncer de pulmón se puede diseminar por vía hematógica y linfática, así como por diseminación contigua. Los lugares más frecuentes de diseminación son los ganglios regionales, pulmones, hígado, cerebro o glándulas adrenales.

Para realizar el diagnóstico, es necesario la determinación del estadio del cáncer en función de su extensión anatómica. La estadificación del cáncer de pulmón se basa en la “Clasificación de Tumores Malignos” y engloba tres parámetros: el tamaño tumoral, la infiltración de nódulos linfáticos y la presencia o no de metástasis (Tumor/Nódulos/Metástasis – TNM), propuesto por el American Joint Committee on Cancer / Unión Internacional contra el Cáncer (AJCC/UICC) (tabla 2 y tabla 3).

Esta estadificación se puede realizar en diferentes momentos del proceso diagnóstico y terapéutico, como puede ser: antes del inicio del tratamiento (estadificación clínica, cTNM), después o durante el tratamiento de inducción (estadificación yTNM), tras el tratamiento quirúrgico (estadificación patológica,

pTNM), en el momento de la recidiva tumoral después de un intervalo libre de enfermedad (estadificación rTNM) o en la autopsia (estadificación aTNM) (38). La estadificación clínica permite la elección del mejor tratamiento para el paciente, mientras que la patológica es más precisa que la clínica y se ajusta más la realidad de la extensión tumoral, ya que sirve para establecer un pronóstico. La estadificación durante o tras el tratamiento de inducción, permite conocer si se ha producido algún cambio tumoral en la clasificación clínica, y decidir si el paciente puede ser candidato a un tratamiento quirúrgico tras la terapia de inducción.

Tabla 2. Clasificación TNM para Carcinoma de Pulmón (8ª edición de la AJCC) (38).

TUMOR PRIMARIO (T)	
Tx	Tumor primario no pudo ser evaluado
T0	No evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤ 3cm rodeado por pulmón o pleura visceral sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal de bronquio lobar
T1a(mi)	Adenocarcinoma mínimamente invasivo
T1a	Tumor ≤ 1cm
T1b	Tumor > 1cm pero ≤ 2cm
T1c	Tumor > 2cm pero ≤ 3cm
T2	Tumor > 3cm pero ≤ 5cm y cumple alguna de estas características: <ul style="list-style-type: none"> - Afecta al bronquio principal independientemente de la distancia a la carina pero sin afectación de la carina - Invade la pleura visceral - Asocia atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar, involucrando parte o todo el pulmón
T2a	Tumor > 3cm pero ≤ 4cm
T2b	Tumor > 4cm pero ≤ 5cm
T3	Tumor > 5cm pero ≤ 7cm o asociado a nódulos tumorales separados en el mismo lóbulo que el tumor primario o invade directamente cualquiera de estas estructuras: pared torácica (incluida pleura parietal), nervio frénico, pericardio parietal
T4	Tumor ≥ 7cm o asociado a nódulos tumorales en un lóbulo ipsilateral diferente al del tumor primario o invade cualquiera de estas estructuras: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral y carina
GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES (N)	
Nx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	Ausencia de ganglios linfáticos

N1	Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales ipsilaterales y/o hiliares ipsilaterales e intrapulmonares
N2	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales
N3	Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escalenos ipsilaterales o contralaterales o supraclaviculares
METÁSTASIS A DISTANCIA (M)	
M0	No metástasis a distancia
M1a	Nódulos tumorales separados en un lóbulo contralateral, nódulos pleurales o pericárdicos o derrame pleural o pericárdico maligno
M1b	Metástasis extratorácica única
M1c	Múltiples metástasis extratorácicas en uno o más órganos

Tabla 3. Agrupación por estadios (8ª edición de la AJCC) (38).

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

2.5. Tratamiento

La elección del tratamiento depende de la histología del tumor, de la extensión de la enfermedad, de la localización del tumor primario y de la comorbilidad y estado basal del paciente.

Estadios precoces

El diagnóstico de cáncer de pulmón en estadios precoces es poco frecuente debido a que los síntomas en esta fase son inespecíficos y ello conduce a un retraso en el diagnóstico. A menudo, el carcinoma de pulmón en estadio I y II se diagnostica de forma incidental durante el estudio de otras patologías.

La estrategia terapéutica en estadios precoces es diferente en el CPCP y el CPNCP.

En el CPNCP la resección quirúrgica ofrece la mejor oportunidad de supervivencia y curación. La indicación de resección quirúrgica incluye la estadificación preoperatoria, la evaluación del estado funcional del paciente y sus comorbilidades, y la predicción de la capacidad funcional respiratoria postoperatoria. Un paciente con un carcinoma de pulmón resecable puede ser inoperable si presenta comorbilidades o una función pulmonar deficiente. Actualmente, el estudio molecular del tejido tumoral no influye en la decisión terapéutica inicial en estadios precoces del CPNCP, pero sirve como guía en aquellos pacientes que presentan recidiva tras el tratamiento primario.

Los pacientes con CPNCP estadio I o II deben tratarse con resección quirúrgica completa siempre que sea posible (39). La quimioterapia basada en doblete de platino y/o radioterapia adyuvante mejora la supervivencia en pacientes con estadio II patológico, y la quimioterapia puede tener beneficio en los pacientes con estadio IB (40,41). Los pacientes con estadio I o II no candidatos a resección quirúrgica o que rechazan la cirugía, pueden ser candidatos a terapias locales como la radioterapia (RT) convencional o estereotáxica (SBRT) (42) y otras técnicas locales, como la ablación por radiofrecuencia.

Para los pacientes con estadio III no resecable se utiliza el tratamiento combinado con quimioterapia y radioterapia concomitante o secuencial (43) e inmunoterapia de consolidación con Durvalumab si no ha habido progresión de enfermedad en pacientes con expresión de PD-L1 $\geq 1\%$ (44). La cirugía también puede ser una opción terapéutica en las lesiones T3 o T4 con ganglios linfáticos mediastínicos negativos, así como la terapia neoadyuvante si se considera que puede ser potencialmente resecable (45).

El CPCP se presenta como enfermedad diseminada al diagnóstico en la mayoría de los pacientes, pero por el contrario, es muy quimiosensible, y por ello la terapia sistémica es una parte integral del tratamiento inicial, también en estadio precoces. Los pacientes se tratan con la combinación de quimioterapia y radioterapia, ya que se ha demostrado que la adición de la radioterapia prolonga la supervivencia en comparación con la quimioterapia sola (46). La radioterapia craneal profiláctica disminuye la incidencia de metástasis cerebrales y prolonga la supervivencia en pacientes con CPCP estadio limitado a tórax que responden al tratamiento inicial (47).

Estadios avanzados

Hasta hace unos años, la simple separación patológica entre el CPCP y el CPNCP junto con el estadio, era suficiente para decidir la estrategia terapéutica adecuada. Desde 2008, se ha demostrado que la separación del adenocarcinoma y el carcinoma epidermoide es importante para determinar la inmunoterapia y/o quimioterapia óptima para la enfermedad en estadio IV. Además, para elegir la mejor estrategia terapéutica, existen otros factores a tener en cuenta como son la alta expresión de PD-L1, la presencia de alteraciones moleculares (EGFR, ALK, ROS1, BRAF) y la extensión de la enfermedad, así como el número de metástasis. El tratamiento estándar de primera línea para los pacientes con CPNCP con enfermedad avanzada ha sido durante décadas la quimioterapia con un doblete basado en una sal de platino (48), pero en los últimos años, nuevas estrategias han demostrado prolongar la supervivencia global de los pacientes y han cambiado el tratamiento estándar de primera línea: los tratamientos dirigidos a diana molecular y la inmunoterapia.

La monoterapia con inhibidores de PD-1 y PD-L1, Nivolumab, Pembrolizumab y Atezolizumab, fue aprobada tras demostrar beneficio en supervivencia global frente a Docetaxel en tratamiento de segunda línea del CPNCP. De todos ellos, el primer fármaco inmunomodulador aprobado para el tratamiento de segunda línea fue Nivolumab. En el estudio aleatorizado de fase III en comparación con Docetaxel, se mostró un beneficio en términos de supervivencia global (tasa de supervivencia a 1 año, 51 frente al 39%; y la tasa de supervivencia a los 18 meses, 39 vs 23%) y de tasa de respuesta (19 vs 12%, $p = 0,02$). La eficacia de Nivolumab fue mayor en función de los niveles predefinidos de expresión de PD-L1 ($\geq 1\%$, $\geq 5\%$ y $\geq 10\%$), mientras que no mostró ninguna mejora en el subgrupo de pacientes sin expresión de PD-L1. Sin embargo, la aprobación de Nivolumab para el tratamiento de segunda línea tanto en pacientes con tumores de histología escamosa como no escamosa, no se condicionó a la expresión de PD-L1 (37). El estudio Keynote-010, demostró beneficio en supervivencia global a favor de Pembrolizumab frente a Docetaxel en el tratamiento de segunda línea de pacientes con CPNCP con expresión de PD-L1 $>1\%$ (49). Por último, el estudio OAK, demostró beneficio en supervivencia global de Atezolizumab frente

Docetaxel (15 meses vs 10 meses), independientemente de la expresión de PD-L1 y de la histología (50).

Se ha demostrado el beneficio de estos agentes en primera línea de tratamiento en combinación con quimioterapia o en monoterapia, dependiendo de la expresión de PD-L1. En pacientes con expresión de PD-L1 >50%, Pembrolizumab en monoterapia (51,52) o Cemiplimab en monoterapia (53) es el nuevo estándar de tratamiento, pero en pacientes con expresión de PD-L1 menor al 50%, el tratamiento de elección es la combinación de quimioterapia e inmunoterapia. En cuanto a la selección de la quimioterapia, no existe una combinación única, por lo que se elegirá basándose en la histología de tumor. En los pacientes con CPNCP no escamoso, la opción más utilizada es la combinación de platino con Pemetrexed y Pembrolizumab. Este esquema ha demostrado beneficio en supervivencia global respecto a la quimioterapia (54). La combinación de quimioterapia, Bevacizumab y Atezolizumab es otra alternativa potencial en pacientes sin mutación EGFR ni translocación de ALK (55). Para los pacientes con CPNCP escamoso y expresión de PD-L1 <50%, el esquema más utilizado es Carboplatino con Paclitaxel o Nab-Paclitaxel y Pembrolizumab, por el beneficio demostrado respecto a quimioterapia sola (56). Por otra parte, Nivolumab más Ipilimumab es otra opción aprobada por la FDA pero no por la EMA para pacientes con expresión de PD-L1 ≥1% (57). El esquema de Nivolumab e Ipilimumab junto con dos ciclos de quimioterapia, también está aprobado en tumores independientemente de la expresión de PD-L1 (58).

La llegada de este nuevo arsenal terapéutico ha aumentado la esperanza de vida de los pacientes con cáncer de pulmón avanzado, y abre un nuevo debate con respecto a la secuencia de tratamiento óptimo. La clave para decidir el tratamiento debe basarse en la identificación de factores predictivos, que permitirá la selección de los pacientes que se beneficiarán más de algunos de los tratamientos.

Por otra parte, una mejor comprensión de las vías moleculares del CPNCP, ha llevado al desarrollo de agentes dirigidos a dianas específicas. El tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa (ITK) como Osimertinib, Erlotinib, Gefitinib, Afatinib, en pacientes con mutación EGFR, están indicados como agentes únicos

en el tratamiento de primera línea, ya que mejora los resultados en comparación con la quimioterapia basada en platino. Entre los ITK, Osimertinib ha demostrado mayor beneficio en SLP y SG sobre Erlotinib y Gefitinib (59). La inhibición del receptor VEGF utilizando Bevacizumab o Ramucirumab más la inhibición de EGFR parece mejorar la SLP en relación con la monoterapia con ITK de primera generación, pero no en todos los ensayos clínicos (60,61). La combinación de Ramucirumab y Erolitinib está aprobada por la FDA para el tratamiento de primera línea de CPNCP avanzado con mutación EGFR (62). Sin embargo, la adición de anti-VEGFR no ha demostrado beneficio en SG en ningún ensayo, pero sí aumento de toxicidad y solo ha sido comparado contra ITK de generaciones anteriores en lugar de Osimertinib.

Los pacientes con mutación EGFR inserción del exón 20, que hayan progresado a quimioterapia basada en platino (con o sin inmunoterapia), se recomienda el tratamiento con Amivantamab (63) o Mobocertinib (64).

En pacientes con reordenamiento de ALK, el tratamiento con un ITK como Alectinib, Crizotinib, Ceritinib, Brigatinib o Lorlatinib es superior a la quimioterapia en primera línea (65–67). De la misma manera, el tratamiento de elección en pacientes con mutaciones de ROS1 es Crizotinib, Ceritinib, o Entrectinib (68,69). Existen otras mutaciones como son NTRK, MET o RET poco relevantes en la práctica clínica actualmente por su baja incidencia, pero que cuentan con fármacos dirigidos de alta eficacia (70,71).

Por último, el estándar de tratamiento del CPCP es, hasta el momento, la combinación basada en sal de platino, siendo el esquema con Cisplatino o Carboplatino y Etopósido el más utilizado en la práctica clínica (72). Recientemente se ha demostrado beneficio en supervivencia global al combinar este esquema de quimioterapia con inmunoterapia (Atezolizumab o Durvalumab), siendo el primer avance terapéutico en primera línea desde 1990 (73).

Existe un interés creciente en la identificación de biomarcadores predictivos que podrían permitir una mejor estratificación de los pacientes, con el objetivo de ayudar a los oncólogos y a sus pacientes en la toma de decisiones terapéuticas.

3. Biología Molecular del Cáncer de Pulmón

3.1. Características moleculares del cáncer

El cáncer de pulmón es el resultado final de la acción de múltiples factores que lesionan el epitelio bronquial. Además de los factores ambientales, existen factores genéticos y metabólicos de susceptibilidad como los polimorfismos detectados en las enzimas implicadas en la metabolización de carcinógenos, o los defectos en la reparación de los errores en el ADN (74). Hanahan y Weinberg postularon en el año 2000 las características del desarrollo del cáncer (Hallmarks of cancer), que comprendían seis capacidades biológicas adquiridas a lo largo de varios pasos. Estas eran mantener la señalización proliferativa, insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento, resistir la muerte celular, permitir la inmortalidad replicativa, inducir la angiogénesis y activar la invasión y metástasis. Detrás de estos sellos, se encuentra la inestabilidad del genoma que acelera la inflamación. El progreso conceptual en la última década, ha agregado dos sellos emergentes a esta lista, que son la reprogramación del metabolismo energético y evadir la destrucción. Además, estos autores refieren que la biología de los tumores no puede entenderse únicamente por la enumeración de los rasgos del cáncer, y se añade el término de microambiente tumoral (1).

1. Independencia de las señales del crecimiento

En la biología normal de la célula, se precisa de señales mitogénicas para pasar de un estado quiescente a un estado proliferativo. Las células tienen receptores transmembrana a los que se unen diferentes tipos de moléculas de señalización o comunicación intercelular para enviar estas señales estimuladoras al interior celular, y sin ellas, las células no pueden crecer. Por el contrario, las células tumorales pueden crecer sin necesidad de que se produzcan dichas interacciones, generando sus propias señales de crecimiento, o bien activando intrínsecamente a los receptores transmembrana en ausencia de ligando.

2. Insensibilidad a las señales inhibitorias de crecimiento

Existen señales antiproliferativas que funcionan en las células normales para mantener la homeostasis tisular. A través de la proteína retinoblastoma (RB1), las señales inhibitorias del crecimiento son finalmente canalizadas y por eso en muchos tumores aparece mutada. La disrupción de la vía de RB1 en las células

neoplásicas permite la liberación de factores de transcripción, que controlan la expresión de genes esenciales del ciclo celular y así la proliferación, haciendo a las células insensibles frente a los factores supresores del crecimiento.

3. Evasión de la apoptosis

La capacidad para expandirse de las poblaciones de células tumorales está determinada por una ratio entre mitosis y muerte celular por necrosis o apoptosis. Existen diferentes estrategias por lo que las células tumorales pueden presentar resistencia a la apoptosis, siendo la más común la pérdida de función del regulador TP53 debido a mutaciones.

4. Potencial replicativo ilimitado

Las células de los mamíferos poseen un programa intrínseco para limitar el número de divisiones celulares. Al pasar este límite, las células detienen su crecimiento e inician un proceso denominado senescencia. En las células normales, este proceso se produce por la pérdida de la función protectora de los telómeros, en cambio, en las células neoplásicas, se ha objetivado el mantenimiento de la longitud de los telómeros debido a una mayor actividad de la enzima telomerasa.

5. Angiogénesis sostenida

La generación de nuevos vasos sanguíneos es imprescindible para el aporte de oxígeno y nutrientes a las células tumorales y así favorecer el crecimiento. Los tumores tienen la capacidad de activar la angiogénesis inclinando la balanza a favor de los inductores de este proceso.

6. Invasión tisular y metástasis

La capacidad de invasión permite a las células neoplásicas colonizar otras partes del cuerpo. Este proceso se denomina metástasis, y para completarlo precisa de las cinco características anteriores. Estos procesos son extremadamente complejos, involucrando las relaciones físicas entre las células y su microambiente, así como la activación de proteasas extracelulares.

7. Inestabilidad genómica y mutación

Las diferentes alteraciones en el genoma de las células neoplásicas, produce las múltiples alteraciones mencionadas en los apartados anteriores.

8. Inflamación

Se ha demostrado que los tejidos inflamados de forma crónica son más susceptibles de desarrollar tumores. Acompañando al proceso de inflamación, se generan sustancias químicas muy reactivas que producen un marcado papel genotóxico en las células. Se ha observado que la inflamación aparece en muchos casos en las etapas iniciales del cáncer y por ello, parece ser esencial en el proceso. Esto se debe a que puede producir inestabilidad genética, permitiendo la acumulación de alteraciones moleculares.

9. Reprogramación del metabolismo energético

La proliferación celular crónica y a menudo incontrolada que representa la esencia de la enfermedad neoplásica, implica, no solo el control desregulado de la proliferación celular, sino también ajustes del metabolismo energético para impulsar el crecimiento de las células. Otto Warburg observó que incluso en presencia de oxígeno, las células cancerosas pueden reprogramar su metabolismo de la glucosa y por tanto su producción de energía, una característica anómala en el metabolismo energético que denominó “glucólisis aerobia” (75).

10. Evasión del sistema inmunológico

Se cree que las células tumorales logran de alguna manera evitar ser detectadas por el sistema inmune mediante la desactivación de componentes inmunológicos que han sido enviados para eliminarlas.

3.2. Alteraciones moleculares del Cáncer de Pulmón

Para que se desarrolle el cáncer de pulmón se requiere de una serie de alteraciones moleculares que dan lugar al crecimiento celular. Las múltiples alteraciones genéticas conducirán a una ganancia de función o a una inactivación de la proteína codificada, los oncogenes y los genes supresores respectivamente. Los oncogenes generalmente se activan a través de

mutaciones puntuales, amplificación genética o translocaciones cromosómicas; mientras que los genes supresores se inactivan mediante alteraciones bialélicas, que son combinaciones puntuales, deleciones e hipermetilaciones del promotor. Los oncogenes y los genes supresores también se han definido, desde una perspectiva funcional, como la capacidad de un gen determinado para transformar una célula normal (un oncogén) o para inhibir el crecimiento de una célula tumoral (gen supresor) (76).

El conocimiento de las alteraciones moleculares nos ha permitido incorporar a la práctica clínica nuevas estrategias terapéuticas y por ello es importante continuar estudiando la naturaleza y frecuencia de estas alteraciones, así como evaluar si existe una asociación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad para determinar si tienen un valor práctico en el diagnóstico precoz, la monitorización de tratamientos o el desarrollo de nueva terapias.

Oncogenes

De los oncogenes descritos, los más comunes en el carcinoma de pulmón son KRAS y MYC. De la familia RAS, se asocian las mutaciones puntuales en el codón 12 del gen KRAS, y ocasionalmente las que afectan a los codones 13 y 61, con el desarrollo fundamentalmente de los CPNCP. Además, estas mutaciones se han relacionado con el hábito tabáquico. La activación de los genes de la familia MYC se relaciona con los CPCP, y en menor medida, con los CPNCP. El proceso de activación tiene lugar por mecanismos de amplificación génica o por alteraciones en la regulación transcripcional. Por otra parte, los de la familia ERBB, un grupo de receptores transmembrana tirosina quinasa, están relacionados con el inicio de la cascada de transducción de señales intracelulares, entre las que incluye la vía de las MAP quinasas. ERBB2 (HER2/neu) está sobreexpresado en aproximadamente el 30% de los CPNCP, sobretudo en los adenocarcinomas. Además, los niveles elevados de ERBB2 se correlacionan con resistencia a fármacos y con el potencial metastásico de estos tumores (74).

Genes supresores

Hasta la fecha, el gen supresor p53 puede considerarse el gen mutado con mayor frecuencia en el cáncer, siendo el cáncer de pulmón uno de los tumores con las tasas más altas de mutaciones de p53. En los carcinomas de pulmón

hay una mayor frecuencia de transversiones de G a T debido a la exposición a los carcinógenos del tabaco. Sin embargo, otras transversiones y transiciones, junto con pequeñas deleciones o inserciones, también se encuentran comúnmente en el carcinoma de pulmón (76). Su locus cromosómico (17p13) se ha encontrado delecionado frecuentemente. Algunos genes relacionados con p53, como p21 y MDM2 también han sido relacionados con el desarrollo del cáncer de pulmón (74).

Otra vía supresora que se ha encontrado en el carcinoma de pulmón es la de p16-ciclina D1-CDK4-RB, siendo fundamental en el ciclo celular. P16 pertenece a una familia de quinasas dependientes de ciclina que inhiben la actividad de los complejos CDK4/6 /ciclina D y CDK2 / ciclina E. La inhibición da como resultado el bloqueo de la fosforilación de la proteína RB1, lo que lleva a una supresión del crecimiento (76). La inactivación del gen RB1 constituye un evento bastante común en el carcinoma de pulmón. Las anomalías presentes en este gen son las deleciones homocigotas, las hipermetilaciones del promotor y las mutaciones puntuales, siendo detectadas en el 90% de los CPCP y el 15-30% de los CPNCP (74).

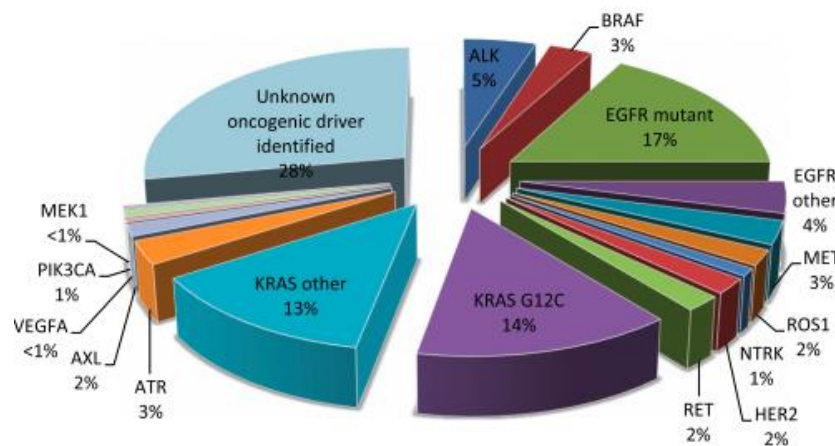
Finalmente, las pérdidas de heterocigosidad en el brazo corto del cromosoma 3, ocurren con mayor frecuencia en carcinomas de pulmón, tanto CPCP como CPNCP. El cromosoma 3p contiene varias regiones distintas de deleciones (3p25-26, 3p21-22 y 3p14) (76). Otros genes supresores tumorales implicados son el PTEN/MMAC1, pero hay pocos datos en el carcinoma de pulmón.

3.3. Caracterización Molecular del Carcinoma de Pulmón

Los avances en una mejor comprensión de las vías moleculares involucradas en el desarrollo del CPNCP ha llevado al estudio de tratamientos dirigidos para vías moleculares específicas consiguiendo prolongar la vida de los pacientes, y reducir la toxicidad respecto a la quimioterapia convencional. Los biomarcadores más útiles para predecir la eficacia de la terapia dirigida en el CPNCP avanzado, son las alteraciones del genoma somático conocidas como “mutaciones driver o impulsoras”. Estas mutaciones aparecen en células cancerosas dentro de genes que codifican proteínas para el crecimiento celular. Se han identificado otras alteraciones moleculares recurrentes en el CPNCP que son menos esenciales para mantener el fenotipo oncogénico y se les denomina “mutaciones pasajeras”.

Es poco probable que un cáncer tenga más de una mutación impulsora (77). En los pacientes con CPNCP estadio IV, se realiza un estudio molecular del tumor para detectar la presencia de mutaciones driver (78). Las guías del College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer y Association of Molecular Pathologists, recomiendan el análisis en tejido del tumor primario o de una metástasis para detectar EGFR, ALK y ROS1 en todos los pacientes cuyo tumor contiene algún componente de histología de adenocarcinoma o que tienen una historia personal de hábito tabáquico leve o nula (79). La frecuencia de las diferentes mutaciones en el adenocarcinoma de pulmón hasta el momento conocidas se recogen en la figura 2.

Figura 2. Frecuencia de las mutaciones en el adenocarcinoma de pulmón.



Chen R, Manochakian R, James L, Azzouqa AG, Shi H, Zhang Y, et al. Emerging therapeutic agents for advanced non-small cell lung cancer. J Hematol Oncol. 2020;13(1). (80)

Las técnicas para la detección de mutaciones driver y otras anomalías en los pacientes con CPNCP evolucionan continuamente, y no existe una plataforma estándar única de forma generalizada. Las características que debe tener la plataforma para que sea clínicamente útil son el tiempo rápido de respuesta (igual o menor a dos semanas), la rentabilidad, la capacidad para realizarse en muestras clínicamente disponibles y la semi-automatización, lo que elimina la dependencia de un solo técnico. Las técnicas utilizadas habitualmente en la práctica clínica son la secuenciación de ADN, prueba de ADN específica de

alelos, “Next Generation Sequencing o técnica de secuenciación masiva” (NGS), hibridación fluorescente in situ (FISH) e inmunohistoquímica (IHC), descritas en la tabla 4.

Tabla 4. Mutaciones y técnicas recomendadas en la práctica clínica (81).

	Secue nciación PCR en tejido	Secue nciación PCR por alelos	FISH en tejido	IHC en tejido	NGS en tejido	PCR ctADN	NGS ctADN	ARN en tejido
EGFR (+ T790 M)	+	++	0	0	++	+	+	+
Mutaci ón HER2	+	++	0	0	++	+	+	+
Mutaci ón MET exón 14	0	++	0	0	++	+	+	++
Mutaci ón BRAF	+	++	0	0	++	+	+	+
Mutaci ón KRAS	+	++	0	0	++	+	+	+
Reord enami ento ALK	0	0	++	++	+	+	+	++
Reord enami ento ROS1	0	0	++	0	+	0	+	++
Amplif icación n MET	0	0	++	0	+	0	+	+
Reord enami ento RET	0	0	++	0	+	+	+	++
Expre sión PDL1	0	0	0	++	0	0	0	0

Fusión NTRK	0	0	++	+	+	0	+	++
----------------	---	---	----	---	---	---	---	----

++: Alta sensibilidad; +: menor sensibilidad (mayor probabilidad de falso negativo); 0: no es útil.

El estudio molecular se ha realizado tradicionalmente en tejido tumoral, pero en los últimos años, el análisis en sangre periférica denominado biopsia líquida, está ganando importancia ya que es posible realizar la determinación de manera menos invasiva y costosa, siendo útil, sobretodo, en los casos que no disponemos de suficiente muestra tumoral. Además, permite monitorizar las características moleculares durante el curso del tratamiento, o ayudar a predecir la recaída después de un tratamiento adyuvante.

La mutación EGFR se observa aproximadamente en el 15% de los CPNCP tipo adenocarcinoma y ocurren con mayor frecuencia en pacientes no fumadores (82). En las poblaciones asiáticas, la incidencia de mutaciones de EGFR es mayor, hasta un 62% (83). Esta mutación es posible detectarla en tejido tumoral o en biopsia líquida, siendo cualquiera de los resultados aceptable para la decisión clínica y terapéutica (84). En el CPNCP avanzado, la presencia de una mutación EGFR confiere un pronóstico más favorable y predice la sensibilidad a los ITK, por tanto, la terapia dirigida debe usarse antes que la quimioterapia e inmunoterapia en estos casos. En los pacientes tratados que progresan a un EGFR ITK de primera o segunda generación, está indicado repetir la biopsia tumoral o líquida para identificar los mecanismos de resistencia adquirida. Sin embargo, la indicación de Osimertinib en primera línea de tratamiento, puede prevenir en gran medida el desarrollo de resistencia mediante la mutación T790M (59).

El reordenamiento de ALK está presente en aproximadamente el 4% de los adenocarcinoma de pulmón y ocurren con mayor frecuencia en pacientes más jóvenes no fumadores. Esta mutación se puede identificar mediante FISH, IHC o NGS. En el CPNCP en estadio avanzado, la presencia de un reordenamiento de ALK predice la sensibilidad al tratamiento con inhibidores de ALK como Crizotinib, Ceritinib, Alectinib, etc. El tratamiento con estos agentes prolonga significativamente la SLP (66).

Otra de las alteraciones moleculares que se testan al diagnóstico del CPNCP avanzado es el reordenamiento de ROS1, que actúa como oncogen conductor en el 1-2% de los adenocarcinoma mediante una translocación genética entre ROS1 y otros genes, el más común de los cuales es el CD74 (85). Las características clínicas coinciden con la mutación de EGFR y ALK, siendo pacientes jóvenes y nunca fumadores. Las translocaciones de ROS1 se identifican mediante FISH o mediante algunos paneles NGS. ROS1 es muy sensible al inhibidor de ROS1/MET, Crizotinib, así como al inhibidor de ROS1/receptor quinasa de tropomiosina (TRK), Entrectinib, aunque parece que este último presenta mayor beneficio sobre el sistema nervioso central debido a su actividad a nivel intracraneal (69).

MET es un receptor tirosina quinasa para el factor de crecimiento de hepatocitos. Sus anomalías incluyen las mutaciones que omiten el exón 14 de MET, en el 3% de los adenocarcinoma de pulmón y hasta el 20% de los CPNCP con histología sarcomatoide; y la amplificación del gen MET, en el 2-4% de los CPNCP sin tratamiento previo (86) o en el 5-20% de los tumores con mutación de EGFR que han adquirido resistencia a los inhibidores de EGFR (87). Las mutaciones que omiten el exón 14 se encuentran con mayor frecuencia por NGS, mientras que la amplificación de MET puede detectarse mediante FISH o algunos paneles de NGS.

Los reordenamientos recurrentes entre RET y otras parejas de fusión (CCDC6, KIF5B, NCOA4) se han identificado en el 1-2% de los adenocarcinoma de pulmón y ocurren con mayor frecuencia en pacientes jóvenes y nunca fumadores. Estos reordenamientos se pueden detectar mediante FISH o NGS (88,89). Los inhibidores de RET, Selpercatinib y Pralsetinib, están aprobados por la FDA para pacientes con CPNCP avanzado con fusión de RET (71).

Por otra parte, BRAF es un medidor de señalización que activa la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). Se ha propuesto un esquema de clasificación, de clase I a III, dependiendo de su impacto funcional en la vía MAPK. Las mutaciones V600 que producen una quinasa RAF constitutivamente activa, se clasifican como clase I, y las mutaciones no V600 se clasifican como clase II o III dependiendo de si producen formas activas o inactivas de la quinasa RAF respectivamente (90). Se han observado mutaciones activadoras de BRAF en 1-3% de los CPNCP y generalmente se asocian a antecedentes de

tabaquismo. Estas mutaciones pueden ocurrir en la posición V600 del exón 15, como en el melanoma, o fuera de este dominio, y se detectan habitualmente mediante PCR o NGS (91). Los pacientes con mutaciones BRAF V600 parecen tener mejor pronóstico que aquellos con otras mutaciones de BRAF, y en general, el CPNCP con mutación BRAF parece responder mejor a la inmunoterapia, tanto V600 como no (92). Esto se observó en una serie de 63 pacientes diagnosticados entre 2009 y 2013, donde se analizaron las características clínicas y el pronóstico del adenocarcinoma de pulmón con mutación BRAF. El 57% de los pacientes tenía una mutación V600E y el 92% eran fumadores, aunque parecía tener mayor relación con el tabaco la mutación no V600. Entre los 32 pacientes con enfermedad precoz, el 19% desarrollaron segundos tumores de pulmón primarios sincrónicos o metacrónicos, y todos contenían mutaciones en KRAS. El pronóstico fue significativamente mejor en aquellos en estadio avanzado con mutación V600 en comparación con mutaciones no V600 (tasa de supervivencia a 3 años, 24% vs 0%). Seis de los 10 pacientes con enfermedad avanzada y la mutación V600E, tuvieron una respuesta parcial al tratamiento con un inhibidor de BRAF, tres presentaron enfermedad estable, y la duración media de la respuesta fue de más de seis meses. En este estudio, ningún paciente fue tratado con terapia de combinación BRAF/MEK (92).

Actualmente, el tratamiento de primera línea para los pacientes con CPNCP avanzado con mutaciones BRAF V600E es la combinación con Dabrafenib y Trametinib (93). Por lo general, no se recomienda el uso de inhibidores de BRAF o MEK para el CPNCP con mutación BRAF no V600E.

Otras mutaciones son menos frecuentes como la fusión de NTRK, la mutación HER2 o la mutación RAS. Los inhibidores que se dirigen a la mutación HER2 o RAS están en desarrollo, y no se recomiendan en la práctica clínica para CPNCP fuera de ensayo clínico. En la última década, se ha potenciado el estudio molecular del CPNCP, así como el desarrollo de dianas terapéuticas que aumenten la supervivencia respecto a los tratamientos de quimioterapia o inmunoterapia. Pero en este sentido, hay que continuar estudiando estas y otras vías moleculares para su mayor conocimiento e introducirlas en la práctica clínica habitual.

4. INMUNOTERAPIA

A finales del siglo XIX, la Inmunología y la Oncología empezaron a ser relacionadas desde que William Coley evidenciara que al inyectar bacterias muertas en un sarcoma, podía producirse una reducción del tumor (94). Desde entonces, los grandes avances por la comprensión entre la vigilancia inmunitaria y el desarrollo y crecimiento tumoral, han dado lugar a nuevos tratamientos contra el cáncer que han cambiado la forma de entender la Oncología.

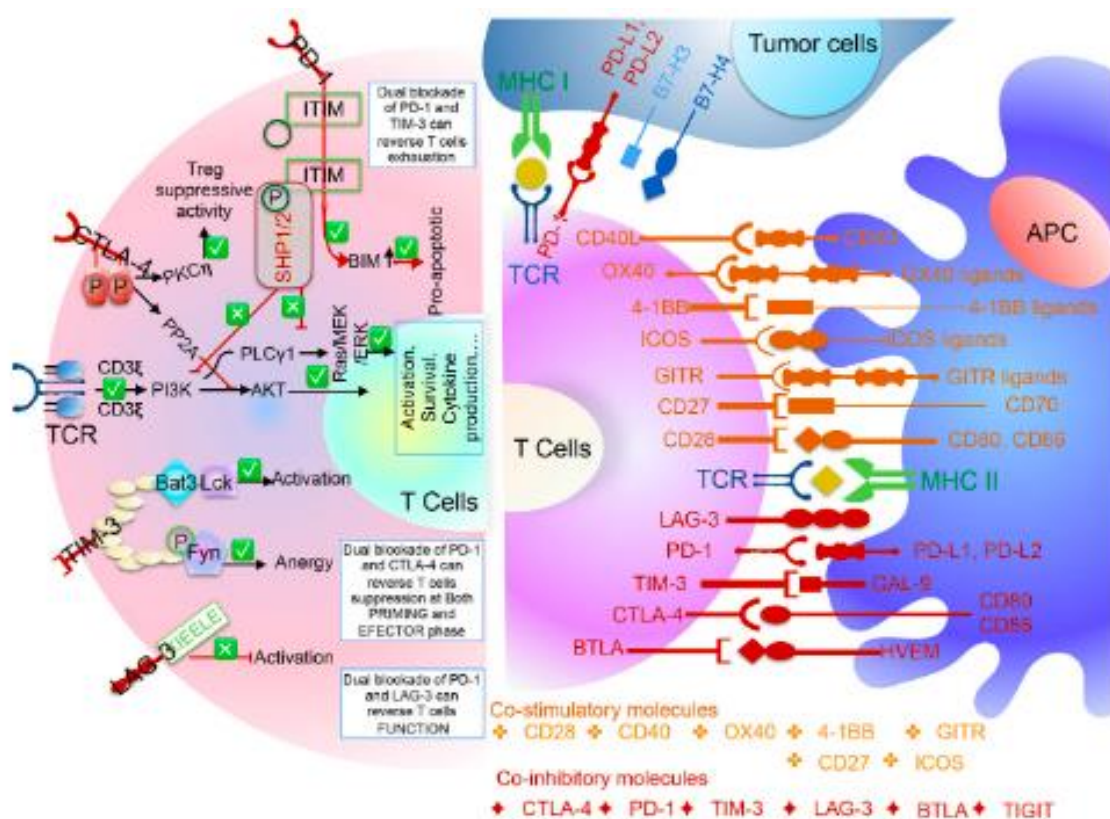
En el reconocimiento y el rechazo tumoral están implicadas diferentes fases y tipos de células, siendo necesario una interacción compleja y de rápida evolución entre varios tipos de células inmunitarias, tanto del sistema inmunitario adaptativo como innato. Los linfocitos citotóxicos (CD8+ y subclases Th1/Th2 de los CD4+), son los encargados de diferenciar entre antígenos propios y no propios mediante la sinapsis inmunitaria. Las células Natural Killer (NK), no precisan del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) para reconocer antígenos y realizar su actividad citotóxica (95). Por otro lado, el freno inmunitario lo realizan otro tipos de células como CD25+, CD4+, T reguladoras y células mieloides supresoras (MDSC), inhibiendo la actividad de los linfocitos T citotóxicos (96,97). Las células T CD4+ que secretan interleucina (IL)-17, también están implicadas en la inmunidad del cáncer (98). Otros tipos de células implicadas son los macrófagos, que se diferencian en al menos dos fenotipos: los macrófagos M1, liberan interferón (IFN) gamma y son los responsables de la fagocitosis, y los macrófagos M2, que liberan citocinas como IL-4, IL-10 o factor de crecimiento (TFG) beta, que se encargan de amortiguar la respuesta inflamatoria y potenciar la tolerancia (99).

La sinapsis inmunológica es un fenómeno ampliamente estudiado. Es la capacidad de los linfocitos T de distinguir los antígenos propios de los no propios que se presentan en las células presentadoras de antígenos (APC), como las células dendríticas. Este proceso está regulado por la presencia de receptores estimulantes e inhibidores cuya expresión depende de las citocinas. La señal co-estimuladora más importante en las células T es CD28, que se une a B7-1 y B7-2 (CD80/86) en la APC. Este proceso co-estimulador está regulado por moléculas agonistas como GITR, OX40 o ICOS, y por señales inhibidoras tanto en las células APC como en las células T, denominado “punto de control inmunológico”. Este punto de control incluye la proteína 4 asociada a linfocitos

T citotóxicos (CTLA-4), PD-1, TIM3 y LAG3. En un proceso crónico, como una infección viral o un proceso tumoral maligno, en el que se produce un reconocimiento crónico de antígenos, se puede motivar la inhibición por retroalimentación de la función de las células T efectoras, lo que da como resultado un fenotipo de agotamiento (100). En la figura 3 se muestran los múltiples puntos de control de la inmunidad que conocemos hasta el momento.

Figura 3. Mecanismos de acción de múltiples puntos de control en inmunidad antitumoral.

En la figura se representan los receptores co-estimuladores y co-inhibidores de la sinapsis inmunitaria, que se encargan de amplificar o amortiguar la respuesta inmunitaria inicial. La mayoría de estos receptores requieren que el receptor de linfocitos T (TCR) reconozca específicamente los antígenos presentados por el CPH en las APC, para entregar sus señales co-estimuladores o co-inhibidoras.



Estas interacciones pueden tener lugar en sitios linfoides secundarios, donde las células T se encuentran con el antígeno por primera vez, o en la periferia, donde las células efectoras pueden activarse o suprimirse. Algunos receptores tienen

motivos específicos como UVKM para CTLA-4 y KIEELE para LAG3. También se puede observar los mecanismos moleculares de la señalización del receptor inhibidor e inducción de genes inhibidores. Las terapias de punto de control con anticuerpos contra los receptores inhibidores de células T (como PD-L1 o CTLA-4) producen respuestas duraderas en pacientes con neoplasias malignas (101).

La teoría predominante de la influencia del sistema inmunitario en el desarrollo neoplásico se denomina “inmunoedición del cáncer” y este proceso se realiza en varias fases (102). Una de ellas es la fase de eliminación, que consiste en respuestas innatas y adaptativas a antígenos específicos asociados a tumores, y se caracteriza por la función efectora de las células T, B y NK, que está mediada por citocinas como IFN alfa, gamma e IL-12. La fase de equilibrio, busca la armonía entre la destrucción inmunomediada por el sistema inmunitario adaptativo y la persistencia de clones malignos. Y por último, el escape inmunológico, que describe la fase en la que los clones malignos han adquirido la capacidad de evadir el sistema inmunológico adaptativo (103).

Es conocido que las células tumorales presentan varios mecanismos para evadir la respuesta inmune o vigilancia inmunitaria. Uno de ellos es la pérdida o alteración de antígenos específicos o maquinaria antigénica, haciendo que los tumores pierdan la expresión principal del CPH de clase 1 o la maquinaria intracelular, necesaria para transportar los antígenos tumorales a la superficie del tumor para el reconocimiento de las células T (104). Otro mecanismo es promover un microambiente de tolerancia inmunitaria mediante la manipulación de citocinas, con el aumento de secreción de IL-6, IL-10 y TGF-beta o consumo de IL-2, fomentando la inhibición de la función de las células T citotóxicas (105). Además, los tumores pueden regular positivamente la expresión de moléculas de puntos de control inmunes como PD-1 y PDL1, que promueven el agotamiento de las células T periféricas (106). Con el conocimiento de estas vías y mecanismos, se están estudiando varias estrategias terapéuticas para que el sistema inmunológico pueda llegar a controlar la enfermedad tumoral. Para ello se utilizan las citocinas, las células T (inhibidores de puntos de control, agonismo de receptores co-estimuladores), la manipulación de las células T, virus oncolíticos y terapias dirigidas a otros tipos de células y vacunas. Además,

también se utilizan varias estrategias combinadas entre sí para mejorar aún más la tasa de éxito de la inmunoterapia. Se están desarrollando estrategias de combinación con inhibidores de PDL1 y CTLA-4 o con antagonistas de otros receptores inhibidores de las células T, como TIM3, LAG3, TIGIT y BTLA. También se estudia bloquear los puntos de control inmunitarios junto con la estimulación del reconocimiento del antígeno tumoral mediante la utilización de vacunas (101).

La teoría de que el sistema inmunológico podría eliminar células tumorales ha ido ganando fuerza a lo largo de los años. En los inicios, el uso de IL-2 a altas dosis, logró respuestas objetivas duraderas en una minoría de pacientes con melanoma y carcinoma de células renales (107), aunque su uso se ha ido reemplazando por los inhibidores de puntos de control inmunitario (ICI).

4.1. Inhibidores de puntos de control inmunitario

PD-1 y PD-L1, es una proteína transmembrana expresada en las células T, células B y células NK. Su función es de molécula inhibidora que se une al ligando PD-1, también conocido como B7-H1, o al PD-L2 o B7-H2. El ligando se expresa en la superficie de múltiples tipos de tejidos, así como también en muchas células tumorales; en cuanto a PD-L2, está más restringido a células hematopoyéticas. La interacción de PD-1 y PD-L1/2, inhibe la apoptosis de la célula tumoral y promueve el agotamiento de las células T periféricas. Este proceso se regula positivamente con citocinas pro-ejecutoras como IL-12 e IFN gamma. También se ha visto que PD-L1 inhibe CD80, lo que sugiere interacción entre la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), PD-1 y otras vías (108). En la práctica clínica, diferentes anticuerpos que inhiben PD-1 (Nivolumab y Pembrolizumab) y PD-L1 (Atezolizumab, Avelumab y Durvalumab), han sido aprobados en base al beneficio demostrado en ensayos fases II y III para diferentes neoplasias e indicaciones.

Otro punto de control inmunológico que utilizamos en la práctica clínica como estrategia terapéutica es CTLA-4, que actúa como freno fisiológico en la activación de las células T CD4+ y CD8+ que se desencadena por las APC (109). CTLA-4 se introdujo en la vigilancia inmunitaria cuando su inhibición, en modelos

de sarcoma y adenocarcinoma de colon de ratón, producía una reducción del tamaño tumoral (110). El primer inhibidor de puntos de control aprobado fue el anticuerpo anti-CTLA-4, Ipilimumab, según los datos del estudio que demostraron un aumento de supervivencia en pacientes con melanoma metastásico (111).

La combinación de los dos inhibidores, CTLA-4 y PD-1/PD-L1, parece ser más eficaz en algunos tumores que cualquiera de los dos por separado, ya que CTLA-4 actúa en una etapa temprana de las células T en respuestas inmunitarias tumorales, mientras que PD-1/PD-L1 lo hace en las últimas etapas. En el estudio fase 3 CheckMate 9LA, se incluyeron pacientes con CPNCP estadio IV sin mutaciones EGFR o ALK y sin tratamiento sistémico previo. Los pacientes se randomizaron a recibir Nivolumab, Ipilimumab y quimioterapia basada en platino versus quimioterapia sola, con la opción de continuar con tratamiento de mantenimiento en algunos pacientes según la histología. Con un seguimiento de 12,7 meses, la combinación presentó un beneficio en SG de 15,6 meses frente a 10,9 meses (HR 0,66, IC del 95%: 0,55-0,80). El beneficio en supervivencia global se observó en todas las histologías de CPNCP y fue independiente de la expresión de PD-L1 (112). Otro estudio fase 3 de combinación es el CheckMate 227, en el que se randomizaban pacientes con CPNCP avanzado con expresión de PD-L1 >1%, que no habían sido tratados, a recibir Nivolumab más Ipilimumab, Nivolumab solo o quimioterapia. La SG en el grupo de combinación con Nivolumab-Ipilimumab fue de 17,1 meses y de 14,9 meses con quimioterapia. Este beneficio se observó también en pacientes con un nivel de expresión de PD-L1 menor al 1% (57).

Una mayor comprensión de los mecanismos inmunológicos está llevando a la identificación de varios objetivos potenciales para la inhibición de los puntos de control, pero muchos de ellos todavía se encuentran en una fase inicial de desarrollo, como son TIM3, LAG3, ICOS, CD40, OX40, etc (113–116).

4.2. Virus oncolíticos

Los virus oncolíticos pueden diseñarse para infectar eficazmente las células cancerosas y así promover la presentación de antígenos tumorales, creando un

microambiente tumoral menos tolerante al sistema inmunológico (117). El agente más avanzado en el desarrollo clínico es la Talimogene Laherparepvec (T-VEC), que utiliza un virus del Herpes simple 1 atenuado (118). La respuesta a la inyección de virus oncolíticos puede ser mayor al utilizarlo junto con inhibidores de puntos de control, ya que aumenta la infiltración de células T CD8+ y la señalización de INF gamma (119). Actualmente, la única terapia aprobada basada en vacunas para el cáncer avanzado es Sipuleucel-T, que es una preparación de células dendríticas autólogas diseñada para atacar la fosfatasa de ácido prostático, y demostró un beneficio en supervivencia en hombres con adenocarcinoma de próstata resistente a la castración (120).

En los últimos años, el ritmo del descubrimiento en el campo de la Inmunología y el cáncer se ha acelerado, convirtiendo el tratamiento de inmunoterapia en la terapia estándar de muchas neoplasias, lo que resulta en un aumento de supervivencia y calidad de vida de los pacientes. Existen múltiples ensayos en curso que exploran una amplia variedad de combinaciones de inmunoterapia, siendo previsible que se amplíen estos resultados en un futuro próximo.

5. BIOMARCADORES DE INMUNOTERAPIA

La llegada de los nuevos tratamientos ha aumentado la esperanza de vida de los pacientes con cáncer de pulmón avanzado, y ha abierto un nuevo debate acerca del tratamiento óptimo y la mejor secuenciación del mismo. Es esencial identificar factores predictivos o biomarcadores de respuesta para poder seleccionar los pacientes y también para el mejor diseño de ensayos clínicos.

5.1. Biomarcadores en tejido

El ligando 1 de muerte celular programada, también conocido como B7-H1 y CD274, es una proteína que en humanos está codificada por el gen CD274 y se une a su receptor PD-1. La interacción entre PD-1/PD-L1 inhibe la respuesta de las células T, induce la apoptosis de las células T específicas del tumor y promueve la diferenciación de las células T CD4 en células T reguladoras, por ello se cree que los tumores con mayor expresión del eje PD-1/PD-L1 tienen un peor pronóstico (121). PD-L1 se expresa no solo en las células T, sino también en la superficie de las células tumorales, lo que permite la supresión de la

actividad de las células T citotóxicas antitumorales (122). Existe evidencia de la expresión de PD-L1 en la superficie de las células tumorales y de las células inmunes que infiltran el tumor en diferentes neoplasias sólidas como el melanoma, carcinomas de cabeza y cuello, tiroides, timo, esófago, pulmón, mama, etc. La vía de PD-1/PD-L1 es un mecanismo importante de inmunidad dentro del microambiente tumoral. Los anticuerpos monoclonales dirigidos a PD-1/PD-L1 pueden bloquear esta vía y así mejorar la función de las células T. Existe una clara evidencia de la relación entre la respuesta a los anticuerpos monoclonales anti-PD-1/PD-L1 con la expresión de la proteína PD-L1 en las células tumorales y en las células inflamatorias peritumorales. Sin embargo, este biomarcador presenta importantes limitaciones. Por un lado, no hay consenso en el punto de corte para definir el grado de expresión válido. En un estudio inicial, Dong y colaboradores, definieron las categorías de tinción de PD-L1 como: negativo, con tinción en menos del 10% de las células tumorales; positivo débil, con tinción del 10% al 40%; moderadamente positivo, con tinción del 40% al 80%; y fuertemente positivo, con tinción en más del 80% del tejido canceroso (123). En el informe inicial de Topalian y colaboradores, en el que describieron una mayor frecuencia de respuesta a terapias anti-PD-1 en pacientes con tumores con mayor expresión de PD-L1 respecto a los de nula expresión, utilizaron un umbral del 5% para definir la positividad (124), siendo este punto de corte el elegido para muchos estudios posteriores. La razón por la que se seleccionó el 5% de expresión como punto de corte para la positividad, no se describió completamente en estos informes, siendo probable que se seleccionara para eliminar los posibles artefactos (125). Actualmente, el punto de corte más utilizado es el de 1% de la expresión en las células. Además, PD-L1 puede teñir de forma heterogénea en una muestra, por lo que podemos catalogarla de negativa pudiendo tener una mayor expresión de PD-L1 en una región diferente. Para evitar los falsos negativos, se podrían realizar secciones de tinción de diferentes bloques tumorales, pero no parece una solución práctica, ya que a menudo solo se crea un bloque tumoral. Por otro lado, la dificultad para la obtención de muestra con la biopsia convencional limita la interpretación de la expresión tumoral de PD-L1 (126,127). La IHC de PD-L1 se estableció en pacientes con CPNCP en base a los resultados del estudio KEYNOTE 024, que mostró mayor respuesta a Pembrolizumab en comparación con el tratamiento

convencional en pacientes con PD-L1 > 50% de expresión en tejido (51). Pero por otro lado, Nivolumab en primera línea no prolongó la SLP en comparación con la quimioterapia en el CPNCP avanzado en pacientes con una expresión del 5% de PD-L1 en el estudio CheckMate 026 (128). Estos resultados indican que PD-L1 como único biomarcador es insuficiente para evaluar la eficacia de los tratamientos anti-PD-1/PD-L1.

La quimioterapia o la terapia dirigida puede inducir la expresión de PD-L1. Por ello, es posible que una muestra obtenida al diagnóstico sin haber recibido tratamiento previo, no represente la expresión de PD-L1 del tumor en el momento en el que se introduce la inmunoterapia. Este efecto no es conocido en su totalidad ni se sabe el impacto del tratamiento de primera línea con quimioterapia convencional sobre la expresión de PD-L1, ya que habitualmente no se suele rebiopsiar tras el tratamiento de primera línea (125).

Por otro lado, es conocido que las células tienen mecanismos para reparar el daño en el ADN que resulta principalmente de inserciones o deleciones de un solo par de bases, cuando se produce un deslizamiento durante la replicación del ADN por las ADN polimerasas. Este tipo de error tiende a ocurrir en secuencias de ADN cortas y repetitivas, denominadas microsatélites. Cuando existe una alta tasa de variación en la longitud de los microsatélites en todo el genoma, se dice que un tumor tiene altos niveles de inestabilidad de microsatélites (MSI-H). Casi todos los tumores con inestabilidad de microsatélites demuestran una alta carga de mutaciones tumorales (TMB), sin embargo, no todos los casos con alta TMB son MSI-H (129). Por todo ello, la inestabilidad de microsatélites define un subconjunto biológico único de cánceres que se caracterizan por una alta carga mutacional tumoral, la inmunogenicidad y la alta respuesta a ICI. Un estudio de Pembrolizumab en cáncer colorrectal con MSI fue el que demostró que los cánceres con MSI podrían ser particularmente susceptibles al bloqueo de la interacción de PD-1/PD-L1 (130). TMB tiene un interés creciente como potencial biomarcador del beneficio de ICI. En varios estudios retrospectivos realizados en diferentes tipos de cáncer, la hipótesis de correlación entre alta TMB y una mayor respuesta a ICI parece estar validada (131–133), sin embargo, esta correlación es imperfecta entre los diferentes tipos de tumores y dentro de ellos. Un problema importante es que la determinación y

el umbral de TMB se ha desarrollado de forma independiente en cada tipo de tumor (134), por lo que no existe una técnica validada para todos ellos. Rizvi y colaboradores, observaron asociación entre alta TMB y el beneficio clínico duradero del tratamiento con inmunoterapia en pacientes con CPNCP (135). Esto puede explicarse por la creación de neoantígenos inducidos por mutaciones adquiridas, que aumentan la inmunogenicidad tumoral y por tanto la respuesta a la inmunoterapia (136). Hasta el momento, no se había observado asociación entre TMB y alta expresión de PD-L1, pero sí se había encontrado baja TMB en tumores con mutaciones EGFR, y eso podría explicar que los tumores con esta mutación tuvieran una menor tasa de respuesta a inmunoterapia que otros tipos de tumores. Por el contrario, KRAS y BRAF, se asocian a TMB elevada, obteniendo una mayor respuesta a la inmunoterapia (137). El estudio CheckMate 227, que comparaba Nivolumab e Ipilimumab versus Nivolumab en monoterapia versus quimioterapia estándar de primera línea en CPNCP avanzado, demostró que alta TMB (>10 mutaciones/megabase), obtenía un mayor beneficio en SG. Sin embargo, se observó mayor respuesta en pacientes con alta TMB y alta expresión de PD-L1 (> 50%), que en pacientes con un solo factor, lo que indicó que TMB sería un buen biomarcador independiente cuando se acompañe del análisis de expresión de PD-L1 (138). A pesar de los buenos resultados, existen diversas razones por las que TMB aún no está lista para usarse en la práctica clínica, como que se requieren largos paneles de secuenciación y una gran cantidad de tejido tumoral. Es necesario la estandarización de pruebas para una detección homogénea y comparativa para su análisis. Existen ensayos prospectivos para dilucidar el beneficio de TMB como predictor de respuesta a ICI.

El inmunoscore es un método que se utiliza para la estimación pronóstica de los pacientes con cáncer, basándose en las células inmunes tumorales y peritumorales.

La identificación de un inmunoscore combinando diferentes infiltrados de células inmunes, parece ser muy prometedor en varios tipos de tumores y su inclusión en el sistema de estadificación TNM tradicional se ha propuesto en el CPNCP (139). En un estudio retrospectivo, en pacientes con CPNCP estadio precoz, la estratificación pronóstica mejoró con el conjunto de evaluación de diferentes

infiltrados peritumorales dentro de una combinación de inmunoscore. Cuando se integró el RNL a la puntuación inmunológica, la estratificación del pronóstico mejoró todavía más, lo que sugiere la importancia de integrar biomarcadores inflamatorios, tanto en tejido tumoral como en sangre, en la predicción de supervivencia (140). El inmunoscore puede ser un prometedor biomarcador, aunque se necesitan estudios de validación sobre series prospectivas.

5.2. Biomarcadores solubles

Existe un interés creciente en la identificación de biomarcadores sanguíneos que puedan predecir el éxito de la inmunoterapia y resuelvan las limitaciones de las biopsias de tejido. Entre los biomarcadores séricos más prometedores en investigación, se encuentra el factor soluble de PDL1 (sPDL1) (141), y otros como las CTCs, ctADN o los niveles de IFN gamma y TGF beta, representados en la figura 4.

Es conocido que PD-L1 se expresa en forma transmembrana y en forma soluble, y su expresión en células tumorales suscita un gran interés como biomarcador. Se ha observado un aumento de sPDL1 en plasma en pacientes con diferentes tipos de tumores, incluidos el cáncer de pulmón, linfoma, hepatocarcinoma o cáncer gástrico. Se ha realizado un gran esfuerzo para comprender el papel funcional de sPDL1 en el cáncer, y parece indicar que representa la magnitud de la respuesta intrínseca de las células T en el tejido tumoral. Un nivel alto de sPDL1 se ha correlacionado con un peor pronóstico, como indica uno de estos estudios de 96 pacientes con CPNCP avanzado, donde un nivel alto de sPDL1 ($> 7,32$ ng/ml), se asoció de forma significativa a un mal pronóstico (HR 1,99, $p = 0,041$) (141). Al mismo tiempo, se describió que el nivel de sPDL1, no estaba relacionado con la histología del tumor, mutaciones o estadio clínico (142). A pesar de esto, la correlación entre la expresión de sPDL1 y el valor pronóstico sigue siendo incierta. Se necesitan más estudios prospectivos para correlacionar de forma fiable y reproducible la expresión de PDL1 en tejido tumoral y en plasma.

Las células inmunes son el efector del tratamiento con inmunoterapia, por lo que en consecuencia, el número y análisis detallado de varios subconjuntos de células del sistema inmunológico en sangre periférica podría resultar ventajoso.

Hay diversas publicaciones que investigan la asociación entre el ratio neutrófilo/linfocito (RNL) y el beneficio clínico en SG, SLP y tasa de respuesta global, en pacientes con CPNCP avanzada en tratamiento con inmunoterapia (143–146). Los datos sugieren una SLP, SG y tasa de respuesta significativamente más baja a mayor RNL y recuento de plaquetas, tanto al inicio del tratamiento como en las siguientes 4-6 semanas. Existen limitaciones importantes para la interpretación de estos resultados. Por un lado, el carácter retrospectivo y el pequeño tamaño muestral de cada uno de los estudios. Además, el punto de corte para establecer el RNL y la tasa de plaquetas fue variable, e impide la comparación entre los resultados obtenidos. Los linfocitos tienen un papel muy importante en la respuesta antitumoral inducida por inmunoterapia, siendo la determinación de su estado basal una herramienta útil para evaluar la inmunocompetencia y para cuantificar clones tumorales específicos preexistentes. El alto número de linfocitos y eosinófilos se ha asociado con un mayor beneficio en SG en pacientes con melanoma avanzado tratados con inmunoterapia (142). Se cree que las células T en sangre periférica también son el reflejo del microambiente tumoral, así como los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL) (142). Se observó que los TCR fueron muy similares entre las células T PD-L1+ y CD8+ y los TIL, por lo que la expresión de PD-L1 en las células T periféricas puede ser indicador del estado inmunológico del tejido tumoral (142). Después del tratamiento con anti-PD-1, los linfocitos T Ki67+ PD1+ y CD8+, aumentaron en sangre periférica en pacientes con CPNCP, especialmente en los casos que respondieron (147).

Otro biomarcador sanguíneo en continua investigación son las CTCs, que son células que se han desprendido del tumor primario y circulan por el torrente circulatorio, por lo que su información aporta una representación global de la diversidad tumoral. Punnoose y colaboradores, detectaron mutaciones de EGFR en CTCs y ctADN, que era altamente concordante con el estado mutacional del tejido tumoral (148). Por otro lado, Nicolas Guibert et al, estudiaron si las CTCs podrían representar la expresión de PD-L1. Objetivaron que la presencia de PD-L1+ en las CTCs no tuvo impacto estadísticamente significativo en SLP ni en SG en pacientes con CPNCP avanzado. Sin embargo, los pacientes con PD-L1+ en el valor basal de CTCs (> 1%), no respondieron al tratamiento en mayor

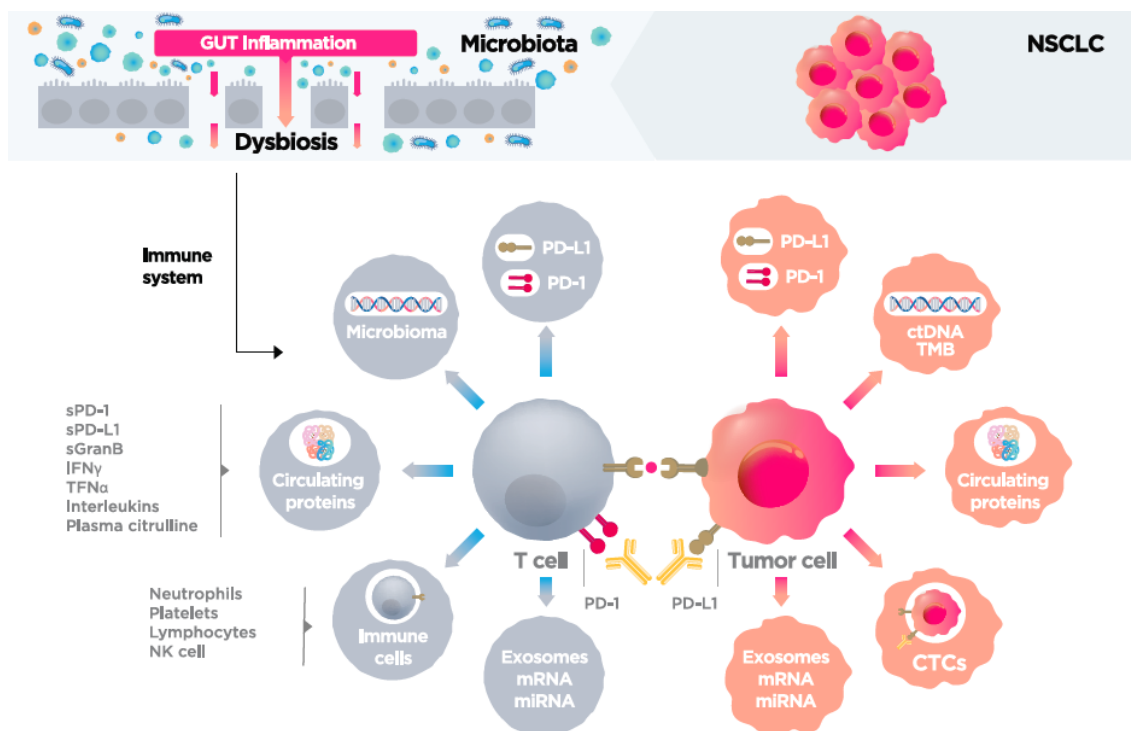
frecuencia, en comparación con los pacientes que tenían PD-L1 negativo en CTCs. El análisis de PD-L1 se pudo realizar en el 93% de los casos en CTCs, frente al 72% en tejido, debido a las limitaciones de la biopsia convencional (149). Además, Nicolazzo y colaboradores, monitorizaron las CTCs durante el tratamiento con Nivolumab en un número muy reducido de pacientes con CPNCP avanzado. Estudiaron la relación entre la expresión de PD-L1 en las CTCs y la respuesta a inmunoterapia. La presencia de PD-L1+ CTCs tras 6 meses de tratamiento en 5 de los 10 pacientes, se asoció a progresión de enfermedad. Según estos resultados, las CTCs PD-L1+, podrían indicar resistencia a la inmunoterapia (150). Actualmente, la expresión de PD-L1 en CTCs no tiene impacto pronóstico, por lo que son necesarios más estudios. En conclusión, la presencia de CTCs se asocia a un peor pronóstico y un mayor riesgo de recaída temprana de diferentes tipos de cáncer, y su estudio aporta una mejor descripción de la biología molecular, así como información sobre la diseminación tumoral.

La contribución del ctADN en el desarrollo de la NGS ha jugado un papel importante en el diagnóstico de varios tumores sólidos y su monitorización durante el tratamiento. La aplicación clínica del ctADN ha avanzado significativamente en el melanoma y en el CPNCP, ya que el estado mutacional como BRAF o EGFR afecta en la decisión terapéutica. El análisis del ctADN parece ser indicativo de respuesta a la inmunoterapia, ya que la eficacia del tratamiento depende de la carga mutacional tumoral (151). Lipson y colaboradores, estudiaron la correlación entre los niveles de ctADN y los síntomas clínicos de pacientes con melanoma tratados con inmunoterapia. Los autores detectaron mutaciones en cinco de los diez pacientes con melanoma, y encontraron que un aumento en el ctADN de la mutación se correlacionó con progresión tumoral. Las modificaciones en niveles del ctADN se describieron como un biomarcador predictivo de respuesta al tratamiento anti-PD-1 en pacientes con CPNCP avanzado (152).

El importante papel de TFG beta, IFN gamma y las interleucinas en el desarrollo de tumores ha sido descrito (153), sin embargo, hay poca información disponible como biomarcadores solubles inmunológicos. Efimia Boutsikou y colaboradores, analizaron los niveles de IFN gamma y algunas interleucinas en sangre periférica

al inicio y tras tres meses de tratamiento con anti-PD-1, objetivando una asociación entre sus niveles y el beneficio de respuesta y SG, no así con SLP. El nivel de citocinas aumentaba previo al inicio del tratamiento con anti-PD-1 y disminuía 3 meses más tarde (153). Por otra parte, Tran y colaboradores, objetivaron que altas concentraciones de IL-8 se relacionaban con una peor SLP en pacientes con cáncer renal tratados con ITK (154). Existen otros biomarcadores solubles en estudio como el microRNA, Granzima B, el microbioma o los exosomas (155–157). En conclusión, existe una alta probabilidad de que la inmunoterapia se convierta en la piedra angular del tratamiento en múltiples tipos de cáncer, de ahí la importancia del desarrollo de biomarcadores. Actualmente nos encontramos en una etapa muy temprana, con pocos ensayos clínicos, muchos de ellos retrospectivos y con grandes limitaciones. El futuro del descubrimiento de biomarcadores en inmunooncología es muy prometedor, ya que hasta ahora los estudios revelan que juegan un papel importante en la predicción de respuesta y toxicidad, pero se necesitan estudios más específicos y prospectivos para que puedan ser seguros y válidos en la práctica clínica.

Figura 4. Biomarcadores solubles relacionándose con las células tumorales (a la derecha) y con el sistema inmunitario (a la izquierda), en la respuesta al tratamiento de inmunoterapia.



II. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo de investigación es contribuir en ampliar el conocimiento sobre la expresión PD-L1 (marcador relacionado con la inmunogenicidad y la respuesta al tratamiento de inmunoterapia), tanto en tejido como en su forma soluble. Se estudiará la relación entre dichos biomarcadores con las características clínico-patológicas de los pacientes, y evaluaremos su utilidad como marcadores pronósticos y predictivos de respuesta a terapias ICI en CPNCP avanzado.

Objetivos primarios

1. Analizar los niveles séricos de expresión de PD-L1 (sPD-L1) en pacientes con CPNCP avanzado y evaluar su correlación con las características clínico-patológicas y moleculares de los pacientes.
2. Estudiar la correlación entre los niveles de sPD-L1 con la eficacia del tratamiento de inmunoterapia en términos de Supervivencia Global (SG).

Objetivos secundarios

1. Estudiar la correlación entre los niveles de sPD-L1 con la eficacia y pronóstico del tratamiento de inmunoterapia en términos de Supervivencia Libre de Progresión (SLP) y Tasa de Respuesta (TR).
2. Estudiar la correlación entre los niveles de PD-L1 medidos por expresión inmunohistoquímica en tejido tumoral con la SG, SLP y TR en pacientes con CPNCP avanzado tratados con inmunoterapia en segunda línea o sucesivas.
3. Correlación entre los niveles de sPD-L1 y expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en células tumorales.

III. METODOLOGÍA

Estudio retrospectivo y multicéntrico de pacientes diagnosticados de CPNCP avanzado y tratados con inmunoterapia de segunda línea con Nivolumab, Pembrolizumab o Atezolizumab entre octubre de 2017 y octubre de 2019, en dos hospitales de la Comunidad Valenciana: Hospital Arnau de Vilanova de Valencia y Hospital General Universitario de Valencia.

1. Población de estudio

Características de los Pacientes

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes que cumplían todos los siguientes criterios de inclusión:

- Confirmación histológica de Carcinoma de Pulmón No Célula Pequeña.
- Enfermedad avanzada (estadio IV) o recidivante.
- Haber sido tratados con quimioterapia de primera línea con los esquemas de dobletes basados en sal de platino.
- Disponibilidad de tejido tumoral archivado para estudio inmunohistoquímico procedente del tumor primario o de alguna localización metastásica.
- Disponibilidad de muestra sanguínea almacenada en la seroteca del Hospital Arnau de Vilanova o el Hospital General de Valencia para el análisis de sPD-L1.

Variables Clínicas

Para la evaluación, se revisaron las historias clínicas completas, registrando las medidas basales previas al inicio del tratamiento con inmunoterapia. El diagnóstico y la evaluación del tratamiento se realizó con TAC. Hemos recogido los siguientes datos de registro de los pacientes:

Variables clínicas demográficas basales

- Edad: se registró como variable continua para los datos descriptivos de la serie. Para su estudio como posible factor pronóstico, se dicotomizó en menores o mayores de 70 años (< 70 años, ≥ 70 años).
- Sexo (hombre/mujer).
- Performance Status (PS).
- Hábito tabáquico (fumador, exfumador o nunca fumador).

Variables relacionadas con el tumor

- Histología (adenocarcinoma, epidermoide o indeterminado).
- Localización de las metástasis.
- Número de órganos con afectación metastásica.
- Expresión inmunohistoquímica de PD-L1.
- Datos analíticos previos al inicio del tratamiento de inmunoterapia, incluyendo recuentos de células hematopoyéticas y niveles de lactato deshidrogenasa (LDH). Para el análisis se dicotomizaron los datos en dos grupos: elevados versus normales, considerando elevado cualquier nivel por encima de los rangos de normalidad. Rango de normalidad para LDH (<220U/L); rango de normalidad para anemia (hemoglobina $\geq 9\text{g/dL}$), para leucocitos ($\geq 12.000/\text{mL}$), para plaquetas ($\geq 250.000/\text{mL}$). En el RNL se consideró elevado (≥ 3).

Variables relacionadas con el tratamiento

- Régimen de quimioterapia empleado en primera línea de tratamiento (disponibilidad de diferentes combinaciones de dobletes de platino según histología).
- Régimen de inmunoterapia empleado en segunda línea de tratamiento (Nivolumab, Pembrolizumab, Atezolizumab).
- Número de ciclos administrados de inmunoterapia.
- Toxicidades relevantes en el tratamiento de inmunoterapia. La toxicidad del tratamiento se evaluó de acuerdo a los criterios de toxicidad del National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) versión 5.0 (158).
- Necesidad de retrasos de ciclos de tratamiento de inmunoterapia.

Variables relacionadas con el seguimiento (recidiva y mortalidad)

- Respuesta tumoral al tratamiento. Se evaluó de acuerdo a los criterios RECIST 1.1 (159).
- Progresión de enfermedad (variable dicotómica sí/no), que corresponde a la SLP de cada paciente. La SLP se define como el tiempo transcurrido entre el inicio del tratamiento y la documentación de progresión de enfermedad o muerte del paciente.
- La Supervivencia Global (SG) es el periodo desde el inicio del tratamiento hasta la fecha de la muerte de cada paciente.

- Tiempo de seguimiento. Se calcula desde el inicio del tratamiento hasta el fallecimiento o salida del estudio (el paciente se notifica como perdido).

Variables moleculares

Para el objetivo primario de este estudio se analizó la expresión soluble de PD-L1 mediante ELISA. El proceso y la técnica se muestra a continuación en el Apartado 2 de este capítulo “Análisis de la expresión de sPD-L1 por ELISA”. La expresión de sPD-L1 se dicotomizará en dos grupos: baja expresión (\leq mediana sPD-L1) y alta expresión ($>$ mediana sPD-L1). Para el objetivo secundario del estudio en el que se analizó la correlación entre la expresión de PD-L1 en tejido tumoral y los niveles de sPD-L1, se realizó el análisis en células tumorales mediante inmunohistoquímica (la técnica se muestra en el Apartado 3 de este capítulo “Análisis de la expresión de PD-L1 por Inmunohistoquímica”), obteniendo las muestras de tejido correspondientes mediante biopsias del tumor primario o de metástasis de los pacientes. La expresión de PD-L1 en tejido tumoral se clasificó en: nula expresión ($<1\%$), baja expresión ($1-49\%$) y alta expresión ($\geq 50\%$).

2. Análisis de la expresión de sPD-L1 por ELISA

Las determinaciones se realizaron sobre muestras de sangre periférica. Para analizar sPD-L1, se recubrieron 0,1 mg/pocillo de mAb PD-L1 anti-humano de ratón (130021, sistemas de I + D) o mAb anti-PD1-L1 humano (29E.12B1) sobre placas de ELISA de Costar durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron con PBS y se bloquearon con tampón de bloqueo libre de proteínas (Pierce) durante 4 horas.

Los sueros o plasma del paciente se diluyeron con PBS en una proporción de volumen 1: 1. Se añadieron cien microlitros por pocillo de suero o plasma de pacientes diluidos y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron con PBS que contenía Tween-20 y se incubaron con 100 ml por pocillo de 0,1 mg / pocillo de anti-PD- L1 mAb (29E.2A3, Biolegend) en tampón de bloqueo libre de proteínas a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se lavaron a continuación y se incubaron con 1 mg/ml de estreptavidina-HRP (Jackson ImmunoResearch) diluido 1: 40.000 en tampón de bloqueo libre de proteínas durante 2 horas. Las placas se lavaron y trataron con biotín-il-tiramida (Perkin

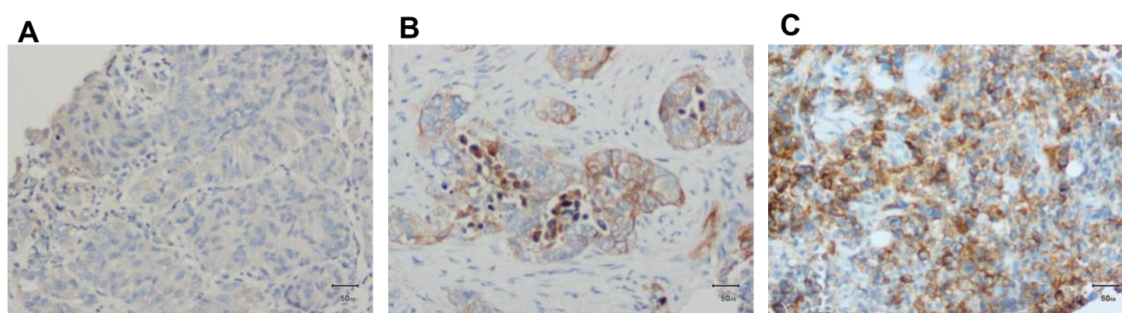
Elmer) durante 30 minutos, y después se lavaron e incubaron con 1 mg / ml de estreptavidina-HRP (Jackson ImmunoResearch) diluida 1: 400.000 en tampón de bloqueo libre de proteínas durante 2 horas con posterior desarrollo con TMB (Pierce). Las placas se leyeron a una densidad óptica (O.D.) de 450 nm. Todas las muestras se ensayaron por duplicado. También se realizó una curva estándar utilizando PD-L1-HIS humano recombinante (Novoprotein) con cada ensayo.

Se agruparon a los pacientes en dos grupos: alta expresión de sPD-L1 (pacientes con niveles de sPD-L1 superiores a la mediana) versus baja expresión de sPD-L1 (pacientes con niveles de sPD-L1 inferiores o iguales a la mediana).

3. Análisis de la expresión de PD-L1 por Inmunohistoquímica

La expresión de PD-L1 en tejido se evaluó en muestras tomadas por biopsia previo al inicio del tratamiento con inmunoterapia, con el uso de técnicas de inmunohistoquímica (Dako North America) automatizadas y validadas. La expresión de PD-L1 en el tumor se confirmó cuando se objetivó la tinción de membrana de la célula tumoral (a cualquier intensidad) a un nivel del 1% o superior, en un sección que incluía al menos 100 células tumorales que podrían evaluarse (figura 5). Se agrupó a los pacientes en tres grupos para el análisis de correlación con el factor soluble de PD-L1: Ausencia de expresión (PD-L1 <1%), expresión baja (1-49%) y alta expresión (>50%).

Figura 5. Expresión de PD-L1 en tinción inmunohistoquímica de biopsia de Carcinoma de Pulmón no Célula Pequeña.



A. Ausencia de expresión de PD-L1 (<1%). B. Baja expresión de PD-L1 (1-49%). C. Alta expresión de PD-L1 (>50%).

4. Análisis estadístico

Variables del estudio

- Las variables del objetivo principal del estudio son: expresión del factor soluble de PD-L1 (sPD-L1) y Supervivencia Global (SG).

- Las variables del objetivo secundario son: expresión de PD-L1 en tejido tumoral, así como las variables Supervivencia Libre de Progresión (SLP) y Tasa de Respuesta (TR).

- Los posibles factores predictores son:
 - Características clínicas: edad, sexo, Performance Status (PS) y hábito tabáquico.
 - Variables relacionadas con la enfermedad:
 - Tipo histológico.
 - Número y localización de metástasis: hepáticas, cerebrales, óseas, pulmonares y ganglionares.
 - Expresión inmunohistoquímica de PD-L1 (negativa vs baja vs alta).
 - Marcadores analíticos: serie hematopoyética, RNL y LDH.

Todas estas variables son categóricas, algunas por su propia naturaleza, y otras porque han sido categorizadas, siendo ésta la práctica habitual en este tipos de estudios.

Cálculo de la muestra

Para detectar una reducción en el riesgo de muerte del 20% en aquellos pacientes con tumores con baja expresión de sPD-L1 frente a pacientes con tumores con alta expresión, y asumiendo un error tipo alfa de 0.05 y una potencia estadística del 80%, es necesaria una muestra de 61 pacientes. Asumiendo, además una proporción esperada de pérdidas del 15%, se estima necesaria una muestra de 72 pacientes para cumplir los objetivos del estudio.

Consideramos que existe correlación entre la expresión de PDL1 en tejido tumoral y los niveles de factor soluble de PDL1 en suero si encontramos una

diferencia significativa en los niveles séricos de sPDL1 entre los subgrupos de pacientes con alta expresión de PDL1 (>50%), baja expresión (1-49%) o nula (<1%). Para el objetivo secundario del estudio se considerará que existe correlación entre los niveles IHQ de PD-L1 y los niveles séricos de sPD-L1 si se identificaban niveles medios de sPD-L1 significativamente elevados en los pacientes con alta expresión IHQ de PD-L1 vs los pacientes con expresión baja o nula; o si existía correlación entre los pacientes con alta expresión de sPD-L1 (niveles superiores a la media) y la alta expresión de PD-L1 por IHQ. El tamaño muestral necesario para detectar una diferencia de 1,5 desviaciones típicas en el valor medio de sPDL1 entre el subgrupo de pacientes con alta expresión de PDL1 por IHQ respecto a los pacientes con expresión negativa o baja, con una potencia del 90% es de 42 pacientes (14 observaciones por grupo).

Fases del estudio

Análisis univariante para encontrar qué factores pronóstico resultan significativos para cada una de las variables de respuesta.

Métodos estadísticos

Se dividió a los pacientes en dos grupos para el análisis de los resultados:

1. sPD-L1 elevado: Pacientes con niveles de sPD-L1 mayor a la mediana.
 2. sPD-L1 bajo: Pacientes niveles de sPD-L1 menor o igual a la mediana.
- Se realizó un análisis estadístico descriptivo, incluyendo medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas, y frecuencias absoluta y relativa para las categóricas.
 - Se utilizó el test de tendencia de Cochran- Armitage, y el T-test para comparar dos muestras independientes en las variables continuas.
 - El test Ji-cuadrado se utilizó para comparar dos o más grupos independientes de sujetos con respecto a una variable categórica.
 - Las curvas de supervivencia se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier, y se compararon con el test Log rank.

Por tanto, según la naturaleza de las variables respuesta, se utilizará la metodología correspondiente, aspecto que queda resumido en la siguiente tabla (Tabla 5).

Tabla 5. Métodos estadísticos utilizados en función de la naturaleza de la variable.

Variable respuesta	
Continua (datos de supervivencia)	<i>Kaplan-Meier</i>
Categorica	<i>Chi-cuadrado</i>

Para el análisis univariado de factores pronósticos se utilizará el valor P asociado al test de log-rank para todas las variables predictivas del estudio. Considerándose una variable significativa si su p-valor es inferior a 0.05. Asumiéndose la siguiente categorización:

1. Significativo si p-valor inferior a 0.05.
2. Dudoso si el valor de p es superior a 0.05 pero inferior a 0.2.
3. No significativo (NS), si p-valor es mayor a 0.2.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS versión 16 (SPSS, Inc., Chicago, IL. USA).

IV. RESULTADOS

1. Análisis descriptivo de las características clínico-patológicas generales de la población

Se seleccionaron 76 pacientes diagnosticados de CPNCP metastásicos entre octubre de 2017 y octubre de 2019 de los que se disponía de tejido tumoral y muestra de suero archivada. El análisis del factor soluble de PD-L1 se pudo realizar en 66 pacientes, en los diez pacientes restantes el resultado del análisis no fue concluyente y se excluyeron del análisis. En otros ocho pacientes no existían datos sobre la expresión de PD-L1 en tejido tumoral, por lo que también fueron excluidos del análisis.

La media de edad fue de 64 años (56 pacientes <70 años) y 61 pacientes eran varones (80,3%). En cuanto a la histología, 45 pacientes (59,2%) fueron diagnosticados de adenocarcinoma y 30 (39,5%) de carcinoma epidermoide. Sesenta y cinco (85,5%) presentaban PS 0-1 y 29 (38,2%) eran fumadores. Setenta pacientes (92,1%) se diagnosticaron en estadio IV y 56 (73,7%) tenían dos o más localizaciones metastásicas. Doce pacientes (15,8%) tenían metástasis cerebrales y 10 (13,2%) metástasis hepáticas. Cincuenta y seis pacientes tenían niveles de neutrófilos <7500/microlitro (73,7%), cincuenta y cinco niveles de linfocitos >1000/microlitro (72,4%), y cincuenta y un paciente RNL >3 (67,1%).

La expresión de PD-L1 por IHC fue clasificada de la siguiente manera: PD-L1 <1% (n=30, 39,5%), PD-L1 1-49% (n=18, 23,7%), PD-L1 >50% (n=12, 15,8%). Las características basales de los pacientes se resumen en la Tabla 6.

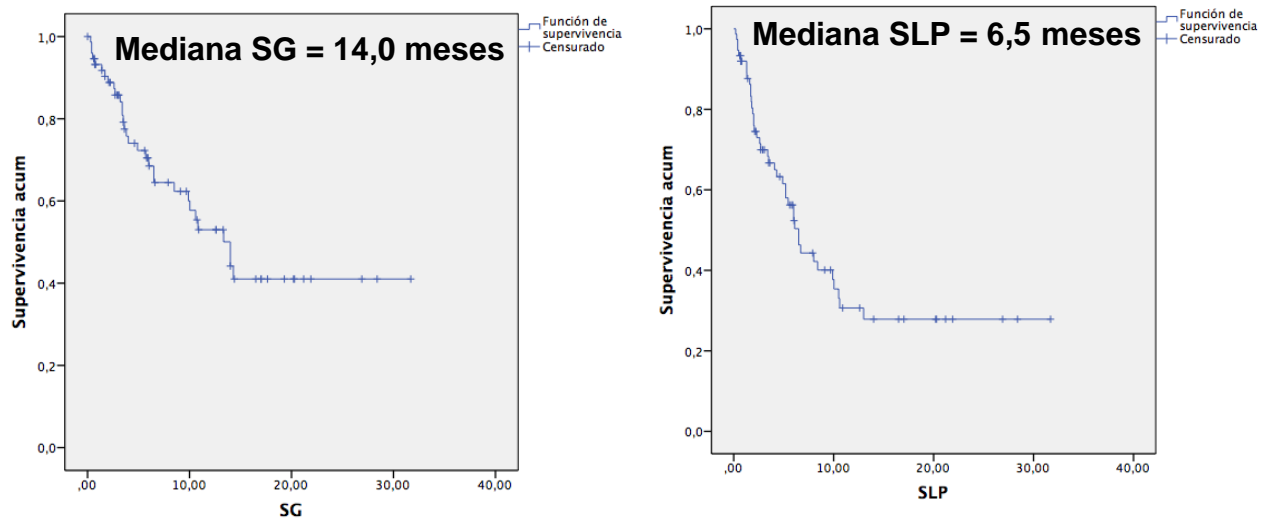
Tabla 6. Características clínico-patológicas de la población estudiada.

Características población	Total (n)	%
Nº total pacientes	76	100%
Edad <70 años ≥70 años	56 20	73,7% 26,3%
Sexo Hombre Mujer	61 15	80,3% 19,7%
Histología Adenocarcinoma Epidermoide Indeterminado	45 30 1	59,2% 39,5% 1,3%
Hábito tabáquico Fumador Exfumador Nunca fumador	29 44 2	38,2% 57,9% 2,6%
PS 0-1 2	65 11	85,5% 14,5%
Estadio III IV	5 70	6,6% 92,1%
Nº metástasis 1 2 o más	16 56	21,1% 73,7%
Metástasis cerebrales Si No	12 64	15,8% 84,2%
Metástasis hepáticas Si No	10 66	13,2% 86,8%

Características población	Total (n)	%
Neutrófilos ≥7500 <7500	14 56	18,4% 73,7%
Linfocitos ≥1000 <1000	55 19	72,4% 25%
Ratio neutrófilo/linfocito ≥3 <3	51 19	67,1% 25%

La mediana de SG en la población global es de 14,0 meses y la SLP de 6,5 meses (Figura 6). Sesenta y un pacientes fueron evaluables para respuesta al tratamiento: diecisiete pacientes (27,9%) fueron Respondedores (3 presentaron respuesta completa y 14 respuesta parcial).

Figura 6. Supervivencia Global y Supervivencia Libre de Progresión en el conjunto global de la población.



Toxicidad y efectos de la inmunoterapia

De los 76 pacientes seleccionados para el estudio, treinta presentaron algún tipo de toxicidad, veintiséis de ellos grado 1-2 (34,2%) y cuatro pacientes grado 3-4 (5,3%). La toxicidad más frecuente fue la astenia, desarrollada en el 19,7% de los pacientes, seguido de la cutánea que padecieron el 13,2%. La toxicidad menos frecuente fue la anorexia junto con la renal y la ocular (1,3%). Dieciséis pacientes (21,1%) precisaron retraso de algún ciclo de inmunoterapia por la toxicidad presentada. Tabla 7.

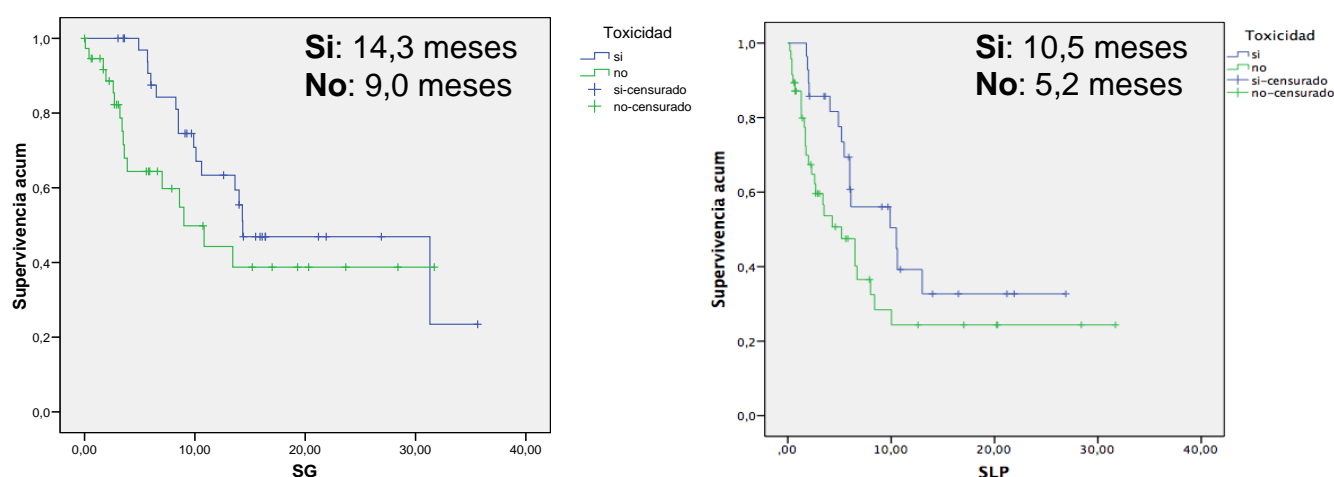
Tabla 7. Toxicidad presentada en la población estudiada.

Toxicidad	Total (n)	%
Presentación		
Si	30	49,4%
No	46	60,5%
Grado		
1-2	26	34,2%
3-4	4	5,3%
Retraso tratamiento		
Si	16	21,1%
No	60	78,9%
Hipotiroidismo		
Si	4	5,3%
No	72	94,7%
Cutánea		
Si	10	13,2%
No	66	86,8%
Astenia		
Si	15	19,7%
No	61	80,3%
Gastrointestinal		
Si	4	5,3%
No	72	94,7%
Neumonitis		
Si	2	2,6%
No	74	94,7%
Renal		
Si	1	1,3%
No	75	98,7%
Anorexia		
Si	1	1,3%
No	75	98,7%
Hepática		
Si	2	2,6%

Toxicidad	Total (n)	%
No	74	97,4%
Queratitis		
Si	1	1,3%
No	75	98,7%

La mediana de supervivencia global de los pacientes que presentaron toxicidad fue de 14,3 meses, frente a 9,0 meses en el grupo que no presentó toxicidad ($p=0,132$). El tiempo hasta la progresión fue de 10,5 meses en los pacientes que presentaron toxicidad frente a 5,2 meses los pacientes que no se evidenció toxicidad ($p=0,06$). Figura 7.

Figura 7. Supervivencia Global y Supervivencia Libre de Progresión en función de la toxicidad presentada.



2. Expresión de sPD-L1 como biomarcador pronóstico en CPNCP avanzado

2.1. Características de los pacientes

El análisis del factor soluble de PD-L1 se pudo realizar en sesenta y seis pacientes de 76 incluidos en el estudio, en los diez pacientes restantes el resultado del análisis no fue concluyente y se excluyeron.

Características según la mediana de expresión sPD-L1

La mediana de expresión de sPD-L1 en la población global fue de 1,21 ng/mL.

No se observaron diferencias significativas entre las diferentes características clínico-patológicas y la media de sPD-L1. Las características de los pacientes se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Mediana de expresión de sPD-L1 según las características clínico-patológicas de la población del estudio.

Características población	Niveles de sPD-L1 (mediana, ng/mL)	<i>p</i> valor
Total de pacientes	1,21	--
Edad <70 años ≥70 años	1,34 1,24	0,50
Sexo Hombre Mujer	1,31 1,22	0,72
Histología Adenocarcinoma Epidermoide Indeterminado	1,19 1,44 1,23	0,45
Hábito tabáquico Fumador Exfumador Nunca fumador	1,36 1,25 1,15	0,85
PS 0-1 2	1,28 1,38	0,43
Estadio III IV	1,11 1,37	0,39
Nº metástasis 1 2 o más	1,46 1,25	0,37

Características población	Niveles de sPD-L1 (mediana, ng/mL)	<i>p</i> valor
Metástasis cerebrales Si No	1,08 1,33	0,31
Metástasis hepáticas Si No	1,43 1,27	0,58
Neutrófilos ≥7500 <7500	1,25 1,3	0,85
Linfocitos ≥1000 <1000	1,31 1,20	0,65
Ratio neutrófilo/linfocito ≥3 <3	1,30 1,26	0,87

2.2. Tratamiento y Tasa de Respuesta

De los 76 pacientes incluidos en el estudio, cuarenta y siete (61,8%) recibieron tratamiento con Nivolumab, dieciocho (23,7%) con Atezolizumab y once (14,5%) con Pembrolizumab. Tabla 9.

Un total de 53 pacientes fueron evaluables para respuesta. De los restantes, en 10 pacientes el análisis del factor soluble de PD-L1 no fue concluyente, y en trece pacientes no fue posible la evaluación por pérdida de pacientes antes de realizarse en TAC de reevaluación.

Entre los pacientes con baja expresión de sPD-L1, la tasa de respuesta (TR) fue del 13,2% (7 pacientes), en comparación con el 15,1% (8 pacientes) en el grupo de pacientes con alta expresión de sPD-L1. La diferencia en la tasa de respuesta entre los dos grupos no fue estadísticamente significativa ($p=0,5$). Tabla 10.

La mediana de sPD-L1 en el grupo de pacientes Respondedores (respuesta completa y respuesta parcial) fue de 1,55 ng/mL, frente al 1,18 ng/mL en el grupo de pacientes de No-Respondedores al tratamiento ($p=0,096$).

Tabla 9. Tipo anti PD-1 utilizado en los pacientes del estudio.

Anti PD-1	Total (n)	%
Nivolumab	47	61,8%
Pembrolizumab	11	14,5%
Atezolizumab	18	23,7%

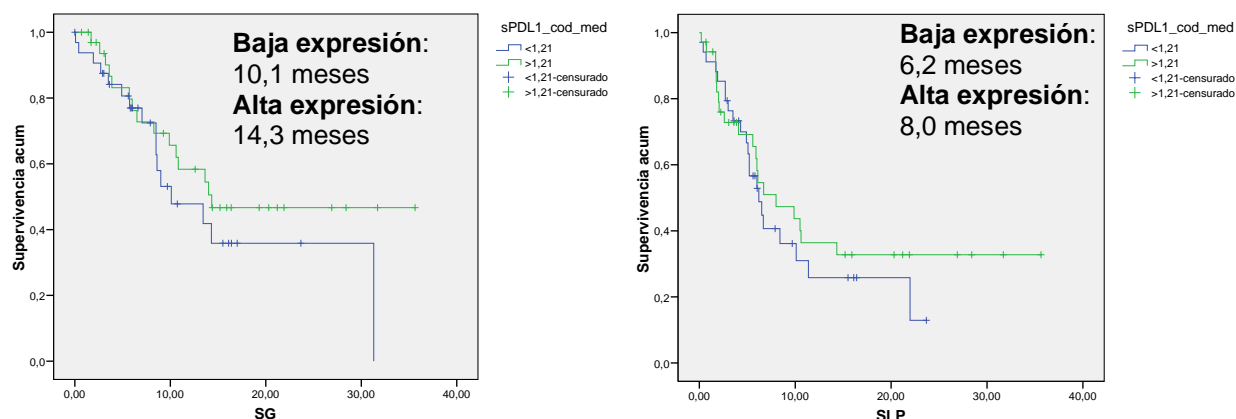
Tabla 10. Tasa de Respuesta en función de la expresión de sPD-L1.

RESPUESTA AL TRATAMIENTO	GRUPO 1 Baja expresión ($<1,21\text{ng/mL}$)	GRUPO 2 Alta expresión ($\geq 1,21\text{ ng/mL}$)	p valor
RESPUESTA COMPLETA / RESPUESTA PARCIAL	7 (13,2%)	8 (15,1%)	0,5
ENFERMEDAD ESTABLE / PROGRESIÓN DE ENFERMEDAD	16 (30,1%)	22 (41,5%)	

2.3. Supervivencia Global y Supervivencia Libre de Progresión

La mediana de Supervivencia Global en el grupo de baja expresión de sPD-L1 fue de 10,1 meses, en comparación con 14,3 meses en el grupo de alta expresión ($p=0,29$). Tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas en SLP, 6,2 vs 8,0 meses en los grupos de baja y alta expresión de sPD-L1 respectivamente ($p=0,46$). Figura 8.

Figura 8. Supervivencia Global y Supervivencia Libre de Progresión en función de la expresión de sPD-L1.



El análisis de la expresión de PD-L1 por inmunohistoquímica (IHC) se pudo realizar en 68 pacientes de los 76 incluidos en el estudio. En los ocho pacientes restantes no existían datos sobre la expresión de PD-L1 en tejido tumoral.

Características según expresión de PD-L1 del <1%, 1-49% y >50%

Las características de los pacientes en función de la expresión de PD-L1 (<1%, 1-49% y >50%) se resume en la Tabla 11. En los pacientes con estadio IV, se objetivó alta expresión de PD-L1 (>50%) en el 38,8% versus el 8,9% en estadio III, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,001$). En las variables clínicas, patológicas o moleculares restantes no se observaron diferencias significativas.

Tabla 11. Características clínicas de los pacientes en función de la expresión de PD-L1 por IHC (<1%, 1-49% y >50%).

Características población	Expresión PD-L1 IHC			<i>p valor</i>
	<1%	1-49%	>50%	
Nº total pacientes	19 (27,9%)	18 (26,4%)	31 (45,5%)	--

Características población	Expresión PD-L1 IHC			<i>p valor</i>
	<1%	1-49%	>50%	
Edad <70 años ≥70 años	12 (17,6%) 7 (10,2%)	16 (23,5%) 1 (1,4%)	17 (25%) 15 (22%)	0,015
Sexo Hombre Mujer	18 (26,4%) 1 (1,4%)	12 (17,6%) 5 (7,3%)	23 (33,8%) 9 (13,2%)	0,11
Histología Adenocarcinoma Epidermoide	8 (11,7%) 11 (16,1%)	13 (19,1%) 4 (5,8%)	21 (30,8%) 11 (16,1%)	0,08
Hábito tabáquico Fumador Exfumador Nunca fumador	10 (15,1%) 9 (13,6%) 0 (0%)	10 (15,1%) 7 (10,6%) 0 (0%)	15 (22,7%) 13 (19,6%) 2 (0%)	0,61
PS 0-1 2	14 (20,5%) 5 (7,3%)	15 (22%) 2 (2,9%)	30 (44,1%) 2 (2,9%)	0,26
Estadio III IV	0 (0%) 18 (26,8%)	0 (0%) 17 (25,3%)	6 (8,9%) 26 (38,8%)	0,01
Metástasis cerebrales Si No	2 (2,9%) 17 (25%)	2 (2,9%) 15 (22%)	1 (1,4%) 31 (45,5%)	0,44
Metástasis hepáticas Si No	3 (4,4%) 16 (23,5%)	3 (4,4%) 14 (20,5%)	1 (1,4%) 31 (45,5%)	0,18

Características población	Expresión PD-L1 IHC			<i>p valor</i>
	<1%	1-49%	>50%	
Neutrófilos ≥7500 <7500	5 (7,4%) 13 (19,4%)	1 (1,4%) 16 (23,8%)	11 (16,4%) 21 (31,3%)	0,77
Linfocitos ≥1000 <1000	14 (21,2%) 4 (6%)	9 (13,6%) 8 (22,2%)	22 (33,3%) 10 (15,1%)	0,63
RNL <3 ≥3	6 (8,9%) 12 (17,9%)	4 (5,9%) 13 (19,4%)	7 (10,4%) 25 (37,3%)	0,38

Características según expresión de PD-L1 <1% o ≥1%

Las características de los pacientes en función de la expresión de PD-L1 (<1% vs ≥1%) se resume en la Tabla 12. No se observaron diferencias estadísticamente significativas excepto en la variable de neutrófilos, en la que se objetivó neutrofilia en el 19,6% de los pacientes con expresión de PD-L1 ≥1% versus el 7,5% en los pacientes con expresión <1% (p=0,005).

Tabla 12. Características clínicas de los pacientes en función de la expresión de PD-L1 por IHC (<1% y ≥1%).

Características población	Expresión PD-L1 IHC		<i>p valor</i>
	<1%	≥1%	
Nº total pacientes	20 (29,4%)	48 (70,5%)	--
Edad <70 años ≥70 años	12 (17,9%) 7 (10,4%)	32 (47,7%) 16 (23,8%)	0,31

Características población	Expresión PD-L1 IHC		<i>p valor</i>
	<1%	≥1%	
Sexo Hombre Mujer	18 (26,8%) 1 (1,4%)	34 (50,7%) 14 (20,8%)	0,15
Histología Adenocarcinoma Epidermoide	8 (11,9%) 11 (16,4%)	34 (50,7%) 14 (20,8%)	0,36
Hábito tabáquico Fumador Exfumador Nunca fumador	10 (15,3%) 9 (13,8%) 0 (0%)	24 (36,9%) 20 (30,7%) 2 (3%)	0,97
PS 0-1 2	14 (20,8%) 5 (7,4%)	44 (65,6%) 4 (5,9%)	0,35
Estadio III IV	0 (0%) 18 (27,2%)	6 (9%) 42 (63,6%)	0,85
Metástasis cerebrales Si No	2 (2,9%) 17 (25,3%)	3 (4,4%) 45 (67,1%)	0,45
Metástasis hepáticas Si No	3 (4,4%) 16 (23,8%)	4 (5,9%) 44 (65,6%)	0,96
Neutrófilos ≥7500 <7500	5 (7,5%) 13 (19,6%)	13 (19,6%) 35 (53%)	0,005

Características población	Expresión PD-L1 IHC		<i>p valor</i>
	<1%	≥1%	
Linfocitos ≥1000 <1000	14 (21,2%) 4 (6%)	29 (43,9%) 19 (28,7%)	0,41
RNL <3 ≥3	6 (9%) 12 (18,1%)	12 (18,1%) 36 (54,5%)	0,74

3.2. Tasa de Respuesta

Un total de 53 pacientes fueron evaluables en términos de respuesta. No disponíamos de información de la expresión de PD-L1 en tejido tumoral en ocho pacientes y el resto fueron pacientes perdidos.

De los Respondedores, 11 pacientes (20,7%) tenían una expresión de PD-L1 >50%, frente al 0% y al 5,6% de Respondedores en el grupo de nula y baja expresión de PD-L1 respectivamente ($p=0,004$). Tabla 13.

En la clasificación de los pacientes en expresión de PD-L1 en menor o mayor al 1%, 13 pacientes (24,5%) con expresión de PD-L1 ≥1% fueron Respondedores, frente al 0% con expresión <1% ($p=0,009$). Tabla 14.

Tabla 13. Tasa de Respuesta según expresión de PD-L1 (<1%, 1-49%, >50%).

TIPO DE RESPUESTA	<1%	1-49%	>50%	<i>p valor</i>
RESPUESTA COMPLETA / RESPUESTA PARCIAL	0 (0%)	3 (5,6%)	11 (20,7%)	0,004
ENFERMEDAD ESTABLE / PROGRESIÓN DE ENFERMEDAD	14 (26,4%)	13 (24,5%)	12 (22,6%)	

Tabla 14. Tasa de Respuesta según expresión de PD-L1 (<1% o ≥1%).

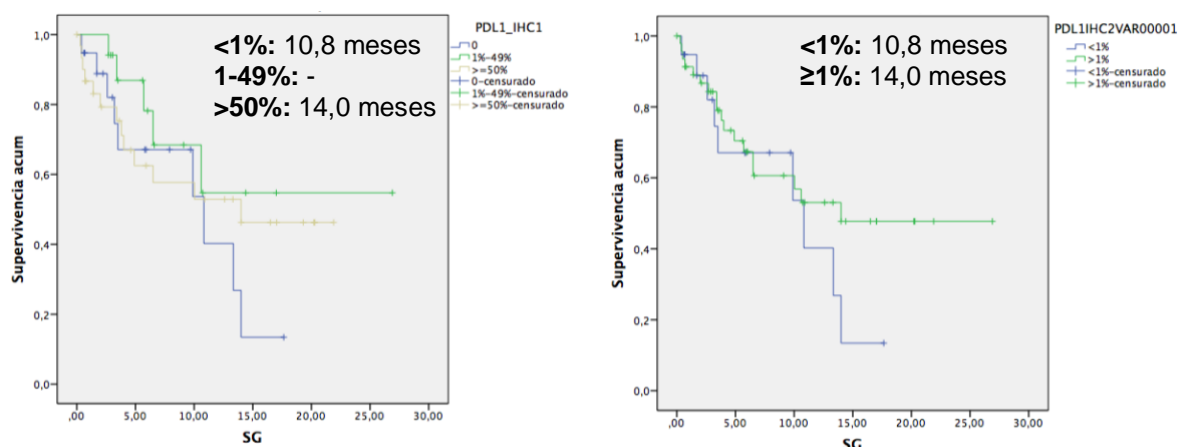
TIPO DE RESPUESTA	<1%	≥1%	p valor
RESPUESTA COMPLETA / RESPUESTA PARCIAL	0 (0%)	13 (24,5%)	0,009
ENFERMEDAD ESTABLE / PROGRESIÓN DE ENFERMEDAD	14 (26,4%)	25 (47,1%)	

3.3. Supervivencia Global y Supervivencia Libre de Progresión

La mediana de Supervivencia Global en el grupo de <1% de expresión de PD-L1 fue de 10,8 meses frente a 14,0 meses en el grupo de ≥1% de expresión. En el grupo de 1-49% de expresión no se alcanzó la mediana de Supervivencia Global (p=0,42).

En la clasificación de expresión de PD-L1 por mayor o menor al 1%, la mediana de Supervivencia Global fue de 10,8 meses en el grupo de <1% de expresión, frente a 14,0 meses en el grupo de ≥1% de expresión, no siendo estadísticamente significativo (p=0,32). Figura 9.

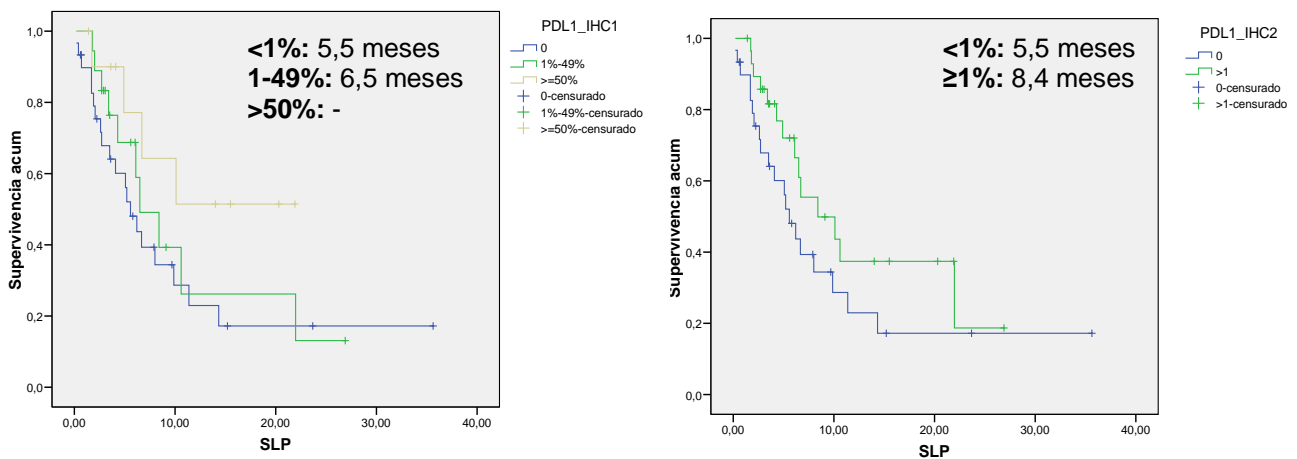
Figura 9. Supervivencia Global en función de la expresión de PD-L1 en tejido por IHC. Clasificado por expresión de <1%, 1-49% y ≥50% (izquierda) y de <1% y ≥1% (derecha).



La mediana de Supervivencia Libre de Progresión en el grupo de expresión de PD-L1 de <1% fue de 5,5 meses frente a 6,5 meses en el grupo de 1-49%. La

mediana de SLP no se alcanzó en el grupo de expresión de $>50\%$ ($p=0,19$). En la clasificación de expresión de PD-L1 en mayor o menor al 1% , la mediana de SLP fue de 5,5 meses en el grupo de $<1\%$ frente a 8,4 meses en el de $\geq 1\%$ ($p=0,13$). Figura 10.

Figura 10. Supervivencia Libre de Progresión en función de la expresión de PD-L1 en tejido por IHC. Clasificado por expresión de $<1\%$, $1-49\%$ y $>50\%$ (izquierda) y de $<1\%$ y $\geq 1\%$ (derecha).



4. Correlación de expresión de PD-L1 por IHC y de sPD-L1

De los pacientes con baja expresión de sPD-L1 ($<1,21$ ng/mL), 14 pacientes (25,9%) presentaron nula expresión de PD-L1, frente a 7 pacientes (12,9%) que presentaron alta expresión de PD-L1 ($>50\%$). De los que tenían alta expresión de sPD-L1 ($\geq 1,21$ ng/mL), 15 pacientes (27,7%) presentaron nula expresión de PD-L1, frente a 6 pacientes (11,1%) con baja expresión de PD-L1 y 4 pacientes (7,4%) que presentaron alta expresión de PD-L1 ($>50\%$) ($p=0,65$). Tabla 15.

Tabla 15. Correlación entre la mediana de expresión sPD-L1 y la expresión de PD-L1 (<1%, 1-49%, >50%).

Expresión PD-L1 IHC	Mediana sPD-L1 (ng/mL)		<i>p valor</i>
	<1,21	≥1,21	
<1%	14 (25,9%)	15 (27,7%)	0,65
1-49%	8 (14,8%)	6 (11,1%)	
>50%	7 (12,9%)	4 (7,4%)	

De los pacientes con baja expresión de sPD-L1 (<1,21 ng/mL), 14 pacientes (25,9%) presentaron expresión de PD-L1 <1%, frente a 15 pacientes (27,7%) que presentaron expresión de PD-L1 ≥1%. De los que tenían expresión de sPD-L1 mayor a la mediana (≥1,21 ng/mL), 15 pacientes (27,7%) presentaron expresión de PD-L1 <1%, frente a 10 pacientes (18,5%) con expresión de PD-L1 ≥1% (p=0,2). Tabla 16.

Tabla 16. Correlación entre la mediana de expresión sPD-L1 y la expresión de PD-L1 (<1% y ≥1%).

Expresión PD-L1 IHC	Mediana sPD-L1 (ng/mL)		<i>p valor</i>
	<1,21	≥1,21	
<1%	14 (25,9%)	15 (27,7%)	0,2
≥1%	15 (27,7%)	10 (18,5%)	

5. Análisis de las variables clínico-patológicas y moleculares pronósticos de supervivencia

5.1. Supervivencia Global

Se realizó un análisis univariante para evaluar la influencia de las características clínico-patológicas y moleculares en la Supervivencia Global. La variable que se asoció significativamente con peor SG fue el PS ≥2 (HR 11,5). Tabla 17.

Tabla 17. Análisis Univariante de factores asociados a Supervivencia Global

Variables n=76	Análisis Univariante HR 95% CI	Log-Rank test p-valor	HR	Significación estadística
Edad <70 años ≥70 años	(3,2-25,3) (7,4-12,2)	0,14	0,47	Dudoso
Sexo Hombre Mujer	(8,5-18,3) (5,8-56,7)	0,24	-	NS
Hábito tabáquico Fumador Exfumador Nunca fumador	- (8,5-18,7) -	0,65	-	NS
PS 0-1 2	(8,3-54,2) (0,0-7,4)	0,0	11,5	Significativo
Nº localizaciones metástasis 1 2 o más	- (8,8-18,0)	0,25	-	NS
Metástasis cerebrales Si No	(0,0-34,3) (9,6-17,6)	0,73	-	NS
Metástasis hepáticas Si No	(2,9-13,6) (2,7-25,8)	0,1	-	Dudoso
Neutrófilos ≥7500 <7500	(0,002-62,5) (12,8-15,1)	0,92	-	NS
Linfocitos ≥1000 <1000	(9,6-52,9) (6,0-14,1)	0,07	2,8	Dudoso
RNL <3 ≥3	- (5,3-23,2)	0,83	-	NS

V. DISCUSIÓN

En los resultados de este estudio no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la Supervivencia Global, Supervivencia Libre de Progresión, ni en la Tasa de Respuesta en función de la expresión de sPD-L1.

1. Expresión de sPD-L1 como biomarcador pronóstico y predictivo de respuesta a CPNCP avanzado

La mediana de expresión de sPD-L1 detectada en nuestra serie de pacientes ha sido de 1,21 ng/mL. La mediana de expresión de este valor en CPNCP avanzado está en línea con otras investigaciones realizadas hasta la fecha pero en muy variable en los diferentes estudios analizados. Okuma et al. analizó una serie de 96 pacientes con carcinoma de pulmón avanzado, incluido el CPCP, encontrando una mediana de sPD-L1 de 7,32ng/ml (141). Por otro lado, Zhao et al. analizaron una serie de 126 pacientes con CPNCP localmente avanzado irresecable tratados con quimioterapia y radioterapia, en el que la mediana sPD-L1 fue de 0,0965ng/ml (160). En otra serie analizada por Murakami et al. de 233 pacientes con CPNCP avanzado, la mediana de sPD-L1 fue de 0,0677 ng/ml (161). Esta variabilidad podría explicarse por el hecho de que se trata de series retrospectivas, llevadas a cabo con muestras pequeñas de pacientes. Todas ellas están analizadas por método ELISA, como en nuestro estudio, pero con diferentes puntos de corte para la definición de alta o baja expresión del marcador, que hace que sea muy difícil comparar los resultados.

En la mayoría de los estudios publicados hasta la fecha sobre el valor pronóstico del factor soluble de PD-L1, indican que los niveles elevados de este marcador en el CPNCP avanzado, están asociados a un peor pronóstico si no se tratan con inhibidores de PD-L1 (162). En los pacientes de nuestro estudio tratados con inmunoterapia en segunda línea de CPNCP avanzado, se observó una tendencia favorable para los pacientes con sobreexpresión de sPD-L1 tanto en términos

de TR como de SLP y SG, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Los pacientes con alta expresión de sPD-L1 alcanzaron una mayor SG con el tratamiento de inmunoterapia (14,3 meses frente a 10,1 meses, $p=0,29$) y mayor SLP (8 meses frente a 6,2 meses, $p=0,46$), lo que sugiere que los pacientes con alta expresión de sPD-L1 podrían ser una subpoblación que presenta un peor perfil clínico pero mejor respuesta a inmunoterapia. El número limitado de pacientes nos impidió evaluar el hipotético papel pronóstico de este marcador de manera significativa. Cabe señalar que los pacientes con alta expresión de sPD-L1 presentaban características más desfavorables con presencia de metástasis hepáticas o mayor ratio neutrófilo/linfocito. Murakami et al. objetivaron que la presencia de metástasis hepáticas era significativamente mayor en el subgrupo de pacientes con altos niveles de sPD-L1. Respecto a la eficacia, la tasa de respuesta fue similar entre los pacientes de alta y baja expresión de sPD-L1 (22% frente a 24%), pero la tasa de control de enfermedad (definida como respuesta completa, parcial o enfermedad estable), en el grupo de alta expresión fue significativamente más baja. La PFS y SG fue significativamente más corta en el grupo de alta expresión de sPD-L1. Así, presentar niveles altos de sPD-L1 fue un predictor negativo de control de la enfermedad mediante el uso de ICI y un predictor negativo independiente de pronóstico en pacientes con CPNCP avanzado que reciben tratamiento con anti-PD1 (161).

En este sentido, Mazzaschi et al. escribieron sobre el papel incierto de sPD-L1, aunque se han propuesto varios efectos biológicos. El factor soluble de PD-L1 parece inducir la apoptosis de en las células T del carcinoma renal avanzado. Una hipótesis sería que sPD-L1 podría inactivar las células T tumorales circulantes reduciendo la actividad inmune antitumoral. Esta suposición deriva del impacto negativo observado en la supervivencia al asociar altos niveles de sPD-L1 con el bajo número de células T y NK citotóxicas. Además, sPD-L1 podría competir y saturar los sitios de unión de PD-1 eludiendo así la actividad de los agentes anti-PD1 (163).

2. Expresión de PD-L1 en tejido como biomarcador pronóstico y predictivo de respuesta a CPNCP avanzado

Los inhibidores de PD-1/PD-L1 dependen en gran medida del microambiente tumoral para actuar. Teóricamente, sólo los pacientes con tumor e inflamación deberían beneficiarse del tratamiento con inmunoterapia. Aquellos otros tipos de tumores denominados fríos, tiene una respuesta deficiente a la inmunoterapia dada la ausencia de células efectoras inmunitarias en el microambiente tumoral. Por tanto, la prioridad es identificar aquellos pacientes que potencialmente se podrían beneficiar de recibir tratamiento con ICIs.

El papel predictivo de la expresión de PD-L1 ha sido estudiado en diferentes series para determinar la asociación con la eficacia al tratamiento con anti-PD1/PDL1. En este contexto, por un lado se ha visto que la sobreexpresión de este biomarcador está asociado a peor pronóstico en pacientes con cáncer, y por otro lado, se ha considerado como predictor de respuesta tumoral a tratamiento, no así con la misma potencia en todos los tipos de tumores (164). Sin embargo, la fiabilidad de la expresión de PD-L1 está bajo debate dada la variabilidad con el valor del punto de corte y del método utilizado en su determinación. Varios factores interfieren en la detección por inmunohistoquímica, como la preparación de los tejidos, los clones de anticuerpos, la variabilidad en el procesamiento, las biopsias de tejido de tumor primario versus metástasis o tinción de células tumorales versus inmunitarias. La expresión de PD-L1 se puede expresar en altos niveles en las células dendríticas y células supresoras, donde juega un papel regulador fundamental en la activación de las células T durante la presentación de antígeno. Los subgrupos por expresión de PD-L1 por IHC detectados en nuestra serie fueron 27,9% con expresión PD-L1 <1%, 26,4% con expresión entre 1-49% y el 45,5% con expresión >50%.

Xiao-Jiang Chen et al. analizaron veinticuatro ensayos con más de 14.860 pacientes comparando la terapia convencional con el tratamiento con anti-PDL1. Estos últimos redujeron significativamente el riesgo de muerte (HR 0,72, 95% IC 0,66 a 0,78), independientemente del tipo de tumor. Además, cuando la

expresión de PD-L1 era >1%, había un aumento en la supervivencia global en los pacientes con CPNCP avanzado y otros en otros tipos de cáncer. Por todo ello concluyeron que en comparación con la terapia convencional, las monoterapias con anti-PD1/PD-L1 prolongaban la SG de los pacientes con expresión de PD-L1 >1%, pero no en aquellos con expresión de PD-L1 <1%, independientemente del tipo de cáncer. Por tanto, recomendaban la expresión de PD-L1 como biomarcador predictivo de respuesta a tratamiento pero en pacientes con monoterapia y no en pacientes con terapias combinadas (165). Por otra parte, se han visto respuestas a tratamiento con antiPD1/PD-L1 en pacientes con ausencia de expresión, por lo que su uso como biomarcador es dudoso. Por ello, una mejor comprensión del sistema inmunitario del huésped y el microambiente tumoral es necesario para elegir mejor los pacientes previo tratamiento con anti-PDL1. En nuestro estudio, de los pacientes que obtuvieron respuesta parcial o completa, el 20,7% presentaban una expresión de PD-L1 >50%, en cambio, ningún paciente presentó respuesta del grupo de expresión de PD-L1 negativo, $p=0,004$. En cuanto a la Supervivencia Global, en el grupo de expresión de PD-L1 <1% fue de 10,8 meses frente a 14 meses en el grupo con expresión >50%, no de manera significativa.

2.1. Relación entre toxicidad a inmunoterapia y eficacia

Existen datos que sugieren que la toxicidad inmunorrelacionada está asociada con una mayor eficacia al tratamiento con ICIs. Syed Hussaini et al. realizaron una revisión sobre 51 estudios que buscaban esta relación, incluyendo melanoma, cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer urotelial, cáncer de cabeza y cuello y tumores gastrointestinales. En pacientes con melanoma metastásico, el desarrollo de toxicidad inmunorrelacionada se asoció de manera significativa con una mayor SG (15,24 meses vs 8,94 meses), así como una mayor SLP (17,61 meses vs 2,23 meses). Resultados similares se objetivaron en pacientes con cáncer de pulmón, son SG de 19,07 meses vs 7,45 meses y SLP de 8,97 meses vs 3,06 meses. Particularmente, las toxicidades G3-4 se asociaron con un aumento de la ORR pero con una peor SG.

La principal hipótesis de este hecho son las similitudes existentes entre los antígenos presentados en las células tumorales y en los tejidos sanos. La

reactividad cruzada conduce a una respuesta mediada por células T no solo hacia las células tumorales, sino también hacia las células sanas (166).

V Ellen Maher et al. examinaron siete estudios con 1747 pacientes diagnosticados de cáncer urotelial metastásico o localmente avanzado en tratamiento con anti-PD1/PD-L1, en los que se reportó toxicidad inmunorrelacionada en el 28% de los pacientes que respondieron a tratamiento con inmunoterapia vs el 12% que no respondieron. Se observó un aumento de la SG en pacientes que presentaron toxicidad (167).

En nuestro estudio, el 49,4% de los pacientes presentaron algún tipo de toxicidad, el 34,2% grado 1-2 y el 5,3% grado 3-4. La mediana de SG de los pacientes que presentaron toxicidad fue de 14,3 meses frente a 9 meses del grupo que no presentó toxicidad ($p=0,132$), y la SLP fue 10,5 meses frente a 5,2 meses ($p=0,06$). La toxicidad más frecuente presentada fue la astenia y la cutánea.

Esta asociación hace que sea fundamental vigilar los efectos secundarios para una rápida detección y así establecer el tratamiento de manera precoz con el uso apropiado de corticoides y otros inmunosupresores, para que cualquier interrupción del tratamiento con inmunoterapia pueda ser reanudado lo antes posible.

3. Análisis de correlación entre el factor soluble de PD-L1 y PD-L1 en tejido tumoral

Los tratamientos que inhiben el punto de control inmunológico como son los anti-PD1/PDL1 han demostrado tener una gran actividad antitumoral sobre diferentes neoplasias, incluido el CPNCP (168). Sin embargo, hay un número importante de pacientes que presentarán una rápida progresión durante los primeros meses de tratamiento. Por ello, existe una necesidad urgente de disponer de biomarcadores predictivos que nos permitan clasificar los pacientes que se pueden beneficiar con más probabilidad de estos tratamientos, evitando así

utilizarlos en pacientes que no van a responder y puedan desarrollar toxicidades potencialmente graves (122,169).

La expresión de PD-L1 en tejido tumoral es un biomarcador predictivo crucial de terapias anti-PD1/PDL1 en pacientes con carcinoma de pulmón. En la práctica clínica, la expresión de PD-L1 igual o mayor al 50% en tejido tumoral es necesaria para el tratamiento con inmunoterapia en monoterapia en primera línea del CPNCP avanzado, y en segundas y sucesivas líneas, los pacientes con mayor expresión de PD-L1, tienden a beneficiarse más de tratamientos con inmunoterapia. Así, en todas las guías clínicas internacionales, la determinación de la expresión de PD-L1 en tejido tumoral por IHC en los pacientes con CPNCP avanzado que son candidatos a tratamiento, está actualmente indicada y hasta el momento, es el biomarcador estándar. Sin embargo, hay ciertas limitaciones en el uso de la IHC de PD-L1, por la necesidad de técnicas invasivas para su obtención, la heterogeneidad del tejido o el tiempo de adquisición y análisis. Una pequeña parte de tejido tumoral no representa las características de todo el tumor. En este sentido, analizar y monitorizar la expresión de sPD-L1, puede tener un papel importante por ser más representativo del estado del sistema inmune y ayudar en la toma de decisiones clínicas.

Se ha visto que un elevado nivel de sPD-L1 fue correlacionado con peor pronóstico. En el estudio de Okuma et al. (141) de 96 pacientes con CPNCP avanzado, un elevado nivel sPD-L1 ($>7,32$ ng/ml) se asoció a una disminución significativa de la supervivencia global ($p=0,037$) y no objetivó correlación entre los niveles de sPD-L1 y las diferentes características clínico-patológicas de los pacientes, como subtipos histológicos, hábito tabáquico o estadio clínico. Los resultados de nuestro análisis también muestran que los niveles de sPD-L1 no se correlacionaban de forma estadísticamente significativa con la expresión de PD-L1 en tejido analizado por IHC ($p=0,245$), así como tampoco con las diferentes características clínico-patológicas, salvo en la población con metástasis cerebrales que eran más frecuentes entre los pacientes con alta expresión de sPD-L1 (20% vs 3%, $p=0,04$). Este hallazgo de nuestro estudio no se ha observado en otros análisis publicados hasta la fecha. La media de sPD-L1 en nuestra serie fue de 1,21 ng/ml, y ese fue el punto de corte para definir los

subgrupos de alta y baja expresión con los que realizar los análisis estadísticos. Es importante resaltar la gran variabilidad de expresión de sPD-L1 publicada hasta la fecha en la literatura. Zhang et al. (170) definieron la alta expresión como niveles superiores a 0,63 ng/mL para su análisis, Okuma et al. 7,32 ng/mL (141) y Constantini et al. 0,03 ng/mL (171). Esta gran variabilidad dificulta la comparación entre los resultados de los diferentes estudios, y traduce diferencias en la metodología usada para el análisis de sPD-L1.

Este análisis presenta importantes limitaciones que deben de tenerse en cuenta al analizar sus resultados. Se trata de un estudio retrospectivo en que algunas de las muestras de suero fueron extraídas en momentos diferentes a la obtención de la muestra histológica, y en diferentes momentos de la evolución de los pacientes. Existen datos en la literatura como los reportados por Vecchiarelli et al (171), que demuestran la variabilidad de sPD-L1 en función de los tratamientos recibidos. Observaron que los pacientes tratados con quimioterapia presentaban elevación progresiva de sPD-L1, mientras que aquellos tratados con dianas moleculares dichos niveles se reducían a lo largo del tratamiento. Dichos autores sugieren que sPD-L1 es un biomarcador dinámico a lo largo del tiempo y modificable por los tratamientos, por lo que para su desarrollo y potencial aplicabilidad como factor predictivo de respuesta a los tratamientos de inmunoterapia, sería fundamental realizar el análisis antes del inicio de dicho tratamiento.

Por otra parte los resultados de nuestro estudio se basan en una población pequeña aunque alcanza el tamaño muestral deseado para los objetivos de nuestro análisis. Además, hubo pacientes en los que el análisis serológico no fue valorable. No obstante la tendencia observada en nuestros datos no apoya la hipótesis inicial, dado que no existen diferencias numéricas de las medias de sPD-L1 entre los subgrupos de pacientes con alta, baja y nula expresión IHQ de PD-L1.

Por el momento existe escasa evidencia y bibliografía sobre sPD-L1 y el posible valor predictivo de respuesta a inmunoterapia y su correlación con la expresión de PD-L1 en células tumorales.

VI. CONCLUSIONES FINALES

1. Los niveles elevados de sPD-L1 no se correlacionan de forma estadísticamente significativa con ninguna variable clínico-patológica en pacientes con CPNCP avanzado.
2. Los niveles elevados de factor soluble de PD-L1 (sPD-L1) en pacientes con CPNCP avanzado tratados con inmunoterapia en segunda línea, no se asocia con diferencias estadísticamente significativas en Supervivencia Global, aunque parece existir una tendencia numérica favorable (14,3 meses vs 10,1 meses, $p=0,29$).
3. Los niveles elevados de factor soluble de PD-L1 (sPD-L1) no se correlacionan con la Tasa de Respuesta a inmunoterapia (15,1% vs 13,2%, $p=0,5$), ni con diferencias en Supervivencia Libre de Progresión (8 meses vs 6,2 meses, $p=0,46$), en pacientes tratados con inmunoterapia de segunda línea.
4. La expresión inmunohistoquímica de PD-L1 $>1\%$ se correlaciona con una mayor tasa de respuesta al tratamiento con inmunoterapia (24.5% vs 0%, $p=0,009$), y con una tendencia favorable tanto en SLP (8,4 meses vs 5,5 meses, $p=0,13$), como en SG (14 meses vs 10,8 meses, $p=0,32$).
5. No se observa correlación estadísticamente significativa entre los niveles solubles y la expresión inmunohistoquímica de PD-L1.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan D, Weinberg RA. Leading Edge Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation. 2011;
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 Jan 1;70(1):7–30.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. 394 CA: A Cancer Journal for Clinicians Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA CANCER J CLIN*. 2018;68:394–424.
4. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. 2018;
5. Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. Vol. 93, *British Journal of Cancer*. Br J Cancer; 2005. p. 825–33.
6. Naff JL, Côté ML, Wenzlaff AS, Schwartz AG. Racial differences in cancer risk among relatives of patients with early onset lung cancer. *Chest*. 2007;131(5):1289–94.
7. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. Vol. 123, *Chest*. American College of Chest Physicians; 2003. p. 21S-49S.
8. Jeon J, Holford TR, Levy DT, Feuer EJ, Cao P, Tam J, et al. Smoking and lung cancer mortality in the United States from 2015 to 2065: A comparative modeling approach. Vol. 169, *Annals of Internal Medicine*. American College of Physicians; 2018. p. 684–93.
9. Samet JM. The health benefits of smoking cessation. Vol. 76, *Medical Clinics of North America*. 1992. p. 399–414.
10. Parsons A, Daley A, Begh R, Aveyard P. Influence of smoking cessation after diagnosis of early stage lung cancer on prognosis: Systematic review of observational studies with meta-analysis. Vol. 340, *BMJ (Online)*. BMJ; 2010. p. 251.
11. Godtfredsen NS, Prescott E, Osler M. Effect of smoking reduction on lung cancer risk. *J Am Med Assoc*. 2005 Sep 28;294(12):1505–10.
12. Gatsonis CA, Aberle DR, Berg CD, Black WC, Church TR, Fagerstrom RM,

- et al. The national lung screening trial: Overview and study design. *Radiology*. 2011 Jan 1;258(1):243–53.
13. Horeweg N, Scholten ET, de Jong PA, van der Aalst CM, Weenink C, Lammers JWJ, et al. Detection of lung cancer through low-dose CT screening (NELSON): A prespecified analysis of screening test performance and interval cancers. *Lancet Oncol*. 2014 Nov 1;15(12):1342–50.
 14. Wender R, Fontham ETH, Barrera E, Colditz GA, Church TR, Ettinger DS, et al. American Cancer Society lung cancer screening guidelines. *CA Cancer J Clin*. 2013 Mar;63(2):106–17.
 15. Hopkins RJ, Duan F, Chiles C, Greco EM, Gamble GD, Aberle D, et al. Reduced expiratory flow rate among heavy smokers increases lung cancer risk: Results from the national lung screening trial-American college of radiology imaging network cohort. *Ann Am Thorac Soc*. 2017 Mar 1;14(3):392–402.
 16. Brenner DR, Boffetta P, Duell EJ, Bickeböllner H, Rosenberger A, McCormack V, et al. Previous lung diseases and lung cancer risk: A pooled analysis from the international lung cancer consortium. Vol. 176, *American Journal of Epidemiology*. Am J Epidemiol; 2012. p. 573–85.
 17. Berman DW, Crump KS. Update of potency factors for asbestos-related lung cancer and mesothelioma. Vol. 38, *Critical Reviews in Toxicology*. 2008. p. 1–47.
 18. Darby S, Hill D, Auvinen A, Barros-Dios JM, Baysson H, Bochicchio F, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: Collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *Br Med J*. 2005 Jan 29;330(7485):223–6.
 19. Fraumeni JF. Respiratory carcinogenesis: an epidemiologic appraisal. Vol. 55, *Journal of the National Cancer Institute*. J Natl Cancer Inst; 1975. p. 1039–46.
 20. Chen CL, Hsu LI, Chiou HY, Hsueh YM, Chen SY, Wu MM, et al. Ingested arsenic, cigarette smoking, and lung cancer risk: A follow-up study in arseniasis-endemic areas in Taiwan. *J Am Med Assoc*. 2004 Dec 22;292(24):2984–90.
 21. Sorahan T, Burges DCL, Hamilton L, Harrington JM. Lung cancer mortality

- in nickel/chromium platers, 1946-95. *Occup Environ Med*. 1998;55(4):236–42.
22. Raaschou-Nielsen O, Andersen ZJ, Beelen R, Samoli E, Stafoggia M, Weinmayr G, et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: Prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *Lancet Oncol*. 2013 Aug;14(9):813–22.
 23. Lorigan P, Radford J, Howell A, Thatcher N. Lung cancer after treatment for Hodgkin's lymphoma: A systematic review. Vol. 6, *Lancet Oncology*. *Lancet Oncol*; 2005. p. 773–9.
 24. Patel MI, Wang A, Kapphahn K, Desai M, Chlebowski RT, Simon MS, et al. Racial and ethnic variations in lung cancer incidence and mortality: Results from the Women's Health Initiative. *J Clin Oncol*. 2016 Feb 1;34(4):360–8.
 25. Brasky TM, White E, Chen CL. Long-term, supplemental, one-carbon metabolism–Related Vitamin B use in relation to lung cancer risk in the vitamins and lifestyle (VITAL) cohort. *J Clin Oncol*. 2017 Oct 20;35(30):3440–8.
 26. Tanvetyanon T, Bepler G. Beta-carotene in multivitamins and the possible risk of lung cancer among smokers versus former smokers: A meta-analysis and evaluation of national brands. *Cancer*. 2008 Jul 1;113(1):150–7.
 27. Rodriguez-Lara V, Hernandez-Martinez JM, Arrieta O. Influence of estrogen in non-small cell lung cancer and its clinical implications. Vol. 10, *Journal of Thoracic Disease*. AME Publishing Company; 2018. p. 482–97.
 28. Beutner KR. Human papillomavirus and human disease. *Am J Med*. 1997;102(5A):9–15.
 29. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. Vol. 10, *Journal of Thoracic Oncology*. Elsevier Inc; 2015. p. 1243–60.
 30. Morgensztern D, Ng SH, Gao F, Govindan R. Trends in stage distribution for patients with non-small cell lung cancer: A national cancer database survey. *J Thorac Oncol*. 2010;5(1):29–33.

31. Kadota K, Yeh YC, Sima CS, Rusch VW, Moreira AL, Adusumilli PS, et al. The cribriform pattern identifies a subset of acinar predominant tumors with poor prognosis in patients with stage I lung adenocarcinoma: A conceptual proposal to classify cribriform predominant tumors as a distinct histologic subtype. *Mod Pathol*. 2014;27(5):690–700.
32. Tsao MS, Marguet S, Le Teuff G, Lantuejoul S, Shepherd FA, Seymour L, et al. Subtype classification of lung adenocarcinoma predicts benefit from adjuvant chemotherapy in patients undergoing complete resection. *J Clin Oncol*. 2015 Oct 20;33(30):3439–46.
33. Roggli VL, Vollmer RT, Greenberg SD, McGavran MH, Spjut HJ, Yesner R. Lung cancer heterogeneity: A blinded and randomized study of 100 consecutive cases. *Hum Pathol*. 1985;16(6):569–79.
34. Cooke DT, Nguyen D V., Yang Y, Chen SL, Yu C, Calhoun RF. Survival comparison of adenosquamous, squamous cell, and adenocarcinoma of the lung after lobectomy. *Ann Thorac Surg*. 2010;90(3):943–8.
35. Funai K, Yokose T, Ishii GI, Araki K, Yoshida J, Nishimura M, et al. Clinicopathologic characteristics of peripheral squamous cell carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol*. 2003 Jul 1;27(7):978–84.
36. Dulmet-Brender E, Jaubert F, Huchon G. Exophytic endobronchial epidermoid carcinoma. *Cancer*. 1986;57(7):1358–64.
37. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627–39.
38. Amin, M.B., Edge, S., Greene, F., Byrd, D.R., Brookland, R.K., Washington, M.K., Gershenwald, J.E., Compton, C.C., Hess, K.R., Sullivan, D.C., Jessup, J.M., Brierley, J.D., Gaspar, L.E., Schilsky, R.L., Balch, C.M., Winchester, D.P., Asare, E.A., Madera, LR (Eds. ., editor. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Springer International Publishing; 2017. XVII, 1032.
39. Yan TD, Black D, Bannon PG, McCaughan BC. Systematic review and meta-analysis of randomized and nonrandomized trials on safety and efficacy of video-assisted thoracic surgery lobectomy for early-stage non-small-cell lung cancer. Vol. 27, *Journal of Clinical Oncology*. *J Clin Oncol*; 2009. p. 2553–62.

40. Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, González-Larriba JL, et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIA non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2006;7(9):719–27.
41. Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Riggi M, Hurteloup P, Mahe MA. Impact of Postoperative Radiation Therapy on Survival in Patients With Complete Resection and Stage I, II, or IIIA Non-Small-Cell Lung Cancer Treated With Adjuvant Chemotherapy: The Adjuvant Navelbine International Trialist Association (ANITA) Randomized . *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008 Nov 1;72(3):695–701.
42. Chang JY, Li QQ, Xu QY, Allen PK, Rebuena N, Gomez DR, et al. Stereotactic ablative radiation therapy for centrally located early stage or isolated parenchymal recurrences of non-small cell lung cancer: How to fly in a “no fly zone.” *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2014 Apr 1;88(5):1120–8.
43. O’Rourke N, Roqué i Figuls M, Farré Bernadó N, Macbeth F. Concurrent chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010 Jun 16;(6).
44. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017 Nov 16;377(20):1919–29.
45. Eberhardt WEE, Pöttgen C, Gauler TC, Friedel G, Veit S, Heinrich V, et al. Phase III study of surgery versus definitive concurrent chemoradiotherapy boost in patients with resectable stage IIIA(N2) and selected IIIB non-small-cell lung cancer after induction chemotherapy and concurrent chemoradiotherapy (ESPA-TUE). *J Clin Oncol.* 2015 Dec 10;33(35):4194–201.
46. Pignon J-P, Arriagada R, Ihde DC, Johnson DH, Perry MC, Souhami RL, et al. A Meta-Analysis of Thoracic Radiotherapy for Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 1992 Dec 3;327(23):1618–24.
47. Aupérin A, Arriagada R, Pignon J-P, Le Péchoux C, Gregor A, Stephens RJ, et al. Prophylactic Cranial Irradiation for Patients with Small-Cell Lung Cancer in Complete Remission. *N Engl J Med.* 1999 Aug 12;341(7):476–84.

48. Arbour KC, Riely GJ. Systemic therapy for locally advanced and metastatic non-small cell lung cancer: A review. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2019 Aug 27;322(8):764–74.
49. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet*. 2016 Apr 9;387(10027):1540–50.
50. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2017 Jan 21;389(10066):255–65.
51. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016 Nov 10;375(19):1823–33.
52. Rocco D, Della Gravara L, Battiloro C, Gridelli C. The role of combination chemo-immunotherapy in advanced non-small cell lung cancer. Vol. 19, *Expert Review of Anticancer Therapy*. Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 561–8.
53. Sezer A, Kilickap S, Gümüş M, Bondarenko I, Özgüroğlu M, Gogishvili M, et al. Cemiplimab monotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer with PD-L1 of at least 50%: a multicentre, open-label, global, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet [Internet]*. 2021 Feb 13 [cited 2023 Jan 26];397(10274):592–604. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673621002282/fulltext>
54. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018 May 31;378(22):2078–92.
55. Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med*. 2018 Jun 14;378(24):2288–301.
56. Paz-Ares L, Luft A, Vicente D, Tafreshi A, Gümüş M, Mazières J, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018 Nov 22;379(21):2040–51.
57. Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, Zurawski B, Kim S-W,

- Carcereny Costa E, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2019 Nov 21;381(21):2020–31.
58. Paz-Ares L, Ciuleanu T-E, Cobo M, Schenker M, Zurawski B, Menezes J, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2021 Jan 1;22(2):198–211.
 59. Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, Reungwetwattana T, Chewaskulyong B, Lee KH, et al. Osimertinib in Untreated EGFR -Mutated Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018 Jan 11;378(2):113–25.
 60. Seto T, Kato T, Nishio M, Goto K, Atagi S, Hosomi Y, et al. Erlotinib alone or with bevacizumab as first-line therapy in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (JO25567): An open-label, randomised, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2014 Oct 1;15(11):1236–44. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S147020451470381X/fulltext>
 61. Stinchcombe TE, Jänne PA, Wang X, Bertino EM, Weiss J, Bazhenova L, et al. Effect of Erlotinib Plus Bevacizumab vs Erlotinib Alone on Progression-Free Survival in Patients With Advanced EGFR-Mutant Non–Small Cell Lung Cancer: A Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* [Internet]. 2019 Oct 1;5(10):1448. Available from: </pmc/articles/PMC6692685/>
 62. Saito H, Fukuhara T, Furuya N, Watanabe K, Sugawara S, Iwasawa S, et al. Erlotinib plus bevacizumab versus erlotinib alone in patients with EGFR-positive advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (NEJ026): interim analysis of an open-label, randomised, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019 May 1;20(5):625–35.
 63. Park K, Haura EB, Leighl NB, Mitchell P, Shu CA, Girard N, et al. Amivantamab in egfr exon 20 insertion- mutated non-small-cell lung cancer progressing on platinum chemotherapy: Initial results from the chrysalis phase i study. *J Clin Oncol*. 2021 Oct 20;39(30):3391–402.
 64. FDA grants accelerated approval to mobocertinib for metastatic non-small cell lung cancer with EGFR exon 20 insertion mutations | FDA [Internet]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information->

approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-mobocertinib-metastatic-non-small-cell-lung-cancer-egfr-exon-20

65. Hida T, Nokihara H, Kondo M, Kim YH, Azuma K, Seto T, et al. Alectinib versus crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer (J-ALEX): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet*. 2017 Jul 1;390(10089):29–39.
66. Solomon BJ, Mok T, Kim D-W, Wu Y-L, Nakagawa K, Mekhail T, et al. First-Line Crizotinib versus Chemotherapy in ALK -Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2014 Dec 4;371(23):2167–77.
67. Shaw AT, Bauer TM, de Marinis F, Felip E, Goto Y, Liu G, et al. First-Line Lorlatinib or Crizotinib in Advanced ALK -Positive Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2020 Nov 19;383(21):2018–29.
68. Shaw AT, Ou S-HI, Bang Y-J, Camidge DR, Solomon BJ, Salgia R, et al. Crizotinib in ROS1 -Rearranged Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2014 Nov 20;371(21):1963–71.
69. Drilon A, Siena S, Dziadziuszko R, Barlesi F, Krebs MG, Shaw AT, et al. Entrectinib in ROS1 fusion-positive non-small-cell lung cancer: integrated analysis of three phase 1–2 trials. *Lancet Oncol*. 2020 Feb 1;21(2):261–70.
70. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, DuBois SG, Lassen UN, Demetri GD, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion–Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med*. 2018 Feb 22;378(8):731–9.
71. Drilon A, Oxnard GR, Tan DSW, Loong HHF, Johnson M, Gainor J, et al. Efficacy of Selpercatinib in RET Fusion–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2020 Aug 27;383(9):813–24.
72. Sundstrøm S, Bremnes RM, Kaasa S, Aasebø U, Hatlevoll R, Dahle R, et al. Cisplatin and etoposide regimen is superior to cyclophosphamide, epirubicin, and vincristine regimen in small-cell lung cancer: Results from a randomized phase III trial with 5 years' follow-up. *J Clin Oncol*. 2002 Dec 15;20(24):4665–72.
73. Horn L, Mansfield AS, Szczesna A, Havel L, Krzakowski M, Hochmair MJ, et al. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018 Dec 6;379(23):2220–9.
74. Serrano PI. Carcinogénesis pulmonar. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Facultad de Farmacia Universidad Complutense

Madrid. 2007;Vol 10. Nº1.

75. Warburg O. The metabolism of tumours; investigations from the Kaiser Wilhelm institute for biology, Berlin-Dahlem,. London: Constable & Co. Ltd.; 1930.
76. Sanchez-Cespedes M. Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis. Vol. 40, Lung Cancer. Elsevier Ireland Ltd; 2003. p. 111–21.
77. Tabchi S, Kourie HR, Klastersky J. Concurrent driver mutations/rearrangements in non-small-cell lung cancer. Vol. 29, Current Opinion in Oncology. Lippincott Williams and Wilkins; 2017. p. 118–22.
78. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, et al. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: Guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Patho. J Thorac Oncol. 2013;8(7):823–59.
79. Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated Molecular Testing Guideline for the Selection of Lung Cancer Patients for Treatment With Targeted Tyrosine Kinase Inhibitors: Guideline From the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the . J Mol Diagnostics. 2018 Mar 1;20(2):129–59.
80. Chen R, Manochakian R, James L, Azzouqa AG, Shi H, Zhang Y, et al. Emerging therapeutic agents for advanced non-small cell lung cancer. J Hematol Oncol. 2020;13(1).
81. UpToDate [Internet]. Graphic 111926 Version 2.0. 2021. Available from: <https://www.uptodate-com.sangva.a17.csinet.es/contents/personalized-genotype-directed-therapy-for-advanced-non-small-cell-lung-cancer?search=genotype> lung cancer&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1#H4850292
82. Kawaguchi T, Koh Y, Ando M, Ito N, Takeo S, Adachi H, et al. Prospective analysis of oncogenic driver mutations and environmental factors: Japan molecular epidemiology for lung cancer study. J Clin Oncol [Internet]. 2016

- Jul 1 [cited 2021 Jan 26];34(19):2247–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27161973/>
83. Shi Y, Au JSK, Thongprasert S, Srinivasan S, Tsai CM, Khoa MT, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER). *J Thorac Oncol*. 2014;9(2):154–62.
 84. Merker JD, Oxnard GR, Compton C, Diehn M, Hurley P, Lazar AJ, et al. Circulating tumor DNA analysis in patients with cancer: American society of clinical oncology and college of American pathologists joint review. Vol. 36, *Journal of Clinical Oncology*. American Society of Clinical Oncology; 2018. p. 1631–41.
 85. Bergethon K, Shaw AT, Ou SHI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*. 2012 Mar 10;30(8):863–70.
 86. Kubo T, Yamamoto H, Lockwood WW, Valencia I, Soh J, Peyton M, et al. MET gene amplification or EGFR mutation activate MET in lung cancers untreated with EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Int J Cancer*. 2009 Apr 15;124(8):1778–84.
 87. Bean J, Brennan C, Shih JY, Riely G, Viale A, Wang L, et al. MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 26;104(52):20932–7.
 88. Kohno T, Ichikawa H, Totoki Y, Yasuda K, Hiramoto M, Nammo T, et al. KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med*. 2012 Mar;18(3):375–7.
 89. Wang R, Hu H, Pan Y, Li Y, Ye T, Li C, et al. RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2012 Dec 10;30(35):4352–9.
 90. Yao Z, Torres NM, Tao A, Gao Y, Luo L, Li Q, et al. BRAF Mutants Evade ERK-Dependent Feedback by Different Mechanisms that Determine Their Sensitivity to Pharmacologic Inhibition. *Cancer Cell*. 2015 Sep 14;28(3):370–83.
 91. Kinno T, Tsuta K, Shiraishi K, Mizukami T, Suzuki M, Yoshida A, et al. Clinicopathological features of nonsmall cell lung carcinomas with BRAF

- mutations. *Ann Oncol*. 2014 Jan 1;25(1):138–42.
92. Litvak AM, Paik PK, Woo KM, Sima CS, Hellmann MD, Arcila ME, et al. Clinical characteristics and course of 63 patients with BRAF mutant lung cancers. *J Thorac Oncol*. 2014 Nov 1;9(11):1669–74.
 93. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazieres J, Besse B, Helland Å, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Oct 1;18(10):1307–16.
 94. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893 - PubMed.
 95. Navarro AG, Björklund AT, Chekenya M. Therapeutic potential and challenges of natural killer cells in treatment of solid tumors. Vol. 6, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2015.
 96. Savage PA, Leventhal DS, Malchow S. Shaping the repertoire of tumor-infiltrating effector and regulatory T cells. *Immunol Rev*. 2014;259(1):245–58.
 97. Marvel D, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: Expect the unexpected. Vol. 125, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2015. p. 3356–64.
 98. Bailey SR, Nelson MH, Himes RA, Li Z, Mehrotra S, Paulos CM. Th17 cells in cancer: The ultimate identity crisis. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation; 2014.
 99. Laoui D, van Overmeire E, de Baetselier P, van Ginderachter JA, Raes G. Functional relationship between tumor-associated macrophages and macrophage colony-stimulating factor as contributors to cancer progression. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2014.
 100. Wherry EJ. T cell exhaustion. Vol. 12, *Nature Immunology*. Nat Immunol; 2011. p. 492–9.
 101. Li X, Shao C, Shi Y, Han W. Lessons learned from the blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy Ahmed Tarhini; Timothy Burns; Rahul Parikh; Guarvel Goel; Annie im. Vol. 11, *Journal of Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd.; 2018.
 102. Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, Rickert CG, Uppaluri R, Magrini VJ,

- et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature*. 2012 Feb 16;482(7385):400–4.
103. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Vol. 331, *Science*. Science; 2011. p. 1565–70.
 104. A K Johnsen 1, D J Templeton, M Sy CVH. Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis -. *J Immuno*. 1999;163(8):422.
 105. Amend SR, Pienta KJ. Ecology meets cancer biology: The cancer swamp promotes the lethal cancer phenotype. *Oncotarget*. 2015;6(12):9669–78.
 106. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014 Nov 27;515(7528):568–71.
 107. S A Rosenberg 1, J C Yang, S L Topalian, D J Schwartzentruber, J S Weber, D R Parkinson, C A Seipp, J H Einhorn DEW. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2 -. *JAMA*. 1994;30;271(12).
 108. Yang J, Riella L V., Chock S, Liu T, Zhao X, Yuan X, et al. The Novel Costimulatory Programmed Death Ligand 1/B7.1 Pathway Is Functional in Inhibiting Alloimmune Responses In Vivo. *J Immunol*. 2011 Aug 1;187(3):1113–9.
 109. Walker LSK, Sansom DM. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses. Vol. 11, *Nature Reviews Immunology*. Nat Rev Immunol; 2011. p. 852–63.
 110. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* (80-). 1996 Mar 22;271(5256):1734–6.
 111. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, et al. Pooled analysis of long-term survival data from phase II and phase III trials of ipilimumab in unresectable or metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2015 Jun 10;33(17):1889–94.
 112. Reck M, Ciuleanu T-E, Dols MC, Schenker M, Zurawski B, Menezes J, et al. Nivolumab (NIVO) + ipilimumab (IPI) + 2 cycles of platinum-doublet chemotherapy (chemo) vs 4 cycles chemo as first-line (1L) treatment (tx) for stage IV/recurrent non-small cell lung cancer (NSCLC): CheckMate

- 9LA. *J Clin Oncol*. 2020 May 20;38(15_suppl):9501–9501.
113. Takeda I, Ine S, Killeen N, Ndhlovu LC, Murata K, Satomi S, et al. Distinct Roles for the OX40-OX40 Ligand Interaction in Regulatory and Nonregulatory T Cells. *J Immunol*. 2004 Mar 15;172(6):3580–9.
 114. Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, Schubart A, Sánchez-Fueyo A, Zheng XX, et al. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat Immunol* [Internet]. 2003 Nov;4(11):1102–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14556006/>
 115. Kisielow M, Kisielow J, Capoferri-Sollami G, Karjalainen K. Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells. *Eur J Immunol*. 2005 Jul;35(7):2081–8.
 116. Fan X, Quezada SA, Sepulveda MA, Sharma P, Allison JP. Engagement of the ICOS pathway markedly enhances efficacy of CTLA-4 blockade in cancer immunotherapy. *J Exp Med*. 2014;211(4):715–25.
 117. De Gruijl TD, Janssen AB, Van Beusechem VW. Arming oncolytic viruses to leverage antitumor immunity. Vol. 15, *Expert Opinion on Biological Therapy*. Informa Healthcare; 2015. p. 959–71.
 118. Andtbacka RHI, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, et al. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 1;33(25):2780–8.
 119. Ribas A, Dummer R, Puzanov I, VanderWalde A, Andtbacka RHI, Michielin O, et al. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell*. 2017 Sep 7;170(6):1109–1119.e10.
 120. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med*. 2010 Jul 29;363(5):411–22.
 121. Chen L, Han X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: Past, present, and future. Vol. 125, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2015. p. 3384–91.
 122. Takada K, Toyokawa G, Shoji F, Okamoto T, Maehara Y. The Significance of the PD-L1 Expression in Non–Small-Cell Lung Cancer: Trenchant

- Double Swords as Predictive and Prognostic Markers. *Clin Lung Cancer*. 2018;19(2):120–9.
123. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8(8):793–800.
 124. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2443–54.
 125. Yu H, Boyle TA, Zhou C, Rimm DL, Hirsch FR. PD-L1 expression in lung cancer. Vol. 11, *Journal of Thoracic Oncology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2016. p. 964–75.
 126. Mansfield AS, Dong H. Implications of Programmed Cell Death 1 Ligand 1 Heterogeneity in the Selection of Patients With Non-Small Cell Lung Cancer to Receive Immunotherapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2016 Sep 1;100(3):220–2.
 127. Kim S, Kim MY, Koh J, Go H, Lee DS, Jeon YK, et al. Programmed death-1 ligand 1 and 2 are highly expressed in pleomorphic carcinomas of the lung: Comparison of sarcomatous and carcinomatous areas. *Eur J Cancer*. 2015;51(17):2698–707.
 128. Carbone DP, Reck M, Paz-Ares L, Creelan B, Horn L, Steins M, et al. First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Jun 22 [cited 2020 Apr 19];376(25):2415–26. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1613493>
 129. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med*. 2017 Apr 19;9(1).
 130. André T, Shiu K-K, Kim TW, Jensen BV, Jensen LH, Punt C, et al. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability–High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2020 Dec 3;383(23):2207–18.
 131. Wu Y, Xu J, Du C, Wu Y, Xia D, Lv W, et al. The Predictive Value of Tumor Mutation Burden on Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors in Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. Vol. 9, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
 132. Kim JY, Kronbichler A, Eisenhut M, Hong SH, van der Vliet HJ, Kang J, et

- al. Tumor mutational burden and efficacy of immune checkpoint inhibitors: A systematic review and meta-analysis. *Cancers (Basel)*. 2019 Nov 1;11(11).
133. Goodman AM, Kato S, Bazhenova L, Patel SP, Frampton GM, Miller V, et al. Tumor mutational burden as an independent predictor of response to immunotherapy in diverse cancers. *Mol Cancer Ther*. 2017 Nov 1;16(11):2598–608.
 134. Fernandez EM, Eng K, Beg S, Beltran H, Faltas BM, Mosquera JM, et al. Cancer-Specific Thresholds Adjust for Whole Exome Sequencing–Based Tumor Mutational Burden Distribution. *JCO Precis Oncol*. 2019 Dec;3(3):1–12.
 135. Rizvi H, Sanchez-Vega F, La K, Chatila W, Jonsson P, Halpenny D, et al. Molecular determinants of response to anti-programmed cell death (PD)-1 and anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) blockade in patients with non-small-cell lung cancer profiled with targeted next-generation sequencing. *J Clin Oncol*. 2018 Mar 1;36(7):633–41.
 136. 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 Res*. 2018;7(6):631–8.
 137. Greillier L, Tomasini P, Barlesi F. The clinical utility of tumor mutational burden in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2018;7(6):639–46.
 138. Hellmann MD, Ciuleanu T-E, Pluzanski A, Lee JS, Otterson GA, Audigier-Valette C, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *N Engl J Med*. 2018 May 31;378(22):2093–104.
 139. Donnem T, Kilvaer TK, Andersen S, Richardsen E, Paulsen EE, Hald SM, et al. Strategies for clinical implementation of TNM-Immunoscore in resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol*. 2016 Feb 1;27(2):225–32.
 140. Boscolo A, Fortarezza F, Lunardi F, Comacchio G, Urso L, Frega S, et al. Combined Immunoscore for Prognostic Stratification of Early Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front Oncol*. 2020 Sep 25;10.
 141. Okuma Y, Hosomi Y, Nakahara Y, Watanabe K, Sagawa Y, Homma S. High plasma levels of soluble programmed cell death ligand 1 are prognostic for reduced survival in advanced lung cancer. *Lung Cancer*.

2017 Feb 1;104:1–6.

142. Mitsuhashi A, Okuma Y. Perspective on immune oncology with liquid biopsy, peripheral blood mononuclear cells, and microbiome with non-invasive biomarkers in cancer patients. Vol. 20, *Clinical and Translational Oncology*. Springer-Verlag Italia s.r.l.; 2018. p. 966–74.
143. Liu D, Huang Y, Li L, Song J, Zhang L, Li W. High neutrophil-to-lymphocyte ratios confer poor prognoses in patients with small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2017;17(1):1–8.
144. Nakaya A, Kurata T, Yoshioka H, Takeyasu Y, Niki M, Kibata K, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an early marker of outcomes in patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with nivolumab. *Int J Clin Oncol*. 2018;23:634–40.
145. Suh KJ, Kim SH, Kim YJ, Kim M, Keam B, Kim TM, et al. Post-treatment neutrophil-to-lymphocyte ratio at week 6 is prognostic in patients with advanced non-small cell lung cancers treated with anti-PD-1 antibody. *Cancer Immunol Immunother*. 2018;67(3):459–70.
146. Bagley SJ, Kothari S, Aggarwal C, Bauml JM, Alley EW, Evans TL, et al. Pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio as a marker of outcomes in nivolumab-treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2017;106:1–7.
147. Kamphorst AO, Pillai RN, Yang S, Nasti TH, Akondy RS, Wieland A, et al. Proliferation of PD-1+ CD8 T cells in peripheral blood after PD-1-targeted therapy in lung cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 May 9;114(19):4993–8.
148. Punnoose EA, Atwal S, Liu W, Raja R, Fine BM, Hughes BGM, et al. Evaluation of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in non-small cell lung cancer: Association with clinical endpoints in a phase II clinical trial of pertuzumab and erlotinib. *Clin Cancer Res [Internet]*. 2012 Apr 15 [cited 2020 Apr 17];18(8):2391–401. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22492982>
149. Guibert N, Delaunay M, Lusque A, Boubekour N, Rouquette I, Clermont E, et al. PD-L1 expression in circulating tumor cells of advanced non-small cell lung cancer patients treated with nivolumab. *Lung Cancer*. 2018;120(April):108–12.

150. Nicolazzo C, Raimondi C, Mancini M, Caponnetto S, Gradilone A, Gandini O, et al. Monitoring PD-L1 positive circulating tumor cells in non-small cell lung cancer patients treated with the PD-1 inhibitor Nivolumab. *Sci Rep*. 2016 Aug 24;6.
151. Cabel L, Riva F, Servois V, Livartowski A, Daniel C, Rampanou A, et al. Circulating tumor DNA changes for early monitoring of anti-PD1 immunotherapy: a proof-of-concept study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2020 Apr 17];28(8):1996–2001. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28459943>
152. Lipson EJ, Velculescu VE, Pritchard TS, Sausen M, Pardoll DM, Topalian SL, et al. Circulating tumor DNA analysis as a real-time method for monitoring tumor burden in melanoma patients undergoing treatment with immune checkpoint blockade. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2014 Dec 16 [cited 2020 Apr 17];2(1):42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25516806>
153. Boutsikou E, Domvri K, Hardavella G, Tsiouda D, Zarogoulidis K, Kontakiotis T. Tumour necrosis factor, interferon-gamma and interleukins as predictive markers of antiprogrammed cell-death protein-1 treatment in advanced non-small cell lung cancer: a pragmatic approach in clinical practice. *Ther Adv Med Oncol*. 2018;10:1–8.
154. Tran HT, Liu Y, Zurita AJ, Lin Y, Baker-Neblett KL, Martin AM, et al. Prognostic or predictive plasma cytokines and angiogenic factors for patients treated with pazopanib for metastatic renal-cell cancer: A retrospective analysis of phase 2 and phase 3 trials. *Lancet Oncol*. 2012 Aug;13(8):827–37.
155. Peng XX, Yu RY, Wu X, Wu SY, Pi C, Chen ZH, et al. Correlation of plasma exosomal microRNAs with the efficacy of immunotherapy in EGFR/ALK wild-type advanced non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer*. 2020 Jan 1;8(1).
156. Tak PP, Spaeny-Dekking L, Kraan MC, Breedveld FC, Froelich CJ, Hack CE. The levels of soluble granzyme A and B are elevated in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol*. 1999;116(2):366–70.
157. Alexander JL, Wilson ID, Teare J, Marchesi JR, Nicholson JK, Kinross JM.

- Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity. Vol. 14, Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. Nature Publishing Group; 2017. p. 356–65.
158. Cancer Institute N. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v5.0. 2017.
 159. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009 Jan;45(2):228–47.
 160. Zhao J, Zhang P, Wang J, Xi Q, Zhao X, Ji M, et al. Plasma levels of soluble programmed death ligand-1 may be associated with overall survival in nonsmall cell lung cancer patients receiving thoracic radiotherapy. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2017;96(7). Available from: [/pmc/articles/PMC5319514/](#)
 161. Murakami S, Shibaki R, Matsumoto Y, Yoshida T, Goto Y, Kanda S, et al. Association between serum level soluble programmed cell death ligand 1 and prognosis in patients with non-small cell lung cancer treated with anti-PD-1 antibody. *Thorac Cancer* [Internet]. 2020 Dec 1;11(12):3585. Available from: [/pmc/articles/PMC7705908/](#)
 162. Wei W, Xu B, Wang Y, Wu C, Jiang J, Wu C. Prognostic significance of circulating soluble programmed death ligand-1 in patients with solid tumors. *Med (United States)* [Internet]. 2018 Jan 1;97(3). Available from: https://journals.lww.com/md-journal/Fulltext/2018/01190/Prognostic_significance_of_circulating_soluble.24.aspx
 163. Mazzaschi G, Minari R, Ferri V, Bordi P, Gnetti L, Bersanelli M, et al. Soluble PD-L1 and circulating CD8+PD1+ and NK cells enclose a highly prognostic and predictive immune effector score in immunotherapy treated NSCLC patients. *Ann Oncol* [Internet]. 2020 Sep 1;31:S1092. Available from: <http://www.annalsofoncology.org/article/S0923753420413183/fulltext>
 164. Shen X, Zhao B. Efficacy of PD-1 or PD-L1 inhibitors and PD-L1 expression status in cancer: meta-analysis. *BMJ* [Internet]. 2018 Sep 10;362:3529. Available from: <https://www.bmj.com/content/362/bmj.k3529>

165. Chen XJ, Yuan SQ, Duan JL, Chen YM, Chen S, Wang Y, et al. The Value of PD-L1 Expression in Predicting the Efficacy of Anti-PD-1 or Anti-PD-L1 Therapy in Patients with Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dis Markers* [Internet]. 2020 [cited 2023 Mar 1];2020. Available from: [/pmc/articles/PMC7787798/](#)
166. Hussaini S, Chehade R, Boldt RG, Raphael J, Blanchette P, Maleki Vareki S, et al. Association between immune-related side effects and efficacy and benefit of immune checkpoint inhibitors - A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2021 Jan;92:102134. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33302134/>
167. Ellen Maher V, Fernandes LL, Weinstock C, Tang S, Agarwal S, Brave M, et al. Analysis of the Association Between Adverse Events and Outcome in Patients Receiving a Programmed Death Protein 1 or Programmed Death Ligand 1 Antibody. *J Clin Oncol* [Internet]. 2019;37(30):2730–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31116675/>
168. Wilson RAM, Evans TRJ, Fraser AR, Nibbs RJB. Immune checkpoint inhibitors: new strategies to checkmate cancer. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2018;191(2):133–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29139554/>
169. Mehnert JM, Monjazeb AM, Beerthuijzen JMT, Collyar D, Rubinstein L, Harris LN. The Challenge for Development of Valuable Immuno-oncology Biomarkers. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2017 Sep 1;23(17):4970–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28864725/>
170. Zhang J, Gao J, Li Y, Nie J, Dai L, Hu W, et al. Circulating PD-L1 in NSCLC patients and the correlation between the level of PD-L1 expression and the clinical characteristics. *Thorac Cancer* [Internet]. 2015 Jul 1;6(4):534. Available from: [/pmc/articles/PMC4511334/](#)
171. Costantini A, Julie C, Dumenil C, Hélias-Rodzewicz Z, Tisserand J, Dumoulin J, et al. Predictive role of plasmatic biomarkers in advanced non-small cell lung cancer treated by nivolumab. *Oncoimmunology* [Internet]. 2018 Aug 3;7(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30221046/>

VIII. ANEXOS

1. Dictámenes: Comisión de investigación y Comité Ético de Investigación Clínica.



INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN con medicamentos

Fernando Sánchez-Toril López, secretario del Comité Ético de Investigación con medicamentos, CEIm Hospital Arnau de Vilanova de Valencia,

CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado, en la sesión ordinaria del día 27 de septiembre (acta 11/2017) el estudio EPA-OD, titulado: "Factor soluble de PDL1 en pacientes con carcinoma de pulmón no microcítico avanzado tratados con inhibidores de PD1: determinación de su papel como biomarcador"

Clasificado por la AEMPS con fecha 18 de septiembre de 2017, con código de protocolo: ARN-PDI-2017-01

Protocolo versión: 1 de 1 de septiembre de 2017

HIP/Ci: version 3 de mayo de 2016

Investigador Principal: Javier Garde

Servicio: Oncología

Promotor: Oncología médica del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia

Y tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y no hay riesgos ni molestias para el sujeto.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfieren con el respeto a los postulados éticos.
- Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Orden SAS/3470/2009 y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio.

Es por ello que el Comité **Informa favorablemente** sobre la realización por Dr. Javier Garde en el Servicio de Oncología.

Lo que firmo en Valencia a 27 de septiembre de 2017


Fdo.: Dr. Fernando Sánchez-Toril López
Secretario del CEIm



2. Certificado de concesión de beca de investigación del Grup d'Investigació i Divulgació Oncològica (GIDO).



ACTA DE RESOLUCIÓN DE LA BECA GIDO PROYECTO DE INVESTIGACIÓN 2019

Reunido el Jurado Evaluador de la Beca GIDO Proyecto de Investigación 2019 compuesto por los Doctores José M. Galbis, Leoncio Arribas y María de Julián.

Resuelven por unanimidad, que la Beca GIDO Proyecto de Investigación 2019 se divide entre los tres proyectos presentados con las siguientes cuantías:

1.- CÉLULAS SUPRESORAS DE ORIGEN MIELOIDE CIRCULANTES COMO BIOMARCADORES DE RESPUESTA A LA INMUNOTERAPIA

Presentado por: **Dra. Marta Benet**

Fundación para la Investigación Hospital Universitario La Fe

Beca: 5.000€

2.- VALORACIÓN DEL ESTADO DE INMUNOSENESCENCIA EN PACIENTES ANCIANOS CON CÁNCER DE PULMÓN NO CELULA PEQUEÑA (CPNCP) TRATADOS CON INMUNOTERAPIA EN FUNCIÓN DE SU RESPUESTA.

Presentado por: **Dr. Francisco Aparisi,**

Consortio Hospital General Universitario de Valencia.

Beca: 3.000€

3.- FACTOR SOLUBLE DE PDL1 (sPDL1) EN PACIENTES CON CARCINOMA DE PULMÓN NO MICROCÍTICO AVANZADO TRATADOS CON INHIBIDORES DE PD1/PDL1: DETERMINACIÓN DE SU PAPEL COMO BIOMARCADOR

Presentado por: **Dr Beatriz Honrubia.**

Hospital Universitario Ama de Vilanova.

Beca: 2.000€

Y para que conste a los efectos oportunos se firma el presente documento en Valencia a 8 de marzo de 2019

Dr. Oscar José Juan Vidal
Presidente de GIDO

3. Publicación derivada de la tesis doctoral.

Honrubia-Peris, B.; Garde-Noguera, J.; García-Sánchez, J.; Piera-Molons, N.; Llombart-Cussac, A.; Fernández-Murga, M.L. Soluble Biomarkers with Prognostic and Predictive Value in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Immunotherapy. *Cancers* 2021, 13, 4280. <https://doi.org/10.3390/cancers13174280>

Review

Soluble Biomarkers with Prognostic and Predictive Value in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Immunotherapy

Beatriz Honrubia-Peris [†], Javier Garde-Noguera ^{*}, Jpse Garcia-Sánchez , Nuria Píera-Molons , Antonio Llobart-Cussac and Maria Leonor Fernández-Murga ^{*,†}

Medical Oncology Department, Hospital Arnau de Vilanova, Fundació para el Foment de la Investigació Sanitària i Biomèdica de la Comunitat Valenciana (FISABIO), 46020 Valencia, Spain; honrubia_bea@fyva.es (B.H.-P.); garcia_josanc@fyva.es (J.G.-S.); piera_nur@fyva.es (N.P.-M.); antonio.llobart@mdpi.org (A.L.-C.)

^{*} Correspondence: javier.garde@uchv.es (J.G.-N.); mafefer@uchv.es (M.L.F.-M.)

[†] These authors contributed equally to this paper.



Citation: Honrubia-Peris, B.; Garde-Noguera, J.; Garcia-Sánchez, J.; Píera-Molons, N.; Llobart-Cussac, A.; Fernández-Murga, M.L. Soluble Biomarkers with Prognostic and Predictive Value in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Immunotherapy. *Cancers* 2021, 13, 4280. <https://doi.org/10.3390/cancers13174280>

Academic Editors: Giuseppe Broggi and Lucia Salvendy

Received: 30 June 2021
Accepted: 20 August 2021
Published: 25 August 2021

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



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Immunotherapy, most notably immune checkpoint inhibitors (ICIs), has revolutionized the treatment of advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). Although some patients respond well to ICIs, many patients do not benefit from ICIs, leading to disease progression and/or immune-related adverse events. Biological markers can help to improve patient selection. However, currently available markers such as PD-1 and its ligand (PD-L1) have important limitations. For this reason, new biomarkers obtained by non-invasive methods are urgently needed. In the present review, we describe recent advances in the development of novel soluble biological markers (e.g., circulating immune cells, TMB, circulating tumor cells, circulating tumor DNA, soluble factor PD-L1, tumor necrosis factor, etc.) for patients with NSCLC treated with immunotherapy.

Abstract: Numerous targeted therapies have been evaluated for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). To date, however, only a few agents have shown promising results. Recent advances in cancer immunotherapy, most notably immune checkpoint inhibitors (ICI), have transformed the treatment scenario for these patients. Although some patients respond well to ICIs, many patients do not benefit from ICIs, leading to disease progression and/or immune-related adverse events. New biomarkers capable of reliably predicting response to ICIs are urgently needed to improve patient selection. Currently available biomarkers—including programmed death protein 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1), and tumor mutational burden (TMB)—have major limitations. At present, no well-validated, reliable biomarkers are available. Ideally, these biomarkers would be obtained through less invasive methods such as plasma determination or liquid biopsy. In the present review, we describe recent advances in the development of novel soluble biomarkers (e.g., circulating immune cells, TMB, circulating tumor cells, circulating tumor DNA, soluble factor PD-L1, tumor necrosis factor, etc.) for patients with NSCLC treated with ICIs. We also describe the potential use of these biomarkers as prognostic indicators of treatment response and toxicity.

Keywords: lung cancer; NSCLC; anti-PD-1/PD-L1; soluble biomarkers

1. Introduction

In recent years, the emergence of immune checkpoint inhibitors (ICIs) has increased the life expectancy of patients with advanced lung cancer. However, their introduction into clinical practice has raised many questions with regard to the optimal treatment and delivery sequence of these antibodies [1]. ICIs are humanized monoclonal antibodies that primarily target programmed cell death protein 1 (PD-1), programmed death-ligand 1 (PD-L1), and cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) [1]. PD-L1 is a membrane protein expressed by cancer cells, which binds to PD-1 expressed by lymphocytes

(T cells, B cells and natural killer cells [NK]). The PD-1/PD-L1 axis is a major immune checkpoint control that regulates inhibitory interactions between immune and tumor cells. PD-L1/PD-1 binding inhibits immune cell activity against malignant cells, and PD-L1 expression protects tumor cells from immune attack [2,3]. Anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies block this interaction, thus restoring cytotoxic immune response. However, a substantial percentage of patients will not benefit from ICIs and one of the major challenges for immunotherapy treatment remains patient selection. Although several predictive biomarkers are available, their accuracy is less than optimal.

The best known—and most widely used—predictive biomarker of response to anti-PD-1/PD-L1 treatment is PD-L1 expression, which is assessed by immunohistochemistry (IHC). Indeed, this is the only criterion used to select patients for anti-PD-1/PD-L1 treatment in clinical trials. However, tumor response can occur in patients with low or negative PD-L1 levels on IHC, and a notable proportion of patients with high PD-L1 expression do not benefit from the treatment. In addition, PD-L1 expression is influenced by spatial tumor heterogeneity [4–6] and temporal variation, particularly after chemotherapy [7]. Due to these limitations, there is a clear need to identify more reliable predictors and response biomarkers to improve patient selection in the clinic and in clinical trials.

In order to characterize the tumor microenvironment prior to treatment initiation and to establish the prognosis and predictive fact, sufficient quantities of tissue samples are needed for biomarker analysis. However, this is often challenging due to difficulties in reaching the tumor, small tumor size, and the time required to analyze the sample, all of which can delay treatment initiation. In this regard, these challenges could be overcome through the use of serum biomarkers in peripheral blood. At present, however, no serum biomarkers have yet been validated and approved for use in cancer patients by regulatory bodies in Europe or the United States, despite important recent advances in our technical, genomic, proteomic and metabolic understanding of cancer. Clearly, the availability of peripheral blood biomarkers in routine clinical practice would be invaluable.

In this context, there is a growing interest in identifying serum biomarkers to predict immunotherapy outcomes, which would thus overcome the limitations of tissue-based biopsy [8–10]. Soluble biomarkers (serum or plasma) have numerous theoretical and practical advantages over tissue biopsies, including easier access, less invasiveness, the ability to perform sequential analysis during follow-up, and greater representativeness of the tumor microenvironment. Numerous serum biomarkers are currently under investigation. Among the most promising of these are interleukins (IL), interferon gamma (IFN γ), tumor necrosis factor (TNF) [11], and soluble PD-L1 (sPD-L1) [12]. Serum levels of neutrophils, lymphocytes, and platelets have also been associated with immunotherapy efficacy and patient prognosis [8,13,14]. Other potential serum biomarkers under investigation include circulating tumor cells (CTCs) [15,16], tumor mutational burden (TMB) [17], circulating tumor DNA (ctDNA) [8], soluble Granzyme B [18], microRNA (miRNA) [19], blood microbiome [20], and exosomes [21]. All of these soluble factors can be detected and measured in plasma, which makes them good candidates as predictive biomarkers of immunotherapy (Figure 1 and Table 1).

In the present study, we review recent advances in liquid biopsy to identify potential prognostic and predictive biomarkers of response in patients with advanced NSCLC treated with immunotherapy (Table 1).

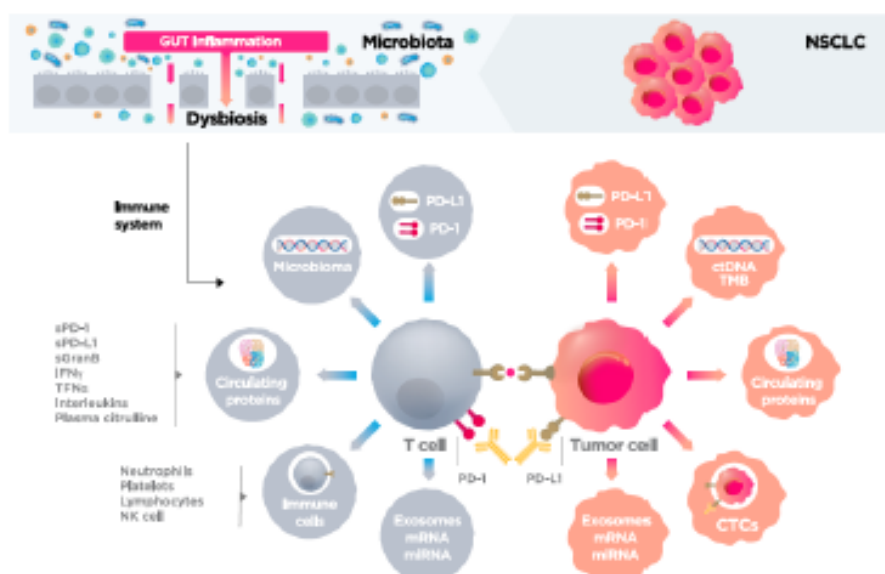


Figure 1. Soluble biomarkers of immune system response to immune therapy.

2. Circulating Immune Cells

Microenvironmental inflammation plays a fundamental role in the carcinogenic process and in the progression of malignant lesions. Inflammation promotes cell proliferation and survival, activates angiogenesis, and reduces response to antitumor agents. Neutrophils and other immune cells such as myeloid-derived suppressor cells and macrophages also secrete factors that promote tumor growth, including TGF- β , VEGF, IL-6, IL-8 (proinflammatory cytokines) [11], and matrix metalloproteinases involved in angiogenesis and metastasis [22] (Table 1 and Figure 1).

Given that these immune cells are the effectors of ICI treatment, it could be advantageous to precisely calculate the numbers of these cells and to perform a detailed analysis of immune system cells present in peripheral blood. Several authors have identified neutrophilia as an inflammatory response capable of inhibiting antitumor immune response due to inactivation of T cells [13,14], which suppresses cytotoxic activity. Platelet activation is stimulated by proinflammatory cytokines and participates in the recruitment of neutrophils [14]. Several studies have found an association between the neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and overall survival (OS), progression-free survival (PFS), and overall response rate (ORR) in patients with advanced NSCLC treated with immunotherapy [13,14,22,23]. The findings of those studies suggest that all of these outcome variables (PFS, OS and ORR) are significantly worse in patients who present higher NLR values and platelet counts at baseline (prior to immunotherapy) and in the 4-to-6-week period following treatment initiation. However, these results must be interpreted cautiously given the limitations of those studies, most of which were small, retrospective studies. In addition, the cut-off points used for the NLR and the platelet rate were highly heterogeneous, thus making it difficult to compare the results. For example, some studies used an NLR of 3 [22,23] whereas others used an NLR of 4 or 5 [13,23].

Lymphocytes play a central role in the antitumor response induced by immunotherapy. Therefore, determination of baseline lymphocyte status is useful to assess immune-competence and to quantify the number of specific pre-existing tumor clones [8]. High lymphocyte and eosinophil counts have been associated with a greater benefit in OS in

patients with advanced melanoma treated with immunotherapy [8]. It is believed that T cells in peripheral blood also reflect the tumor microenvironment and presence of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) [8]. Previous studies have found that neoantigen heterogeneity in tumor tissue intensifies the reactivation of T CD8+ lymphocytes in the tumor and increases the therapeutic action at the immunological control point [24]. Other studies have found that T cell receptors (TCR) that allow for the recognition of a variety of epitopes [25] are extremely similar in PD-L1+ and CD8+ T cells and TILs, indicating that PD-L1 expression in peripheral T cells could be an indicator of the immune status of the tumor tissue [24]. Dronca et al. [26], analyzed peripheral blood levels of Bcl-2-like protein 11 (BIM) in patients with metastatic melanoma. They observed that patients with clinical benefit after four cycles of treatment with immunotherapy presented a higher frequency of Bim+/PD-1+ CD8 T lymphocytes at the beginning of the study compared to patients with disease progression (mean of 60% vs. 49%, $p = 0.04$). In 9/9 responding patients, PD-1+ CD8 T cell BIM levels decreased after the first three months of treatment and increased or did not change in the 5/5 non-responders ($p = 0.003$). Authors conclude that Bim levels in tumor-reactive PD-1+ CD8 T cells may select patients likely to benefit from anti-PD-1 therapy. A recent study found that the TCR diversification in peripheral CD8+ T cells was associated with a better prognosis in patients treated with anti-PD-1 therapies [27]. Another study involving patients with NSCLC treated with anti-PD-1 antibodies, found higher levels of Ki67+, PD-1+ and CD8+ T cells in peripheral blood, especially among responders [28], and this increased the population of T cells that expressed co-stimulatory molecules, such as CD27, CD28 and inducible T cell co-stimulator (ICOS), with CD28 being the main target of PD-1/PD-L1 signaling [8] (Table 1 and Figure 1).

In a very recent study, Anagnostou et al. [29] performed comprehensive genomic and transcriptomic tumor analyses in conjunction with T cell repertoire analyses for 64 advanced melanoma patients treated with ICIs as part of the CheckMate-038 clinical trial (NCT01621490). The authors showed that the tumor mutation burden is associated with improved treatment response; however, the mutation frequency in expressed genes is superior in predicting outcome. Increased T cell density in baseline tumors and dynamic changes in regression or expansion of the T cell repertoire during treatment differentiate responders from non-responders subjects. In addition, transcriptomics studies showed an increased abundance of B cell subsets in tumors from responders and patterns of molecular response associated to expressed mutation elimination or retention that reflect clinical outcome. Furthermore, they showed that CD8+ T cell exhaustion, identified here through TOX expression, could be reversible and lead to a therapeutic effect for ICIs.

In addition, Wu et al. [30] showed clear evidence of clonotypic expansion of effector-like T cells not only within the tumor but also in the surrounding healthy tissue. Subjects with gene signatures of such clonotypic expansion respond best to anti-PD-L1 treatment. Remarkably, expanded clonotypes found in the tumor and in the surrounding healthy tissue can also be detected in peripheral blood, which suggests a suitable approach to patient identification. These results and external datasets suggest that intra-tumoral T cells, mainly in responsive patients, are replenished with fresh, non-exhausted replacement cells from sites outside the tumor, suggesting continued activity of the cancer immunity cycle in these individuals, the acceleration of which may be associated with clinical response.

Interestingly, soft tissue sarcomas represent a heterogeneous group of cancers, with more than 50 histological subtypes. A gene expression study ($n = 608$) of sarcomas has allowed a classification of five subtypes based on immunity from the composition of the tumor microenvironment. Subtype E (high immunity) is characterized by the presence of tertiary lymphoid structures (TLS) containing T cells and follicular dendritic cells and particularly rich in B cells. Group E demonstrated improved survival and a high response rate to PD-1 blockade with pembrolizumab in a phase II clinical trial. This work demonstrates the clinical potential of B-cell-rich ELTs for decision-making and clinical treatments with ICIs, which could have further potential applications in other cancers [31].

Additionally, CD8⁺ T lymphocytes are the main antitumor effector cells. Most cancer immunotherapeutic strategy seeks to increase cytotoxic T lymphocytes (CTL) specific to tumoral cells. The tissue-resident memory T (TRM) cells, a recently identified subpopulation of memory CD8⁺ T cells, persists in peripheral tissues and does not recirculate. TRM cells subpopulation is considered an independent memory T cell lineage with particular transcription factor expression. TRM cells also express high levels of granzyme B, IFN γ and TNF α (see below), a reinforcement of their cytotoxic characteristics. In spontaneous tumor models and engrafted tumors, natural TRM cells or cancer-vaccine-induced TRM directly control tumor growth. In addition, TRM cells predominantly express immune checkpoint receptors such as Tim-3, PD-1 and CTLA-4. Blockade of PD-1 with anti-PD-1 antibodies on TRM cells obtained from human lung cancer promotes cytolytic activity toward autologous tumor cells. Therefore, TRM cells appear to represent relevant factors in tumor immune surveillance. TRM cells induction by immunotherapy strategy may be crucial for the success of these treatments. TRM cells have the following characteristics: (1) contact with tumor cells, (2) predominant expression of immune checkpoint receptors, and (3) recognition of tumor cells, which suggests that they may be involved in the success of ICIs treatment in various cancers [32]. In addition, the baseline presence of tertiary lymphoid structures and their components is correlated with the capacity of cancers to undergo intra-tumoral immune cell reactivation.

Finally, platelets play a fundamental role in systemic and local responses against cancer. They sequester tumor molecules, including RNA and protein transcripts, altering their RNA profiles. After their interaction with the tumor microenvironment, they are called tumor-educated platelets. They transport material from the tumor microenvironment to sites close to the tumor, creating favorable environments for the development of metastases. They contain a rich repertoire of RNA varieties, providing biomolecules for diagnosis and prognostic, predictive or follow-up biomarkers [33].

3. Tumor Mutational Burden

TMB is defined as the number of mutations per megabase (Mb) of DNA [34]. Rizvi et al. observed an association between high TMB and better immunotherapy outcomes in patients with NSCLC [35], potentially due to neoantigens induced by acquired mutations, which increase tumor immunogenicity and thus response to immunotherapy [36]. To date, no association has been observed between TMB and high PD-L1 expression, but this association has been observed in tumors presenting epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations, which could explain the lack of efficacy of immunotherapy in this patient subgroup. By contrast, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) and proto-oncogene BRAF driver mutations are associated with high TMB, with a greater response to immunotherapy [34]. In the CheckMate-227 trial, which compared immunotherapy (nivolumab plus ipilimumab versus nivolumab monotherapy) to first-line chemotherapy in advanced NSCLC, found that OS was better in patients with high TMB (>10 mutations/Mb) [37]. However, an even greater response was observed in patients with high TMB and PD-L1 expression (>50%) compared to patients who presented only a single factor, indicating that TMB may be a good independent biomarker when considered together with PD-L1 expression [36,37]. In a recent meta-analysis, Galvano et al. evaluated patients with advanced NSCLC treated with immunotherapy (eight patient cohorts in five different phase III clinical trials) in which TMB levels (high vs. low in either tissue or blood) was evaluated as a potential biomarker of efficacy. High TMB was associated with better OS in patients treated with immunotherapy versus chemotherapy [38].

Despite the positive results of that meta-analysis, TMB is still not ready for use in routine clinical practice due to its many limitations. For example, the assessment of TMB requires long sequencing panels, which in turn requires large amounts of tumor tissue [36]; by contrast, less tissue is required to analyze the expression of PD-L1 [36]. The major obstacle to implementing TMB as a biomarker in routine clinical practice is the need to standardize the available tests in order to achieve a more homogeneous approach to

measuring TMB levels to ensure comparability among tests. In addition, despite the widespread use of terms such as “low TMB” and “high TMB”, the threshold to define high or low levels has not been clearly established (Table 1 and Figure 1).

Several studies have confirmed that TMB is a potential biomarker for immunotherapy in melanoma [39], lung cancer [40] and urothelial cancer [41]. However, in many patients with advanced cancer, it is simply not possible to obtain sufficient tumor tissue for molecular analysis [17], which explains the interest in identifying less invasive methods to guide immunotherapy, such as the use of circulating tumor DNA to detect TMB, known as blood TMB (bTMB). Gandara et al. [42] found that bTMB was associated with improved PFS outcomes in patients with NSCLC treated with immunotherapy versus chemotherapy; however, more evidence is needed before this approach can be used in clinical practice. Wang et al. [17] examined the correlation between bTMB and TMB in tumor tissue (tTMB) in order to assess the value of bTMB for selecting patients with advanced NSCLC that could benefit from anti-PD-1 and anti-PD-L1 therapies. Those authors found that patients with bTMB levels ≥ 6 obtained significantly better PFS and ORR. That study also showed higher levels of bTMB among responders (Table 1 and Figure 1).

In short, measuring TMB in peripheral blood through ctDNA appears to be a promising strategy to obtain an effective, independent biomarker to estimate response to immunotherapy. However, many questions remain unanswered, including the appropriate panel size and variants to include.

4. Circulating Tumor Cells

CTCs are cells that have escaped from a primary neoplasm and transit in the bloodstream. Their capture and analysis offers new opportunities to better understand the tumor metastasis process, potentially facilitating the development of novel cancer treatments [43]. CTCs can provide complementary data, potentially obviating the need for tumor biopsy [44], from the primary tumor and/or metastatic lesions, thus providing a global representation of the genetic diversity of the tumor [15]. Unlike ctDNA, CTCs can be analyzed at the single cell level, thereby providing real-time data on tumor heterogeneity [15]. Currently, CTCs are being studied in parallel to ctDNA and miRNA as a potential predictive biomarker in different tumors [15]. The isolation of CTCs is challenging due to their rarity (1 cell per 10⁶ or 10⁷ leukocytes in human blood), fragility, and heterogeneity. These characteristics make detection highly difficult. Although multiple technologies have been developed to isolate these cells, the optimal method remains unclear [15]. Punnoose et al. [45] detected EGFR mutations in CTCs and ctDNA, finding that the mutations present in those cells were highly concordant with the mutational state of the tumor tissue. Guibert et al. [16] evaluated whether CTCs could represent a substrate to analyze PD-L1 expression, finding that CTCs expressing PD-L1+ had no correlation with DFS or OS in patients with advanced NSCLC. However, patients with positive PD-L1 expression in CTCs $\geq 1\%$ at baseline were more likely to be non-responders. Importantly, PD-L1 expression was evaluable in 93% of CTC samples, but only 72% of tissue samples due to the limitations of conventional biopsy [16] (Table 1 and Figure 1).

Nicolazzo and colleagues [46] monitored CTCs in patients with advanced NSCLC undergoing immunotherapy (nivolumab) in order to determine whether there was an association between PD-L1 expression in CTCs and response to immunotherapy. Although the small sample size ($n = 10$) impeded an accurate analysis, they found that the presence of PD-L1+ CTCs was associated with progression in a period of 6 months in 50% of the patients, suggesting that PD-L1-positivity in CTCs could be an indicator of resistance to immunotherapy. Nevertheless, those findings must be interpreted cautiously due to the small sample size (Table 1 and Figure 1).

In short, the presence of CTCs is associated with a worse prognosis and a higher risk of early relapse in different types of cancer. Therefore, the study of CTCs could improve our understanding of the molecular biology of tumors and also provide useful information on tumor spread. This strategy may help to identify potentially relevant molecular targets in

order to improve therapeutic management. CTCs could be used to guide sequential therapy with tyrosine kinase inhibitors (TKI) in patients with NSCLC with acquired resistance mutations. Although high levels of CTCs pre-treatment seem to be associated with worse prognosis, current data indicate that PD-L1 expression status in CTCs has no prognostic impact [16,46] (Table 1 and Figure 1).

5. Circulating Tumor DNA

The contribution of ctDNA to the development of next-generation sequencing (NGS) has played an important role in the diagnosis and follow-up of various solid tumors. The clinical application of ctDNA has progressed significantly in melanoma and NSCLC, as the mutational status of oncogenes such as *BRAF* and *EGFR* are important factors in the therapeutic decision [47]. Analysis of ctDNA could predict response to immunotherapy given that treatment efficacy has been associated with TMB [47]. Lipson et al. [48] evaluated the correlation between ctDNA levels and clinical symptoms in melanoma patients treated with immunotherapy. In that study, in which five of the ten patients presented mutations, an increase in ctDNA TMB was associated with tumor progression. In addition, ctDNA monitoring has the potential to be used for the non-invasive detection of these mutations in patients treated with anti-PD-1 antibodies [12] (Table 1 and Figure 1).

6. Soluble Factor of PD-L1 (sPD-L1)

Protein PD-L1 is expressed in transmembrane and soluble forms. Elevated plasma levels of sPD-L1 have been observed in patients with various types of tumors, including lung cancer, lymphoma, hepatocellular carcinoma, and gastric cancer [49].

Based on the findings of the KEYNOTE 024 trial, PD-L1 expression in tumor cells (measured by IHC) was established as a predictive biomarker for immunotherapy in patients with NSCLC. In that trial, patients with PD-L1 expression levels > 50% in tumor cells showed a greater response to pembrolizumab than conventional treatment [50]. By contrast, in the CheckMate-026 trial, first-line nivolumab did not prolong PFS compared to chemotherapy in patients with advanced NSCLC who had PD-L1 expression over 5% [51]. These results suggest that PD-L1 alone is insufficient to assess the efficacy of anti-PD-1/PD-L1 treatments [8]. Moreover, as a biomarker, PD-L1 expression has several important limitations, most notably the lack of consensus regarding the appropriate cut-off point to define the degree of valid expression (1% being the most common threshold level). In addition, tumor heterogeneity and the difficulty in obtaining a sample with conventional biopsy, limit the interpretation of the PD-L1 tumor expression (Table 1 and Figure 1).

Several studies have evaluated the functional role of sPD-L1 in cancer, as this marker could indicate the magnitude of the intrinsic response of T cells in cancer tissues. High levels of sPD-L1 have been associated with worse prognosis; a study in 96 patients with advanced NSCLC found that high sPD-L1 levels (>7.32 ng/mL) were significantly associated with shorter OS (hazard ratio [HR], 1.99; $p = 0.041$) [12]. By contrast, another study reported that sPD-L1 levels were not associated with tumor histology, the presence of driver-mutations, or clinical stage [8].

The available evidence suggests that high levels of sPD-L1 seem to be associated with worse prognosis in patients with advanced NSCLC. However, the prognostic value of sPD-L1 expression remains uncertain. More prospective studies are needed to reliably and reproducibly correlate PD-L1 expression in tumor tissue and plasma.

7. Tumor Necrosis Factor, Interferon Gamma, and Interleukins

Boutsikou et al. described the important role that IFN γ , TNF, and IL play in tumor development [11]. Those authors evaluated IFN γ , TNF and IL levels in peripheral blood at baseline and after three months of anti-PD-1 therapy, finding a significant association between high levels of these cytokines and response rates and OS, but not in PFS. Cytokine levels increased upon initiation of anti-PD-1 treatment but decreased three months later. Furthermore, those authors found that PD-L1 expression was significantly associated with differences in

IFN α levels but not with the other cytokines. However, the potential role of these cytokines as prognostic or predictive biomarkers of response to immunotherapy is not well understood due to a lack of data supporting these preliminary results (Table 1 and Figure 1).

Certain interleukins—including IL-4, IL-1 β and IL-6—are involved in key mechanisms of carcinogenesis and assessment of these interleukins could be a promising strategy in antitumor immune therapy [11]. Most ILs are secreted by CD4+ T lymphocytes, but other cells, including monocytes, macrophages and endothelium, also produce ILs. IL-12 has been shown to interrupt the cell cycle, induce apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells, and change the tumor microenvironment from pro-oncogenic to antitumorogenic by recruiting immune cells, which explains why cytokine concentration levels seem to be associated with PFS [11]. Tran et al. [52] found that high IL-8 concentrations were associated with worse PFS in patients with kidney cancer treated with TKIs. In a large-scale retrospective analysis ($n = 1344$), Schalper et al. [53] demonstrated that elevated baseline serum IL-8 levels are associated with poor outcome in patients with advanced cancers (melanoma, NSCLC, renal cells carcinoma) with nivolumab and/or ipilimumab, everolimus or docetaxel therapy. This study showed the significance of evaluate serum IL-8 levels in identifying unfavorable tumor immunology and as an independent biological marker in subjects receiving ICIs.

8. Other Soluble Biomarkers

8.1. Granzyme B

Granzyme B is a serine protease secreted by cytotoxic CD8+ T cells and NK cells, with an important role in immune response and induced apoptosis. Granzymes are transported to the target cells by cytotoxic granules and are responsible for caspase-dependent apoptosis. High levels of soluble granzyme B have been linked with inflammatory, cardiovascular and atherosclerotic diseases [54–56]. Preclinical studies have found that granzyme B activity can be used as a prognostic factor for response to ICIs [18]. A recent study [57] in 633 patients with cutaneous melanoma showed that granzyme overexpression suppresses cell proliferation and migration but not apoptosis in cutaneous melanoma cell cultures. The authors of that study emphasized the important prognostic value of granzymes in these patients, suggesting that granzymes could also predict anti-PD-1 immunotherapy response, thus potentially allowing for better selection of candidates. A current study of patients ($n = 347$) with stage IV NSCLC treated with nivolumab demonstrated that patients with low granzyme B levels had worse PFS and OS compared to subjects with elevated serum concentrations [58]. Costantini et al. [59] also found that patients who presented a positive response to nivolumab had significantly higher soluble granzyme B levels at the start of nivolumab treatment compared to non-responders. Those authors found a clinical benefit and a trend toward better ORR, OS, and PFS in patients with stable or decreasing concentrations of soluble granzyme B between treatment initiation and the first evaluation. Elevated levels of circulating granzyme B may indicate the presence of an efficient and activated cytotoxic immune cell response, mainly CD8+ cytotoxic cells, which are associated with better response to ICIs [59].

8.2. miRNA

Micro RNA are non-coding RNA fragments (15–25 pb) with biological activity. Its role in solid tumors has been well investigated, with evidence of involvement in tumor suppression and resistance to chemotherapy [60]. It has been suggested that miRNA is involved in immune response regulation and associated with PD-L1 and PD-1 expression, and thus of potential interest for diagnostic and therapeutic purposes. Costantini et al. [59] described the connection between downregulation of circulating miRNA-320b and miRNA-375 expression and immunotherapy response. Studies have shown that miRNA-320b is downregulated in several different tumor types; in NSCLC, this has been associated with carcinogenesis and poor prognosis [61]. Other studies have shown that miRNA-375 is downregulated and associated with poor prognosis in NSCLC [19,62]. Furthermore,

miRNA-375 is closely associated with the cell signaling Wnt/ β -catenin [63] and Hippo pathways [64], both of which have been implicated in immunotherapy resistance [65]. As a result, both miRNA-320b and miRNA-375 appear to be involved in anti-cancer immune response to ICIs.

Several other miRNAs (miRNA-200, miRNA-197, and miRNA-34) have been associated with PD-L1 expression in NSCLC. Fujita et al. suggested that chemoresistance in NSCLC patients with elevated PD-L1 expression may be regulated by miRNA-197 [66]. Gibbons and colleagues found that low expression of miRNA-200 was associated with high PD-L1 expression and suppression of CD8+ cells [67]. In a small study ($n = 20$), Halvorsen et al. [68] identified seven miRNAs (miR-215-5p; miR-411-3p; miR-493-5p; miR-494-3p; miR-495-3p; miR-548j-5p; and miR-93-3p) associated with longer OS in patients with NSCLC treated with nivolumab.

The evaluation of miRNA expression can provide useful data that can be applied to help diagnose NSCLC and estimate the potential value of anti-PD-1/anti-PD-L1 therapy. MicroRNA expression could even be a possible therapeutic target. To date, however, only a few studies have evaluated the correlation between miRNA and response to ICIs. Moreover, due to the limitations of those studies (e.g., small size and heterogeneous analytical techniques), it is not possible to reach any meaningful conclusions regarding the potential role of miRNAs as predictors of response and survival in patients treated with immunotherapy (Table 1).

8.3. Gut Microbiome

Recent studies in animal models have underscored the function of the microbiota in mediating response to chemotherapeutic drugs and immunotherapy (anti-PD-L1 or anti-CTLA-4) [69]. The intestinal microbiota regulate these treatments through critical, well-structured mechanisms involving bacterial translocation, innate immunoregulation, metabolism, enzymatic activity, and decreased variety and ecological diversity (processes known as TIMER). Ouaknine et al. [20] analyzed the influence of the blood microbiome, circulating citrulline (a marker of intestinal barrier function), and early administration of antibiotics on the efficacy of nivolumab in NSCLC. That study incorporated 72 subjects with advanced NSCLC with anti-PD-L1 treatment in a second-line (or subsequent) setting. Patients who received early antibiotics had a worse OS and lower citrulline concentrations than patients not treated with antibiotics. Elevated basal citrulline rates were associated with longer PFS and OS. Those authors also evaluated blood microbiota composition according to tumor response and clinical benefit with anti-PD-L1, finding that *Gemmatimonadaceae* DNA in blood was associated with low response, tumor progression, and worse OS in patients with early antibiotic use. Paradoxically, in patients who did not receive early antibiotics, the microbiome profile was high in *Solibacteres*, which were associated with an improved treatment response compared to patients who received antibiotics. In this clinical setting, plasma citrulline and blood microbiome appear to be promising predictive biomarkers in NSCLC.

In a recent study using mouse models [70], microbial analysis showed that *Parabacteroides distasonis* and *Bacteroides vulgatus* were more prevalent in responders to anti-PD-1 blockade than non-responders. That study also showed that transplantation of fecal material from mice that responded to PD-1 inhibitors to non-responders sensitized response in these mice, thus converting them from non-responders to responders [70]. Takada et al. [73] studied the clinical effect of probiotics in 294 patients with advanced or recurrent NSCLC treated with anti-PD-1 immunotherapy (nivolumab or pembrolizumab monotherapy). PFS—but not OS—was significantly higher in subjects taking probiotics. Univariate analyses revealed that probiotic use was associated with significantly better disease control and overall response. These results suggest the potential value of gut microbiota as a new biomarker for predicting response to anti-PD-1 immunotherapy. Nevertheless, large, prospective studies with more ICI treatment strategies are needed to confirm those findings (Table 1).

Table 1. Potential soluble biomarkers for cancer immunotherapy.

Biomarker	Clinical Relevance	Authors
Circulating immune cells	<ul style="list-style-type: none"> High Treg count associated with longer OS Relative number of CD4+ and CD8+ cells correlate with response and longer OS. Higher PD-L1 expression in peripheral T cells associated with non-response, shorter PFS and OS. NK cells associated with response to PD-1 antibodies. NLR ≥ 3.4 associated with shorter OS and NRL ≥ 2.2 with non-response. Disadvantages: Time-consuming, labor-intensive analysis and high cost 	Mitsuhashi et al. [8] Jiang et al. [22]
Tumoral mutational burden (TMB)	<ul style="list-style-type: none"> TMB defined as the number of mutations per megabase of DNA. ICI treatment: high TMB is associated with high clinical benefit. Good independent biomarker. Disadvantages: <ul style="list-style-type: none"> Requires long panels for sequencing and large amounts of tumor tissue. "Low" vs. "high" TMB not clearly defined. 	Guillier et al. [34] Hellmann et al. [37] Hoske et al. [34]
Circulating tumor cells (CTCs)	<ul style="list-style-type: none"> Cells that have detached from a primary tumor and circulate in the bloodstream. Provide complementary information, thus avoiding the need for tumor biopsy. Presence of CTCs is associated with a worse prognosis and a higher risk of early relapse. Disadvantages: rarity, fragility and heterogeneity. 	Hong et al. [43] Munelo-Romay et al. [44] Pawlikowska et al. [15]
Circulating tumor DNA (ctDNA)	<ul style="list-style-type: none"> ctDNA are short DNA fragments derived from dying cells. Seem to indicate the response to immunotherapy because the efficacy of the treatment depends on TMB. Disadvantages: requires costly next-generation sequencing (NGS). 	Cabel L. et al. [47]
Soluble PD-L1 (sPD-L1)	<ul style="list-style-type: none"> sPD-L1 is expressed in transmembrane and soluble forms. High level of sPD-L1 have associated with worse prognosis. Disadvantages: <ul style="list-style-type: none"> No consensus regarding cut-off point to define valid expression (1% is the most common threshold). Correlation between sPD-L1 expression and the prognostic value remains uncertain. 	Okuma et al. [12] Mitsuhashi et al. [8]
Circulating proteins and cytokines	<ul style="list-style-type: none"> Soluble immune-related biomarkers. Levels of IFNγ, TNF and IL are associated with ICI benefit. Interleukins are involved in key mechanisms of tumorigenesis. High concentrations of IL-8 associated with worse PFS in kidney cancer patients treated with tyrosine kinase inhibitors. Disadvantages: Although the analysis is protocolized, more studies are needed. 	Boubikou et al. [11]
Granzyme B	<ul style="list-style-type: none"> This is a serine protease secreted by NK cells and cytotoxic CD8+ cells. Essential role in immune response induced apoptosis. Elevated circulating levels manifest an efficient and activated cytotoxic immune cell response. Disadvantages: analysis is expensive (ELISA). 	Larimer et al. [18] Costantini et al. [59]
microRNA (miRNA)	<ul style="list-style-type: none"> Non-coding RNA fragments (15–25 pb) with biological activity PD-L1 expression is strictly associated with miRNA function in lung cancer. Implicated in tumor suppression and chemoresistance. Disadvantages: differences in expression levels between healthy individuals and patients are usually tiny. Large sample sizes are necessary to obtain the basal line of potential marker and decide whether it could clearly segregate the health and disease status. Only those who have high sensitivity and specificity in people with different characteristics have the potential for clinical application. The blood sampling methods should be carefully considered for some specific miRNA biomarkers. 	Naidu et al. [60] Chen et al. [62]

Table 1. Cont.

Biomarker	Clinical Relevance	Authors
Microbiota and microbiome	<ul style="list-style-type: none"> The microbiome comprises all genetic material within a given microbiota. The gut microbiome influences the efficacy of PD-1 treatment in epithelial tumors. Blood microbiome composition were determined according to tumor response and clinical benefit with anti-PD-L1. Disadvantages: few studies, larger sample sizes needed for statistical validity, high cost. 	Alexander et al. [69] Huang et al. [70]
Exosomes	<ul style="list-style-type: none"> Class of extracellular vesicles made and released by most cells; contains mRNA, miRNA and proteins. miRNAs in exosomes are more stable than serum miRNAs due to the double-membrane structure. Exosomes can bind to PD-1 on immune cells and thus actively suppress CD8+ lymphocytes. Disadvantages: <ul style="list-style-type: none"> Methods for tumor-derived exosome isolation and separation from human plasma-derived exosomes are not yet established and their role as biomarkers remains unconfirmed. Low purity, specialized equipment required, exosome aggregation. 	Chen G et al. [21] Foggio et al. [71] Del Re M et al. [72]

Abbreviations: OS: overall survival; PFS: progression-free survival; NRL: neutrophil to lymphocyte ratio; ICIs: immune checkpoint inhibitors.

8.4. Exosomes

Exosomes are membrane-bound extracellular vesicles (EV) produced in the endosomal compartment of most eukaryotic cells. EVs can transport functional proteins, mRNA, and miRNA to adjacent cells, allowing them to perform their function as the mediator of cell-to-cell interaction (Table 1 and Figure 1). Cancer cells actively release exosomes into the bloodstream, which are distributed throughout the body and become part of the complex communication system stimulated by the tumor stroma. Exosomes are present in all body fluids and have a potential role in communication between cells and non-invasive cancer biomarkers. Exosomal-PD-L1 is detectable in human plasma and could be an important biomarker. It can bind to PD-1 on immune cells and thus actively suppress CD8+ lymphocytes. Exosomes can also suppress NK cell activity, interfere with monocyte differentiation, and induce differentiation of myeloid precursor cells into myeloid suppressor cells [74]. Therefore, a higher concentration of exosomal PD-L1 before initiation of anti-PD-1 therapy has been associated with worse prognosis in melanoma patients [21,71].

Xiao-Peng et al. found that the type of miRNAs from the exosomes of NSCLC patients are different from those in healthy subjects. Those authors reported that the presence of three miRNAs of the hsa-miR-320 family could be potential indicators of the efficacy of immunotherapy in these patients. Furthermore, hsa-miR-125b-5p could be a target for anti-PD-1 treatment in plasma exosomes of NSCLC patients [75]. Del Re et al. investigated the relationship between PD-L1 mRNA in plasma-derived exosomes and response to nivolumab and pembrolizumab in patients with melanoma and NSCLC. They showed that the exosomal expression of PD-L1 changes during anti-PD-1 treatment. Furthermore, they observed that the concentration of PD-L1 from plasma exosomes decreased significantly in subjects who respond to treatment and, conversely, increased in patients with progressive disease; no relevant changes were observed in individuals with stable disease [72].

Plasma-derived exosomal miRNAs and mRNA may be potential biomarkers for anti-PD-1 treatment in advanced NSCLC. Recently, Guyon et al. [76] reported that exposure to anti-PD-1 in T cells induces enrichment of exosomal miRNA-4315, which promotes an apoptosis-resistance mechanism to standard chemotherapy in cancer cells receiving this miRNA. The authors, also establishing the molecular mechanism, found that apoptosis-resistance is associated with downregulation of a proapoptotic protein (Bim) mediated by miRNA-4315. In a very recent preclinical study, exosomes were purified from two melanoma cell lines to study the immune inhibitory effect of exosomes in vitro mod-

els in patient-donated NY-ESO-1-specific CD8⁺ T cells. Exosomes from both cell lines inhibited the immune response of antigen-specific T cells in a similar manner, as demonstrated by decreased expression of the cytokines IFN- γ and TNF- α . Furthermore, the authors observed that this inhibitory effect could be partly reversed by the presence of anti-PD-L1 and anti-IL-10 antibodies [77]. The authors concluded that the inhibitory capacity of exosomes should be considered in the process of developing therapies that rely on the potency of personalized antigen-specific effector T cells. The application of plasma-derived exosomes in anti-PD-1 immunotherapy has several clinical advantages. First, the soluble exosomes detected in patients are mainly from cancer cells, which can more accurately and dynamically represent the status and function of cells and tumor tissue. Second, miRNAs in exosomes are more stable than miRNAs in blood due to the presence of the protective double membrane. Finally, for the detection of exosomal miRNAs, only one blood sample is needed, avoiding the disadvantages related to the heterogeneity of tumor tissue samples, thereby allowing for adequate monitoring of the disease course during treatment (Table 1).

9. Conclusions

The growing body of evidence points to the enormous potential of immunotherapy, which may one day become a cornerstone treatment for multiple types of cancer. This is why it is so crucial to develop reliable biomarkers (Figure 1). At present, research in this area is still in the early stages. Relatively few clinical studies have been performed, and many are retrospective or have other important limitations. Nevertheless, the future of immuno-oncology is highly promising, and it is expected that numerous novel biomarkers will be discovered in the coming years. Studies conducted to date show that biomarkers can and will play an important role in predicting treatment response and toxicity. Nonetheless, more targeted, prospective studies are needed to validate these biomarkers in clinical practice.

Author Contributions: Concept and design, M.L.E.-M., J.G.-N. and A.L.-C.; writing—original draft preparation, B.H.-P.; writing—review and editing, B.H.-P., M.L.E.-M. and J.G.-N. contributed equally. A.L.-C. contributed as senior author. Critical revision of the manuscript for important intellectual content, J.G.-S., N.P.-M. and A.L.-C. Administrative, technical or material support, all authors. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. Ethical review and approval were waived for this study, since it is a bibliographic review of publications without any intervention by authors.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank Bradley Londres for professional English language editing.

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

References

1. Disis, M.L. Immunologic Biomarkers as Correlates of Clinical Response to Cancer Immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, *60*, 433–442. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Davis, A.A.; Patel, V.G. The Role of PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker: An Analysis of All US Food and Drug Administration (FDA) Approvals of Immune Checkpoint Inhibitors. *J. Immunother. Cancer* **2019**, *7*, 278. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Brahmer, J.; Reckamp, K.L.; Baas, P.; Crino, L.; Eberhardt, W.E.E.; Poddubskaya, E.; Antonia, S.; Puzanski, A.; Vokes, E.E.; Holgado, E.; et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 123–135. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Kim, S.; Kim, M.Y.; Koh, J.; Go, H.; Lee, D.S.; Jeon, Y.K.; Chung, D.H. Programmed Death 1 Ligand 1 and 2 Are Highly Expressed in Pleomorphic Carcinomas of the Lung: Comparison of Sarcomatous and Carcinomatous Areas. *Exp. J. Cancer* **2015**, *51*, 2698–2707. [\[CrossRef\]](#)

5. Mansfield, A.S.; Aubrey, M.C.; Moser, J.C.; Harrington, S.M.; Dronca, R.S.; Park, S.S.; Dong, H. Temporal and Spatial Discordance of Programmed Cell Death-Ligand 1 Expression and Lymphocyte Tumor Infiltration between Paired Primary Lesions and Brain Metastases in Lung Cancer. *Ann. Oncol.* **2016**, *27*, 1953–1958. [\[CrossRef\]](#)
6. Mansfield, A.S.; Dong, H. Implications of Programmed Cell Death 1 Ligand 1 Heterogeneity in the Selection of Patients With Non-Small Cell Lung Cancer to Receive Immunotherapy. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2016**, *100*, 220–222. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Sheng, J.; Fang, W.; Yu, J.; Chen, N.; Zhan, J.; Ma, Y.; Yang, Y.; Yan, H.; Zhao, H.; Zhang, L. Expression of Programmed Death Ligand-1 on Tumor Cells Varies Pre and Post Chemotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 20090. [\[CrossRef\]](#)
8. Mitsuhashi, A.; Okuma, Y. Perspective on Immune Oncology with Liquid Biopsy, Peripheral Blood Mononuclear Cells, and Microbiome with Non-Invasive Biomarkers in Cancer Patients. *Clin. Transl. Oncol.* **2018**, *20*, 966–974. [\[CrossRef\]](#)
9. Li, S.; Zhang, C.; Pang, G.; Wang, P. Emerging Blood-Based Biomarkers for Predicting Response to Checkpoint Immunotherapy in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 2731. [\[CrossRef\]](#)
10. Indini, A.; Rijavec, E.; Grossi, E. Circulating Biomarkers of Response and Toxicity of Immunotherapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A Comprehensive Review. *Cancers* **2021**, *13*, 1794. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Boutsikou, E.; Dourm, K.; Hardavella, G.; Ysiouda, D.; Zarogoulidis, K.; Kontakiotis, Y. Tumour Necrosis Factor, Interferon-Gamma and Interleukins as Predictive Markers of Antiprogrammed Cell-Death Protein-1 Treatment in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Pragmatic Approach in Clinical Practice. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2018**, *10*, 1758835918768238. [\[CrossRef\]](#)
12. Okuma, Y.; Hosomi, Y.; Nakahara, Y.; Watanabe, K.; Sagawa, Y.; Homma, S. High Plasma Levels of Soluble Programmed Cell Death Ligand 1 Are Prognostic for Reduced Survival in Advanced Lung Cancer. *Lung Cancer* **2017**, *104*, 1–6. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Suh, K.J.; Kim, S.H.; Kim, Y.J.; Kim, M.; Keam, B.; Kim, Y.M.; Kim, D.W.; Heo, D.S.; Lee, J.S. Post-Treatment Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio at Week 6 Is Prognostic in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancers Treated with Anti-PD-1 Antibody. *Cancer Immunol. Immunother.* **2018**, *67*, 459–470. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Liu, D.; Huang, Y.; Li, L.; Song, J.; Zhang, L.; Li, W. High Neutrophil-to-Lymphocyte Ratios Confer Poor Prognoses in Patients with Small Cell Lung Cancer. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 1–8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Pawlikowska, P.; Faugereux, V.; Oulhen, M.; Aberlenc, A.; Yuyouan, Y.; Paillet, E.; Farace, E. Circulating Tumor Cells (CTCs) for the Noninvasive Monitoring and Personalization of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Therapies. *J. Thorac. Dis.* **2019**, *11*, S45–S46. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Guibert, N.; Delaunay, M.; Lusque, A.; Boubekrou, N.; Rouquette, L.; Clermont, E.; Mourlanette, J.; Gouin, S.; Dormoy, I.; Favre, G.; et al. PD-L1 Expression in Circulating Tumor Cells of Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Nivolumab. *Lung Cancer* **2018**, *120*, 108–112. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Wang, Z.; Duan, J.; Cai, S.; Han, M.; Dong, H.; Zhao, J.; Zhu, B.; Wang, S.; Zhuo, M.; Sun, J.; et al. Assessment of Blood Tumor Mutational Burden as a Potential Biomarker for Immunotherapy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer with Use of a Next-Generation Sequencing Cancer Gene Panel. *JAMA Oncol.* **2019**, *5*, 696–702. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Larimer, B.M.; Wehrenberg-Klee, E.; Dubois, E.; Mehta, A.; Kalomenis, Y.; Flaherty, K.; Boland, G.; Mahmood, U. Granzyme B PET Imaging as a Predictive Biomarker of Immunotherapy Response. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2318–2327. [\[CrossRef\]](#)
19. Li, Y.; Jiang, Q.; Xia, N.; Yang, H.; Hu, C. Decreased Expression of MicroRNA-375 in Non-small Cell Lung Cancer and Its Clinical Significance. *J. Int. Med. Res.* **2012**, *40*, 1662–1669. [\[CrossRef\]](#)
20. Ouaknine Krief, J.; Helly De Yauriers, P.; Dumenil, C.; Neveu, N.; Dumoulin, J.; Girard, V.; Labreque, S.; Tisserand, J.; Julie, C.; Emile, J.F.; et al. Role of Antibiotic Use, Plasma Citrulline and Blood Microbiome in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Nivolumab. *J. Immunother. Cancer* **2019**, *7*, 176. [\[CrossRef\]](#)
21. Chen, G.; Huang, A.C.; Zhang, W.; Zhang, G.; Wu, M.; Xu, W.; Yu, Z.; Yang, J.; Wang, B.; Sun, H.; et al. Exosomal PD-L1 Contributes to Immunosuppression and Is Associated with Anti-PD-1 Response. *Nature* **2018**, *560*, 382–386. [\[CrossRef\]](#)
22. Jiang, Y.; Qiao, M.; Zhao, C.; Li, X.; Gao, G.; Su, C.; Ren, S.; Zhou, C. Pretreatment Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Is Associated with Outcome of Advanced-Stage Cancer Patients Treated with Immunotherapy: A Meta-Analysis. *Cancer Immunol. Immunother.* **2018**, *67*, 713–727. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Nakaya, A.; Kurata, Y.; Yoshioka, H.; Takayasu, Y.; Niki, M.; Kibata, K.; Satsutani, N.; Ogata, M.; Miyara, Y.; Nomura, S. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio as an Early Marker of Outcomes in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Treated with Nivolumab. *Int. J. Clin. Oncol.* **2018**, *23*, 634–640. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Goodman, A.M.; Kato, S.; Bazhenova, L.; Patel, S.P.; Frampton, G.M.; Miller, V.; Stephens, P.J.; Daniels, G.A.; Kurzrock, R. Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 2598–2608. [\[CrossRef\]](#)
25. Grjatic, S.; Bronte, V.; Brunet, L.R.; Butler, M.O.; Disis, M.L.; Galon, J.; Hakansson, L.G.; Hanks, B.A.; Karanikas, V.; Khleif, S.N.; et al. Identifying Baseline Immune-Related Biomarkers to Predict Clinical Outcome of Immunotherapy. *J. Immunother. Cancer* **2017**, *5*, 1–18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Dronca, R.S.; Markovic, S.; Kottschade, L.A.; McWilliams, R.R.; Block, M.S.; Nevala, W.K.; Thompson, M.A.; Dong, H. Ilm as a Predictive T-Cell Biomarker for Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma (MM). *J. Clin. Oncol.* **2015**, *33*, 9013. [\[CrossRef\]](#)
27. Akyüz, N.; Brandt, A.; Stein, A.; Schliffke, S.; Mährle, Y.; Quidde, J.; Goschlart, E.; Loges, S.; Haack, Y.; Ford, C.Y.; et al. T-Cell Diversification Reflects Antigen Selection in the Blood of Patients on Immune Checkpoint Inhibition and May Be Exploited as Liquid Biopsy Biomarker. *Int. J. Cancer* **2017**, *140*, 2535–2544. [\[CrossRef\]](#)

28. Kamphorst, A.O.; Pillai, R.N.; Yang, S.; Nasti, Y.H.; Akondy, R.S.; Wieland, A.; Sica, G.L.; Yu, K.; Koenig, L.; Patel, N.Y.; et al. Proliferation of PD-1+ CD8 T Cells in Peripheral Blood after PD-1-Targeted Therapy in Lung Cancer Patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 4993–4998. [\[CrossRef\]](#)
29. Valsamo, A.; Daniel, C.B.; Nourshin, N.; James, R.W.; Xiaoshan, M.S.; John, W.S.; Julie, S.; Ysai, H.-L.; Wang, H.; Zineb, B. Integrative Tumor and Immune Cell Multi-Omic Analyses Predict Response to Immune Checkpoint Blockade in Melanoma. *Cell Reports Med.* **2020**, *1*, 100139. [\[CrossRef\]](#)
30. Wu, Y.D.; Madireddi, S.; de Almeida, P.E.; Banchereau, R.; Chen, Y.-J.; Chitka, A.S.; Chiang, E.Y.; Iftikhar, H.; O’Gorman, W.E.; Au-Yang, A.; et al. Peripheral T Cell Expansion Predicts Tumour Infiltration and Clinical Response. *Nature* **2020**, *579*, 274–278. [\[CrossRef\]](#)
31. Petitprez, E.; de Reyniès, A.; Keung, E.Z.; Chen, Y.W.-W.; Sun, C.-M.; Calderaro, J.; Jeng, Y.-M.; Hsiao, L.-P.; Lacroix, L.; Bougouin, A.; et al. B Cells Are Associated with Survival and Immunotherapy Response in Sarcoma. *Nature* **2020**, *577*, 556–560. [\[CrossRef\]](#)
32. Mami-Chouaib, E.; Blanc, C.; Cognac, S.; Hans, S.; Malenica, L.; Granier, C.; Tihy, I.; Yartout, E. Resident Memory T Cells, Critical Components in Tumor Immunology. *J. Immunother. Cancer* **2018**, *6*, 87. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Dong, X.; Ding, S.; Yu, M.; Niu, L.; Xue, L.; Zhao, Y.; Xie, L.; Song, X.; Song, X. Small Nuclear RNAs (U1, U2, U5) in Tumor-Educated Platelets Are Downregulated and Act as Promising Biomarkers in Lung Cancer. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 1627. [\[CrossRef\]](#)
34. Gaillier, L.; Tomasini, P.; Barlesi, F. The Clinical Utility of Tumor Mutational Burden in Non-Small Cell Lung Cancer. *Transl. Lung Cancer Res.* **2018**, *7*, 639–646. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Rizvi, H.; Sanchez-Vega, E.; La, K.; Chaitin, W.; Jonsson, P.; Halperin, D.; Plodkowski, A.; Long, N.; Sauter, J.L.; Rechtman, N.; et al. Molecular Determinants of Response to Anti-Programmed Cell Death (PD)-1 and Anti-Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Blockade in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer Profiled with Targeted next-Generation Sequencing. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, 633–641. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Heslop, 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 Res.* **2018**, *7*, 631–638. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Hellmann, M.D.; Ciuchanu, T.E.; Plazanski, A.; Lee, J.S.; Otterson, G.A.; Audigier-Valette, C.; Minenza, E.; Linardou, H.; Burgers, S.; Salmeron, P.; et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Lung Cancer with a High Tumor Mutational Burden. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 2093–2104. [\[CrossRef\]](#)
38. Galvano, A.; Cristina, V.; Malapelle, U.; Pisapia, P.; Pepe, E.; Barraco, N.; Castiglia, M.; Perez, A.; Rolfo, C.; Troncone, G.; et al. The Prognostic Impact of Tumor Mutational Burden (TMB) in the First-Line Management of Advanced Non-Oncogene Addicted Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC): A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *ESMO Open* **2021**, *6*, 100124. [\[CrossRef\]](#)
39. Snyder, A.; Makarov, V.; Merghoub, Y.; Yuan, J.; Zaretsky, J.M.; Desrichard, A.; Walsh, L.A.; Postow, M.A.; Wong, P.; Ho, Y.S.; et al. Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 2189–2199. [\[CrossRef\]](#)
40. Rizvi, N.A.; Hellmann, M.D.; Snyder, A.; Kristborg, P.; Makarov, V.; Havel, J.J.; Lee, W.; Yuan, J.; Wong, P.; Ho, Y.S.; et al. Mutational Landscape Determines Sensitivity to PD-1 Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer. *Science* **2015**, *348*, 124–128. [\[CrossRef\]](#)
41. Rosenberg, J.E.; Hoffman-Censits, J.; Powles, T.; Van Der Heijden, M.S.; Balar, A.V.; Necchi, A.; Dawson, N.; O’Donnell, P.H.; Balmanoukian, A.; Loriot, Y.; et al. Atezolizumab in Patients with Locally Advanced and Metastatic Urothelial Carcinoma Who Have Progressed Following Treatment with Platinum-Based Chemotherapy: A Single-Arm, Multicentre, Phase 2 Trial. *Lancet* **2016**, *387*, 1909–1920. [\[CrossRef\]](#)
42. Gandara, D.R.; Paul, S.M.; Kowanetz, M.; Schleifman, E.; Zou, W.; Li, Y.; Rittmeyer, A.; Fehrenbacher, L.; Otto, G.; Malbouis, C.; et al. Blood-Based Tumor Mutational Burden as a Predictor of Clinical Benefit in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated with Atezolizumab. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 1441–1448. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Hong, Y.; Fang, F.; Zhang, Q. Circulating Tumor Cell Clusters: What We Know and What We Expect (Review). *Int. J. Oncol.* **2016**, *49*, 2206–2216. [\[CrossRef\]](#)
44. Muinelo-Romay, L.; Vieito, M.; Abalo, A.; Nocelo, M.A.; Barón, E.; Anido, U.; Brozos, E.; Vázquez, F.; Aguirre, S.; Abal, M.; et al. Evaluation of Circulating Tumor Cells and Related Events as Prognostic Factors and Surrogate Biomarkers in Advanced NSCLC Patients Receiving First-Line Systemic Treatment. *Cancers* **2014**, *6*, 153–165. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Punnoose, E.A.; Abual, S.; Liu, W.; Raja, R.; Fine, B.M.; Hughes, B.G.M.; Hicks, R.J.; Hampton, G.M.; Amler, L.C.; Pirzkall, A.; et al. Evaluation of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in Non-Small Cell Lung Cancer: Association with Clinical Endpoints in a Phase II Clinical Trial of Pertuzumab and Erlotinib. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 2391–2401. [\[CrossRef\]](#)
46. Nicolazzo, C.; Raimondi, C.; Mancini, M.; Caponnetto, S.; Gradilone, A.; Gandini, O.; Mastromartino, M.; Del Bene, G.; Prete, A.; Longo, F.; et al. Monitoring PD-L1 Positive Circulating Tumor Cells in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with the PD-1 Inhibitor Nivolumab. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31726. [\[CrossRef\]](#)
47. Cabel, L.; Riva, F.; Servois, V.; Livartowski, A.; Daniel, C.; Rampanova, A.; Lantz, O.; Romano, E.; Milder, M.; Bacher, B.; et al. Circulating Tumor DNA Changes for Early Monitoring of Anti-PD1 Immunotherapy: A Proof-of-Concept Study. *Ann. Oncol.* **2017**, *28*, 1996–2001. [\[CrossRef\]](#)

48. Lipson, E.J.; Velculescu, V.E.; Pritchard, Y.S.; Sausen, M.; Pandolfi, D.M.; Topalian, S.L.; Diaz, L.A. Circulating Tumor DNA Analysis as a Real-Time Method for Monitoring Tumor Burden in Melanoma Patients Undergoing Treatment with Immune Checkpoint Blockade. *J. Immunother. Cancer* **2014**, *2*, 42. [\[CrossRef\]](#)
49. Zhu, X.; Lang, J. Soluble PD-1 and PD-L1: Predictive and Prognostic Significance in Cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 97671–97682. [\[CrossRef\]](#)
50. Reck, M.; Rodríguez-Abreu, D.; Robinson, A.G.; Hui, R.; Csösz, Y.; Fülöp, A.; Gottfried, M.; Peled, N.; Yafreshi, A.; Cuffie, S.; et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 1823–1833. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
51. Carbone, D.P.; Reck, M.; Paz-Ares, L.; Carolan, B.; Horn, L.; Steins, M.; Felip, E.; van den Heuvel, M.M.; Ciuchanu, Y.-E.; Badin, E.; et al. First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 2415–2426. [\[CrossRef\]](#)
52. Tran, H.T.; Liu, Y.; Zurita, A.J.; Lin, Y.; Baker-Nabb, K.L.; Martin, A.M.; Figlin, R.A.; Hutson, T.E.; Sternberg, C.N.; Amado, R.G.; et al. Prognostic or Predictive Plasma Cytokines and Angiogenic Factors for Patients Treated with Pazopanib for Metastatic Renal-Cell Cancer: A Retrospective Analysis of Phase 2 and Phase 3 Trials. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, 827–837. [\[CrossRef\]](#)
53. Schalper, K.A.; Carleton, M.; Zhou, M.; Chen, Y.; Feng, Y.; Huang, S.-P.; Walsh, A.M.; Baxi, V.; Pandya, D.; Baradot, Y.; et al. Elevated Serum Interleukin-8 Is Associated with Enhanced Intratumor Neutrophils and Reduced Clinical Benefit of Immune-Checkpoint Inhibitors. *Nat. Med.* **2020**, *26*, 688–692. [\[CrossRef\]](#)
54. Tak, P.P.; Spaenys-Dekking, L.; Kraan, M.C.; Bræddvold, E.C.; Froelich, C.J.; Hack, C.E. The Levels of Soluble Granzyme A and B Are Elevated in Plasma and Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.* **1999**, *116*, 366–370. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Kondo, H.; Hojo, Y.; Yaura, R.; Nishimura, Y.; Shimizu, H.; Takahashi, N.; Hirose, M.; Ikemoto, Y.; Ohya, K.I.; Katsuki, Y.; et al. Elevation of Plasma Granzyme B Levels after Acute Myocardial Infarction: Correlation with Left Ventricular Remodeling. *Circ. J.* **2009**, *73*, 503–507. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Skjelland, M.; Michelsen, A.E.; Krohg-Sørensen, K.; Yennae, B.; Dahl, A.; Bakke, S.; Brosstad, E.; Damås, J.K.; Russell, D.; Hahvonen, B.; et al. Plasma Levels of Granzyme B Are Increased in Patients with Lipid-Rich Carotid Plaques as Determined by Echogenicity. *Atherosclerosis* **2007**, *195*, e142–e146. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Wu, X.; Wang, X.; Zhao, Y.; Li, K.; Yu, B.; Zhang, J. Granzyme Family Acts as a Predict Biomarker in Cutaneous Melanoma and Indicates More Benefit from Anti-PD-1 Immunotherapy. *Int. J. Med. Sci.* **2021**, *18*, 1657–1669. [\[CrossRef\]](#)
58. Hurkmans, D.P.; Basak, E.A.; Schepers, N.; Oomen-De Hoop, E.; Van Der Leest, C.H.; El Bouazzaoui, S.; Bins, S.; Koolen, S.L.W.; Skjeller, S.; Van Der Veldt, A.A.M.; et al. Granzyme B Is Correlated with Clinical Outcome after PD-1 Blockade in Patients with Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer. *J. Immunother. Cancer* **2020**, *8*, e000586. [\[CrossRef\]](#)
59. Costantini, A.; Julie, C.; Dumenil, C.; Hélias-Rodzewicz, Z.; Ysserand, J.; Dumoulin, J.; Giraud, V.; Labrune, S.; Chinot, Y.; Emile, J.E.; et al. Predictive Role of Plasmatic Biomarkers in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated by Nivolumab. *Oncotarget* **2018**, *9*, e1452581. [\[CrossRef\]](#)
60. Naidu, S.; Garofalo, M. MicroRNAs: An Emerging Paradigm in Lung Cancer Chemoresistance. *Front. Med.* **2015**, *2*, 77. [\[CrossRef\]](#)
61. Borghaei, H.; Paz-Ares, L.; Horn, L.; Spigel, D.R.; Steins, M.; Ready, N.E.; Chow, L.Q.; Vokes, E.E.; Felip, E.; Holgado, E.; et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1627–1639. [\[CrossRef\]](#)
62. Chen, L.J.; Li, X.Y.; Zhao, Y.Q.; Liu, W.J.; Wu, H.J.; Liu, J.; Mu, X.Q.; Wu, H.B. Down-Regulated MicroRNA-375 Expression as a Predictive Biomarker in Non-Small Cell Lung Cancer Brain Metastasis and Its Prognostic Significance. *Pathol. Res. Pract.* **2017**, *213*, 882–888. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Xu, L.; Wen, Y.; Liu, Z.; Xu, F.; Yang, L.; Liu, J.; Feng, G.; An, G. MicroRNA-375 Suppresses Human Colorectal Cancer Metastasis by Targeting Frizzled 8. *Oncotarget* **2016**, *7*, 40644–40656. [\[CrossRef\]](#)
64. Shao, Y.; Gong, Y.; Gu, W.; Huang, J.; Ning, Z.; Pei, H. Prognostic Significance of MicroRNA-375 Downregulation in Solid Tumors: A Meta-Analysis. *Dis. Markers* **2014**, *2014*, 626185. [\[CrossRef\]](#)
65. Hu, Y.; Wang, L.; Gu, J.; Qu, K.; Wang, Y. Identification of MicroRNA Differentially Expressed in Three Subtypes of Non-Small Cell Lung Cancer and in Silico Functional Analysis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 74554–74566. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Fujita, Y.; Yagishita, S.; Hagiwara, K.; Yoshioka, Y.; Kosaka, N.; Takeshita, E.; Fujiwara, Y.; Yata, K.; Nishihara, H.; Yamura, T.; et al. The Clinical Relevance of the MiR-197/CKS1B/STAT3-Mediated PD-L1 Network in Chemoresistant Non-Small-Cell Lung Cancer. *Mol. Ther.* **2015**, *23*, 717–727. [\[CrossRef\]](#)
67. Gibbons, D.L.; Chen, L.; Goswami, S.; Cortez, M.A.; Ahn, Y.-H.; Byers, L.A.; Lin, W.; Diao, L.; Wang, J.; Roybal, J.; et al. Regulation of Tumor Cell PD-L1 Expression by MicroRNA-200 and Control of Lung Cancer Metastasis. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 8063. [\[CrossRef\]](#)
68. Hahvonen, A.R.; Sandhu, V.; Spranklen, M.; Flote, V.G.; Kure, E.H.; Brustugun, O.T.; Helland, A. Circulating MicroRNAs Associated with Prolonged Overall Survival in Lung Cancer Patients Treated with Nivolumab. *Acta Oncol.* **2018**, *57*, 1225–1231. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Alexander, J.L.; Wilson, L.D.; Yeare, J.; Marchesi, J.R.; Nicholson, J.K.; Kinross, J.M. Gut Microbiota Modulation of Chemotherapy Efficacy and Toxicity. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 356–368. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

70. Huang, J.; Liu, D.; Wang, Y.; Liu, L.; Li, J.; Yuan, J.; Jiang, Z.; Jiang, Z.; Hsiao, W.L.W.; Liu, H.; et al. Ginseng Polysaccharides Alter the Gut Microbiota and Kynurenine/Tryptophan Ratio, Potentiating the Antitumor Effect of Anti-programmed Cell Death 1/Programmed Cell Death Ligand 1 (Anti-PD-1/PD-L1) Immunotherapy. *Gut* **2021**, *32*, 1031. [\[CrossRef\]](#)
71. Poggio, M.; Hu, T.; Pai, C.C.; Chu, B.; Belait, C.D.; Chang, A.; Montabana, E.; Lang, U.E.; Fu, Q.; Fong, L.; et al. Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-Tumor Immunity and Memory. *Cell* **2019**, *177*, 414–427.e13. [\[CrossRef\]](#)
72. Del Re, M.; Marconcini, R.; Pasquini, G.; Rofi, E.; Vivaldi, C.; Bloise, E.; Restante, G.; Arrigoni, E.; Caparello, C.; Grazia Bianco, M.; et al. PD-L1 mRNA Expression in Plasma-Derived Exosomes Is Associated with Response to Anti-PD-1 Antibodies in Melanoma and NSCLC. *Br. J. Cancer* **2018**, *118*, 820–824. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Yakada, K.; Shimokawa, M.; Yakamori, S.; Shimamatsu, S.; Hirai, E.; Tagawa, Y.; Okamoto, Y.; Hamatake, M.; Tsuchiya-Kawano, Y.; Otsubo, K.; et al. Clinical Impact of Probiotics on the Efficacy of Anti-PD-1 Monotherapy in Patients with Nonsmall Cell Lung Cancer: A Multicenter Retrospective Survival Analysis Study with Inverse Probability of Treatment Weighting. *Int. J. Cancer* **2021**, *149*, 473–482. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Whiteside, T.L. Exosomes and Tumor-Mediated Immune Suppression. *J. Clin. Investig.* **2016**, *126*, 1216–1223. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Peng, X.X.; Yu, R.Y.; Wu, X.; Wu, S.Y.; Pi, C.; Chen, Z.H.; Zhang, X.C.; Gao, C.Y.; Shao, Y.W.; Liu, L.; et al. Correlation of Plasma Exosomal MicroRNAs with the Efficacy of Immunotherapy in EGFR/ALK Wild-Type Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J. Immunother. Cancer* **2020**, *8*, e000376. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Guyon, N.; Garnier, D.; Briand, J.; Nadaradjane, A.; Bougnas-Cartron, G.; Raimbourg, J.; Campone, M.; Heymann, D.; Vallette, E.M.; Frenel, J.S.; et al. Anti-PD1 Therapy Induces Lymphocyte-Derived Exosomal MiRNA-4315 Release Inhibiting Bim-Mediated Apoptosis of Tumor Cells. *Cell Death Dis.* **2020**, *11*, 1048. [\[CrossRef\]](#)
77. Shu, S.L.; Matsuzaki, J.; Wang, M.Y.; Conway, A.; Benjamin-Davalos, S.; Allen, C.L.; Koroleva, M.; Battaglia, S.; Odunsi, A.; Minderman, H.; et al. An Immunosuppressive Effect of Melanoma-Derived Exosomes on NY-ESO-1 Antigen-Specific Human CD8+ T Cells Is Dependent on IL-10 and Independent of BRAFV600E Mutation in Melanoma Cell Lines. *Immunol. Investig.* **2020**, *49*, 744–757. [\[CrossRef\]](#)