

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

ANÁLISIS DEL IMPACTO EN LA SOBREVIVENCIA GLOBAL Y LIBRE DE PROGRESIÓN EN PACIENTES CON DIFERENTES TIPOS TUMORALES TRATADOS CON INMUNOTERAPIAS

Alves da Quinta, Daniela Belén – LU: 1078207

Licenciatura en Biotecnología
Licenciatura en Bioinformática

Tutor:

**Girotti, María Romina
Fundación UADE**

**Laboratorio de Inmuno-Oncología Traslacional (IBYME) - 2016-2021
IQVIA – 2021-Presente**

Co-Tutores:

**Veigas, Florencia
Fundación UADE**

Laboratorio de Inmuno-Oncología Traslacional (IBYME)

**Mahmoud, Yamil Damián
Fundación UADE**

Laboratorio de Inmuno-Oncología Traslacional (IBYME)

2021



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Índice

| | |
|--|----|
| Agradecimientos | 10 |
| Resumen | 11 |
| Abstract | 13 |
| 1. Introducción | 15 |
| 1.1. Generalidades del cáncer | 15 |
| 1.1.1. Clasificaciones | 16 |
| 1.1.2. Estadificación | 17 |
| 1.2. Tratamientos para el cáncer | 17 |
| 1.2.1. Inmunoterapias | 19 |
| 1.2.1.1. Tipos de inmunoterapias | 19 |
| 1.2.1.2. Inhibidores de puntos de control inmunológico | 21 |
| 1.2.1.2.1. <i>Fundamentos y mecanismo de acción</i> | 21 |
| 1.2.1.2.2. <i>Fármacos aprobados por la FDA</i> | 23 |
| 1.2.1.2.3. <i>Efectos adversos</i> | 24 |
| 1.3. Actualidad, incidencia del cáncer y medicina de precisión | 24 |
| 1.4. Generalidades del melanoma | 26 |
| 1.4.1. Incidencia a nivel global, origen y factores de riesgo | 26 |
| 1.4.2. Bases moleculares del melanoma | 27 |
| 1.4.2.1. Modelo de Clark | 27 |
| 1.4.2.2. Nevo displásico | 29 |
| 1.4.2.3. Diferenciación de melanocitos y su relación con el melanoma | 30 |
| 1.4.2.4. Adhesión celular, invasión y metástasis | 30 |
| 1.4.3. Carga mutacional y efecto de la radiación UV | 32 |
| 1.4.4. Relación entre el sistema inmune y el microambiente tumoral | 33 |
| 1.4.4.1. Sistema inmune y melanoma | 33 |
| 1.4.4.2. Microambiente tumoral | 36 |
| 1.4.5. Inmunoterapias en melanoma | 37 |
| 1.4.5.1. Combinación de terapias | 37 |
| 1.4.5.2. Biomarcadores predictivos de respuesta en melanoma | 39 |
| 1.4.5.2.1. <i>Biomarcadores intrínsecos del tumor</i> | 39 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1.4.5.2.1.1. | Neontígenos y Carga Mutacional Tumoral..... | 39 |
| 1.4.5.2.1.2. | Exclusión e inestabilidad de células T..... | 40 |
| 1.4.5.2.1.3. | Tamaño del tumor..... | 40 |
| 1.4.5.2.2. | <i>Biomarcadores del TME</i> | 41 |
| 1.4.5.2.2.1. | PD-L1..... | 41 |
| 1.4.5.2.2.2. | Moléculas de superficie celular..... | 41 |
| 1.4.5.2.2.3. | Linfocitos infiltrantes del tumor..... | 42 |
| 1.4.5.2.2.4. | Células supresoras derivadas de mieloides (MDSC)..... | 43 |
| 1.4.5.2.2.5. | MHC-I y II..... | 43 |
| 1.4.5.2.2.6. | Índice citolítico..... | 44 |
| 1.4.5.2.2.7. | Metabolismo inmunológico..... | 44 |
| 1.4.5.2.3. | <i>Biomarcadores del huésped</i> | 44 |
| 1.4.5.2.3.1. | Microbioma intestinal..... | 44 |
| 1.4.5.2.3.2. | Marcadores de sangre periférica..... | 45 |
| 1.4.6. | Terapias dirigidas en melanoma..... | 45 |
| 1.4.6.1. | Resistencia a terapias dirigidas..... | 46 |
| 1.5. | Generalidades del cáncer colorrectal | 47 |
| 1.5.1. | Incidencia a nivel global, origen y factores de riesgo..... | 47 |
| 1.5.2. | Bases moleculares del cáncer colorrectal..... | 48 |
| 1.5.2.1. | Inestabilidad genómica..... | 48 |
| 1.5.2.1.1. | <i>Inestabilidad cromosómica</i> | 48 |
| 1.5.2.1.2. | <i>Defectos en la maquinaria de reparación del ADN</i> | 50 |
| 1.5.2.1.3. | <i>Hipermetilación del ADN</i> | 52 |
| 1.5.2.2. | Inactivación de genes supresores tumorales mediada por mutaciones..... | 53 |
| 1.5.2.2.1. | <i>APC</i> | 53 |
| 1.5.2.2.2. | <i>TP53</i> | 53 |
| 1.5.2.2.3. | <i>Vía supresora tumoral de TGF-β</i> | 54 |
| 1.5.2.3. | Activación de vías oncogénicas..... | 54 |
| 1.5.2.3.1. | <i>RAS y BRAF</i> | 54 |
| 1.5.2.3.2. | <i>PI3K</i> | 54 |
| 1.5.2.4. | Vías de factores de crecimiento..... | 55 |

| | | |
|------------|--|----|
| 1.5.2.4.1. | <i>Regulación de la señalización de prostaglandinas</i> | 55 |
| 1.5.2.4.2. | <i>Receptor del factor de crecimiento epidérmico</i> | 55 |
| 1.5.2.4.3. | <i>Factor de crecimiento vascular endotelial</i> | 55 |
| 1.5.3. | Sistema inmune y cáncer colorrectal | 56 |
| 1.5.3.1. | Subtipos moleculares consenso de cáncer colorrectal (CMS) | 56 |
| 1.5.3.2. | Infiltrado inmune en la metástasis del CRC | 59 |
| 1.5.4. | Inmunoterapias en cáncer colorrectal | 59 |
| 1.5.4.1. | Biomarcadores predictivos de respuesta en cáncer colorrectal | 59 |
| 1.5.4.1.1. | <i>dMMR–MSI-H y pMMR–MSI-L</i> | 59 |
| 1.5.4.1.2. | <i>Neoantígenos y Carga Mutacional Tumoral</i> | 60 |
| 1.5.4.1.3. | <i>Mutaciones en POLE</i> | 60 |
| 1.5.4.1.4. | <i>Biomarcadores relacionados a los CMS</i> | 61 |
| 1.5.4.1.5. | <i>Otros biomarcadores para anti-PD-1</i> | 61 |
| 1.6. | Ensayos clínicos | 62 |
| 1.6.1. | Factores de estratificación | 62 |
| 1.6.1.1. | La edad | 62 |
| 1.6.1.1.1. | <i>Fundamentos y criterios para estratificación de pacientes</i> | 62 |
| 1.6.1.1.2. | <i>Representación de adultos mayores en ensayos clínicos oncológicos</i> | 64 |
| 1.6.2. | Medidas tradicionales de variables de eficacia (<i>clinical endpoints</i>) | 65 |
| 1.7. | Transcriptómica y cáncer | 66 |
| 1.7.1. | Introducción a la transcriptómica | 66 |
| 1.7.2. | Secuenciación transcriptómica | 67 |
| 1.7.2.1. | RNA-seq | 67 |
| 1.7.2.2. | scRNA-seq | 67 |
| 1.7.3. | La aplicación de la transcriptómica en cáncer | 68 |
| 1.7.4. | Herramientas computacionales para el estudio transcriptómico del cáncer | 69 |
| 1.7.4.1. | Análisis de expresión genética | 69 |
| 1.7.4.2. | Análisis funcionales | 70 |
| 1.7.4.3. | Análisis de inferencia de actividad | 71 |
| 1.7.4.4. | Análisis del TME | 71 |
| 1.7.5. | Transcriptómica y medicina personalizada | 73 |

| | |
|---|----|
| 2. Objetivos | 74 |
| 2.1. Objetivo General | 74 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 74 |
| 3. Hipótesis | 76 |
| 4. Materiales y Métodos | 77 |
| 4.1. Recolección de datos: ensayos clínicos y pacientes individuales | 77 |
| 4.1.1. Ensayos clínicos | 77 |
| 4.1.2. Datos de pacientes a nivel individual | 78 |
| 4.2. Programas y algoritmos para el análisis bioinformático | 79 |
| 4.3. Análisis de los ensayos clínicos | 80 |
| 4.4. Análisis de sobrevida | 81 |
| 4.5. Análisis del infiltrado inmune por RNA-seq y scRNA-seq | 81 |
| 4.6. Expresión diferencial en el <i>bulk</i> y célula única, y análisis funcionales | 81 |
| 4.7. Líneas Celulares | 82 |
| 4.8. Inmunodetección de proteínas por <i>Western blot</i> | 82 |
| 4.8.1. Obtención de extractos celulares | 82 |
| 4.8.2. Cuantificación de proteínas | 82 |
| 4.8.3. Preparación de las muestras para Electroforesis en gel | 83 |
| 4.8.4. Geles de poliacrilamida y <i>Western blot</i> | 83 |
| 4.9. PCR cuantitativa de transcripción reversa en tiempo real (RT-qPCR) | 84 |
| 4.9.1. Purificación de ARN total | 84 |
| 4.9.2. Retrotranscripción (RT) | 84 |
| 4.9.3. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) | 84 |
| 4.10. Estadística | 85 |
| 5. Resultados | 86 |
| 5.1. Resultados obtenidos en laboratorio de mesada (<i>wet-lab</i>) | 86 |
| 5.1.1. Evaluación de la resistencia a terapias dirigidas y niveles de Galectina-1 en líneas celulares de melanoma humanas y murinas | 86 |
| 5.2. Análisis en ensayos clínicos para evaluar la asociación de variables clínicas con la sobrevida global y libre de progresión en pacientes con cáncer tratados con inmunoterapias | 88 |
| 5.2.1. Evaluación de la edad como variable clínica de respuesta a terapias en cancer | 89 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 5.2.2. | Evaluación del tabaquismo como variable clínica de respuesta a terapias en cancer | 95 |
| 5.2.3. | Evaluación del sitio metastásico como variable clínica de respuesta a terapias en cancer | 98 |
| 5.3. | Análisis genómico, transcriptómico y de sobrevida utilizando datos individuales de pacientes con cáncer tratados con inmunoterapias para evaluar su asociación con variables clínicas | 99 |
| 5.3.1. | Asociación de la sobrevida global y variables clínicas disponibles de pacientes con diferentes tipos tumorales tratados con anti PD-1, anti CTLA-4 o la combinación de estos. | 100 |
| 5.3.1.1. | Evaluación de la edad como variable clínica de respuesta a inhibidores de punto de control inmunológico en cáncer | 100 |
| 5.3.1.1.1. | <i>Análisis de sobrevida del punto de corte más utilizado en ensayos clínicos para estratificar a los pacientes: 65 años</i> | 100 |
| 5.3.1.1.1.1. | Análisis de biomarcadores pronóstico para pacientes con HNSCC y CRC menores y mayores a 65 años. | 103 |
| 5.3.1.1.2. | <i>Búsqueda de punto de corte óptimo para la edad en diferentes tipos de cáncer distinguiendo por terapia, considerando la sobrevida global de los pacientes.</i> | 104 |
| 5.3.1.1.2.1. | Análisis de biomarcadores pronóstico de la cohorte de descubrimiento para CRC tratado con anti PD-1/PD-L1 considerando los puntos de corte de edad significativos. | 105 |
| 5.3.1.1.2.2. | Validación, a través de biomarcadores predictivos establecidos, del uso de 61 años como punto de corte predictivo de edad para recibir anti PD-1/PD-L1 en CRC. | 106 |
| A. | Carga mutacional tumoral (TMB) y mutaciones somáticas pre-tratamiento en pacientes menores y mayores a 61 años con CRC. | 106 |
| B. | Infiltrado inmune pre-tratamiento en pacientes menores y mayores a 61 años con CRC. | 108 |
| 5.3.1.2. | Evaluación del sitio metastásico como variable clínica de respuesta a inhibidores de punto de control inmunológico en cáncer | 109 |
| 5.3.1.2.1. | <i>Análisis de biomarcadores pronóstico de acuerdo a los sitios metastásicos en cáncer de vejiga tratados con anti PD-1/PD-L1, y melanoma tratados con anti PD-1/PD-L1 o anti CTLA-4</i> | 113 |
| 5.3.2. | Asociación de la sobrevida libre de progresión y variables clínicas disponibles de pacientes con diferentes tipos tumorales tratados con anti PD-1, anti CTLA-4 o la combinación de estos. | 115 |

| | | |
|--------------|--|-----|
| 5.3.2.1. | Evaluación de la edad como variable clínica de respuesta a inhibidores de punto de control inmunológico en cáncer | 115 |
| 5.3.2.1.1. | <i>Búsqueda de punto de corte óptimo para la edad en diferentes tipos de cáncer distinguiendo por terapia, considerando la supervivencia libre de progresión de los pacientes.</i> | 115 |
| 5.3.2.1.1.1. | Análisis de biomarcadores predictivos y pronóstico de la cohorte de descubrimiento de melanoma tratado con anti PD-1+CTLA-4 utilizando como punto de corte de edad 62 años..... | 119 |
| A. | Expresión diferencial de genes e infiltrado inmune pre y post-tratamiento en pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma. | 120 |
| B. | Análisis funcionales de genes utilizando GSEA, DoRoThEA y PROGENy en biopsias pre-tratamiento de pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma. | 122 |
| 5.3.2.1.1.2. | Validación, a través de biomarcadores predictivos establecidos, del uso de 62 años como punto de corte predictivo de edad para recibir anti PD-1+CTLA-4 en melanoma. | 125 |
| A. | Mutaciones somáticas y TMB pre y post-tratamiento en pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma. | 125 |
| B. | Infiltrado inmune pre-tratamiento en pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma. | 126 |
| C. | Expresión diferencial de genes y análisis funcional de genes utilizando GSEA, DoRoThEA y PROGENy en biopsias de pacientes pre-tratamiento menores y mayores a 62 años con melanoma. | 128 |
| D. | Análisis de carga de neoantígenos, TMB y LDH en pacientes pre-tratamiento menores y mayores a 62 años con melanoma. | 130 |
| 5.3.2.1.1.3. | Análisis del microambiente tumoral mediante scRNA-seq en biopsias de pacientes pre-tratamiento menores y mayores a 62 años con melanoma. | 131 |
| A. | Expresión diferencial de genes en cada grupo de células inmunes que componen el TME de biopsias de pacientes pre-tratamiento menores y mayores a 62 años con melanoma..... | 136 |
| 5.3.2.1.1.4. | Comparación de la supervivencia libre de progresión entre inhibidores de punto de control inmunológico en pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma | 145 |
| 5.3.2.2. | Evaluación de tabaquismo como variable clínica de respuesta a inhibidores de punto de control inmunológico en NSCLC | 147 |
| 6. | Discusión | 148 |

| | |
|--|-----|
| 6.1. Resistencia a terapias dirigidas y niveles de Galectina-1 en líneas celulares de melanoma humanas y murinas | 148 |
| 6.2. Interpretación e importancia de los reportes en ensayos clínicos | 148 |
| 6.3. ¿Son los 65 años de edad un punto de corte óptimo para estratificar a los pacientes? | 149 |
| 6.4. La sobrevida global en mCRC se encuentra beneficiada en los mayores a 61 años de edad tratados con anti PD-1/PD-L1 | 150 |
| 6.5. La sobrevida global es mayor en melanoma estadio III tratado con monoterapia de ICI pero no con la combinación de éstos | 151 |
| 6.6. La sobrevida libre de progresión en melanoma metastásico se encuentra beneficiada en los mayores a 62 años tratados con la combinación de ICI | 154 |
| 6.6.1. El rol del infiltrado inmune y vías de señalización enriquecidas previo al tratamiento en pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma metastásico | 155 |
| 6.6.1.1. Los pacientes con melanoma mayores a 62 años presentan un infiltrado inmune enriquecido en células candidatas para recibir la terapia anti PD-1+CTLA-4 155 | |
| 6.6.1.2. Los genes expresados en cada población celular inmune explicarían la respuesta a anti PD-1 y anti PD-1+CTLA-4 de pacientes con melanoma menores y mayores a 62 años, respectivamente | 158 |
| 6.6.1.3. La actividad de la vía NF-κB se encuentra incrementada en los pacientes mayores a 62 años con melanoma | 161 |
| 6.6.2. El rol de los biomarcadores predictivos y pronósticos intrínsecos del tumor en pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma metastásico | 163 |
| 6.6.2.1. NF1-mut previo y BRCA2-mut posterior a anti PD-1+CTLA-4 se encuentran presentes en los pacientes con melanoma mayores a 62 años | 163 |
| 6.6.2.2. La carga mutacional tumoral (TMB) y la carga de neoantígenos se encuentra incrementada en los pacientes mayores a 62 años con melanoma previo al tratamiento 164 | |
| 6.6.3. Los niveles de la enzima LDH previo al tratamiento son superiores en los pacientes con melanoma menores a 62 años que en los mayores a este punto de corte. .. | 165 |
| 6.7. La importancia de los efectos adversos en los pacientes luego del tratamiento con inhibidores de punto de control inmunológico | 165 |
| 7. Conclusiones | 167 |
| 8. Perspectivas Futuras | 174 |
| 9. Bibliografía | 177 |

Agradecimientos

A mis papás, Sandra y Leo, por su amor infinito, su apoyo incondicional, su paciencia eterna, por ser el mejor ejemplo a seguir en todo ámbito, por absolutamente todo.

A Romi, por darme la oportunidad de ser parte de su laboratorio, por guiarme en este trayecto, por aconsejarme, por su dedicación y tiempo, por dirigir y permitirme hacer esta tesina, por estar siempre pendiente.

A Fede, por transmitir esa enorme pasión por la ciencia, por estar siempre que necesité un consejo, por ser un gran Director de Carrera.

A mi familia y amigos de toda la vida, en especial a Ro, por acompañarme en todo momento, por entender mis *hoy no, tengo que estudiar*, simplemente por estar.

A Flor, Yami y Joaco, por ayudarme siempre que lo necesité, por estar presentes en el desarrollo de esta tesina desde el primer momento que entré al laboratorio.

A mis amigos y compañeros de UADE, en especial a Maca y Lu que hicieron de cada uno de los días de cursada, los mejores, tanto a nivel personal como académico.

A UADE y los profesores de la Universidad, por enseñarme todas las herramientas necesarias y más para desarrollarme profesionalmente.

A Elmer por sus consejos y opiniones sobre los análisis en las reuniones online.

Gracias.

Resumen

Uno de los hitos más importantes en el tratamiento del cáncer ha sido el desarrollo de inmunoterapias basadas en anticuerpos monoclonales para estimular la respuesta inmune antitumoral bloqueando puntos de control inmunológicos (CTLA-4, PD-1 y PD-L1). Estos tratamientos generan beneficios clínicos significativos en pacientes con algunos tipos tumorales, prolongando su supervivencia y mostrando una respuesta duradera. Sin embargo, una gran proporción de pacientes presentan resistencia o respuestas de corta duración. Por ello es de gran importancia encontrar biomarcadores predictivos, pronósticos y de resistencia, con el fin de lograr una respuesta eficaz por parte de los pacientes. Esta búsqueda es posible a través de las ciencias ómicas, estudio del conjunto de un gran número moléculas, utilizando como herramienta fundamental a la bioinformática. Esta ciencia es indispensable para estudiar, entender, interpretar y analizar grandes volúmenes de datos biomédicos. A partir de este enfoque se realizó un meta-análisis para estudiar la asociación entre las variables clínicas de pacientes con diferentes tipos de cáncer y su supervivencia global, libre de progresión y respuesta, tratados con agentes inmunoterapéuticos, como anti CTLA-4, anti PD-1, anti PD-L1, o la combinación de éstos. Encontramos diferencias significativas en la supervivencia global de pacientes con cáncer colorrectal menores y mayores a 61 años de edad tratados con anti PD-1/PD-L1, y en la supervivencia libre de progresión de pacientes con melanoma menores y mayores a 62 años de edad tratados con anti PD-1+CTLA-4, donde los mayores a dichos puntos de corte se benefician más que los menores tratados con las terapias mencionadas. En ambos casos se estudiaron los biomarcadores ya establecidos, tanto predictivos como pronósticos, tal como TMB, estado de MSI, carga de neoantígenos, índice citolítico, infiltrado celular inmune, entre otros, los cuales apoyaron y respaldaron las diferencias observadas en la supervivencia de esos pacientes; ello se realizó tanto en las cohortes de descubrimiento como en las de validación. Además, como era esperado debido al estadio de la enfermedad, hallamos diferencias significativas en la supervivencia global de los pacientes con melanoma metastásico tratados con agentes anti PD-1/PD-L1 o anti CTLA-4 dependiendo del sitio donde se encontraba la metástasis, siendo los pacientes con metástasis hepática los de peor supervivencia. Los pacientes con metástasis pulmonar, comparado con los que tenían metástasis en ganglios linfáticos, presentaron una peor supervivencia y mayor número de mutaciones específicas en el tumor primario luego del tratamiento, difiriendo las mutaciones respecto del tipo de terapia aplicada (anti PD-

1/PD-L1 o anti CTLA-4). Lo cual podría generar nuevas propuestas de tratamiento para ese grupo de pacientes. Los resultados de este trabajo se basan en el uso de herramientas bioinformáticas y biotecnológicas en el estudio de biomarcadores de respuesta a tratamientos oncológicos basados en la estimulación del sistema inmune en diferentes tipos tumorales y dan lugar a nuevas investigaciones para contribuir a la optimización de los recursos clínicos existentes.

Abstract

One of the most important and pioneering discoveries in cancer's treatment has been the development of immunotherapies based on monoclonal antibodies to stimulate the antitumor immune response by blocking immunological checkpoints (CTLA-4, PD-1 and PD-L1). These treatments give rise to significant clinical benefits in patients with some tumor types, increasing their survival and revealing a lasting response. Nevertheless, a large number of patients have resistance or short duration responses. Due to this fact, it is important to find predictive, prognostic and resistance biomarkers, in order to achieve an effective response from cancer patients. Biomarkers search and discovery is possible through omics approach, meaning the study of datasets composed by a large number of molecules, using bioinformatics as an elementary tool. This science is essential to study, understand, elucidate and analyze large volumes of biomedical data. Based on this approach, a meta-analysis was carried out to study the association between cancer patients' clinical variables and their overall survival, progression free survival and response, treated with immunotherapeutic agents, such as anti CTLA-4, anti PD-1, anti PD-L1, or the combination of these. We found significant differences in the overall survival of colorectal cancer patients younger and older than 61 years old treated with anti PD-1/PD-L1, also in the progression free survival of melanoma patients younger and older than 62 years old treated with anti PD-1+CTLA-4, where those above the established age cut-off benefit more than those below the cut-off treated with the mentioned therapies. In both cases, we analyzed the already established predictive and prognostic biomarkers, such as TMB, MSI status, neoantigen load, cytolytic score, immune cell infiltrate, among others, which supported the differences observed in patients' survival; this analysis was done in the discovery and validation cohorts. In addition, as we expected because of cancer stage, we found significant differences in melanoma metastatic patients' overall survival depending on the metastatic site treated with anti PD-1/PD-L1 or anti CTLA-4 agents, where patients with liver metastases had the worst overall survival. Patients with lung metastases, compared to those with lymph nodes metastases, had worse survival and a higher number of specific mutations in the primary tumor after treatment, those mutations differ with respect to the applied immunotherapy (anti PD-1/PD-L1 or anti CTLA-4). This could generate new treatment proposals for this group of patients. These results are based on the use of bioinformatics and biotechnological tools with the purpose of studying biomarkers of response to oncological treatments that stimulates the

immune system in different tumor types, thus lead to new research that could contribute to the optimization of existing clinical resources.

1. Introducción

1.1. Generalidades del cáncer

Desde 1858, cuando Rudolf Virchow formuló la idea de que las células tumorales son las propias células del cuerpo, se han propuesto varias hipótesis para explicar el origen de esas células en el organismo y cómo desarrollan tal morfología heterogénea, el aumento de la proliferación, la capacidad metastásica, y el comportamiento invasivo (Hanselmann y Welte, 2016). En un organismo maduro se conserva un equilibrio entre la renovación y la muerte de las células. Las células maduras tienen un tiempo vital determinado, conforme éstas mueren se generan nuevas debido a la proliferación y diferenciación de células progenitoras. En condiciones anormales, aparecen células que ya no están sujetas a los mecanismos normales de ese control de crecimiento, afectando así el ciclo celular y logrando la proliferación descontrolada, produciendo de esa manera un tumor o neoplasia. El tumor que no es capaz de crecer por tiempo indefinido y que no invade los tejidos circundantes sanos se denomina benigno. El que prosigue su crecimiento y se vuelve invasor de forma progresiva se llama maligno; el término **cáncer** se refiere de manera específica a un tumor maligno. Los tumores crecen de forma incontrolada, y generalmente logran producir metástasis invadiendo los vasos sanguíneos o linfáticos, transportándose hacia otros tejidos en los que no dejan de proliferar (Kuby *et al.*, 2007). Además, las células malignas logran ignorar ciertas señales tal como las involucradas en el proceso de muerte celular programada, conocido como apoptosis. Las células malignas pueden influir en las células, moléculas y vasos sanguíneos normales que rodean y alimentan al tumor, área conocida como microambiente tumoral. Otra característica a destacar de las células tumorales es que también suelen evadir el sistema inmunológico a través de diferentes mecanismos.

El cáncer es la segunda causa principal de mortalidad en todo el mundo. El tumor de cada individuo tiene una combinación única de cambios genéticos. Los cambios genéticos que contribuyen al cáncer tienden a afectar tres tipos principales de genes: protooncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del ADN. Los protooncogenes son responsables de la división y el crecimiento celular en condiciones normales, pero si se convierten en oncogenes durante la mutación genética son responsables de la transformación de una célula normal en una maligna. La pérdida de función de los genes supresores de tumores, los cuales se encuentran involucrados en el control del crecimiento y la división celular, desencadena la

división celular incontrolada. Los genes de reparación del ADN participan, como su nombre lo indica, en la reparación del ADN dañado. Las células con mutaciones en estos genes tienden a desarrollar mutaciones adicionales en otros genes. Juntas, estas mutaciones pueden hacer que las células normales se vuelvan malignas. A medida que la ciencia ha aprendido más sobre los cambios moleculares que conducen al cáncer, se ha descubierto que hay mutaciones específicas que ocurren comúnmente en muchos tipos de cáncer (Hassanpour y Dehghani *et al.*, 2017).

1.1.1. Clasificaciones

Existe una gran cantidad de tipos de cáncer, éstos generalmente reciben el nombre de los órganos o tejidos donde se forman, como pulmón, mama, vejiga, hígado, riñón, entre otros, es decir su ubicación anatómica en el organismo. Pero existe otra forma de clasificación que depende del tipo de célula que lo forma, siendo ésta una manera más específica de clasificación para un determinado tumor. El tipo tumoral más común es el carcinoma, estos se encuentran formados por células epiteliales, que son las células que recubren las superficies internas y externas del cuerpo, estos pueden ser adenocarcinoma, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células de transición. Los sarcomas se forman en huesos y tejidos blandos, incluidos músculos, grasa, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y tejido fibroso (como tendones y ligamentos). Los tipos de cáncer que comienzan en el tejido que forma la sangre de la médula ósea se denominan leucemias y no forman tumores sólidos. El linfoma es un cáncer que comienza en los linfocitos (células T o células B), habiendo dos tipos principales, linfoma de Hodgkin y el linfoma No-Hodgkin. El mieloma múltiple es un cáncer que comienza en las células plasmáticas, otro tipo de célula perteneciente al sistema inmune, éstas se acumulan en la médula ósea y forman tumores en los huesos de todo el cuerpo. También existen diferentes tipos de tumores cerebrales y de médula espinal los cuales se nombran según el tipo de célula en la que se formaron y dónde se formó por primera vez en el sistema nervioso central. El melanoma es un cáncer que comienza en los melanocitos, la mayoría de los melanomas se forman en la piel, pero también se pueden formar en otros tejidos pigmentados, como el ojo. Este tipo tumoral se describe en más detalle en la **sección 1.4.** Otros tipos tumorales pueden comprender: los tumores de células germinales, tumores neuroendocrinos o tumores carcinoides (National Cancer Institute, 2015).

1.1.2. Estadificación

El estadio se refiere a la extensión del cáncer, es decir el tamaño del tumor y si se ha diseminado o no. Hay muchos sistemas de estadificación, el más utilizado es el sistema de estadificación TNM. La T se refiere al tamaño y extensión del tumor primario, la N se refiere a la cantidad de ganglios linfáticos cercanos que tienen cáncer, y la M se refiere a si el cáncer ha hecho metástasis. El sistema TNM ayuda a describir el cáncer con gran detalle, pero para muchos tipos tumorales, las combinaciones TNM se agrupan en cinco etapas menos detalladas: Estadio 0, hay células anormales, pero no se han diseminado al tejido cercano; Estadios I, II y III, el cáncer está presente y cuanto mayor sea el número, más grande será el tumor y más se habrá diseminado a los tejidos cercanos, el Estadio III generalmente se asocia al arribo del cáncer a los ganglios linfáticos del organismo; Estadio IV, el cáncer se ha diseminado a partes distantes del cuerpo más allá de los ganglios (National Cancer Institute, 2015). Los oncólogos utilizan la información que proporciona el estadio del cáncer para planear el tratamiento y predecir el pronóstico del paciente.

1.2. Tratamientos para el cáncer

Los tipos de tratamientos dependen del tipo de cáncer y de lo avanzado que esté. Las terapias estándar constan en la extracción quirúrgica del tumor, siempre y cuando sea posible, la radioterapia o la quimioterapia. Siendo estas últimas capaces de destruir a las células tumorales con el fin de reducir el tumor, la diferencia entre ambas es que la primera utiliza altas dosis de radiación en la zona concreta del tumor mientras que en la segunda se administran fármacos quimioterapéuticos al paciente. Cabe destacar que ambas terapias no son específicas, es decir que no se dirigen directo hacia el tumor, sino que su mecanismo de acción también logra alcanzar a las células normales. Gracias a los avances en el campo de la inmunología, biología celular y molecular, y con el objetivo de superar la especificidad nula de las terapias estándar se logró el desarrollo de las terapias dirigidas, las cuales son la base de la medicina de precisión. Este tipo de terapias se dirige a las proteínas que controlan el crecimiento, la división y la diseminación de las células tumorales. La mayoría de las terapias dirigidas son fármacos de molécula pequeña o anticuerpos monoclonales. Los fármacos de molécula pequeña son lo suficientemente pequeños como para ingresar a las células fácilmente, por lo que se utilizan para dianas (generalmente llamados *targets* debido a su nombre en inglés) que se encuentran dentro de las células. Los anticuerpos monoclonales, son proteínas producidas *in vitro*

diseñadas para unirse a dianas específicas que se encuentran en las células tumorales. Existen anticuerpos monoclonales que marcan las células cancerosas o bloquean receptores que funcionan como puntos de control para que el sistema inmunológico las detecte y las destruya de manera más eficaz. Otros detienen directamente el crecimiento de las células tumorales o hacen que se autodestruyan, y algunos transportan toxinas a las células tumorales (Falzone *et al.*, 2018) (Fig. 1).

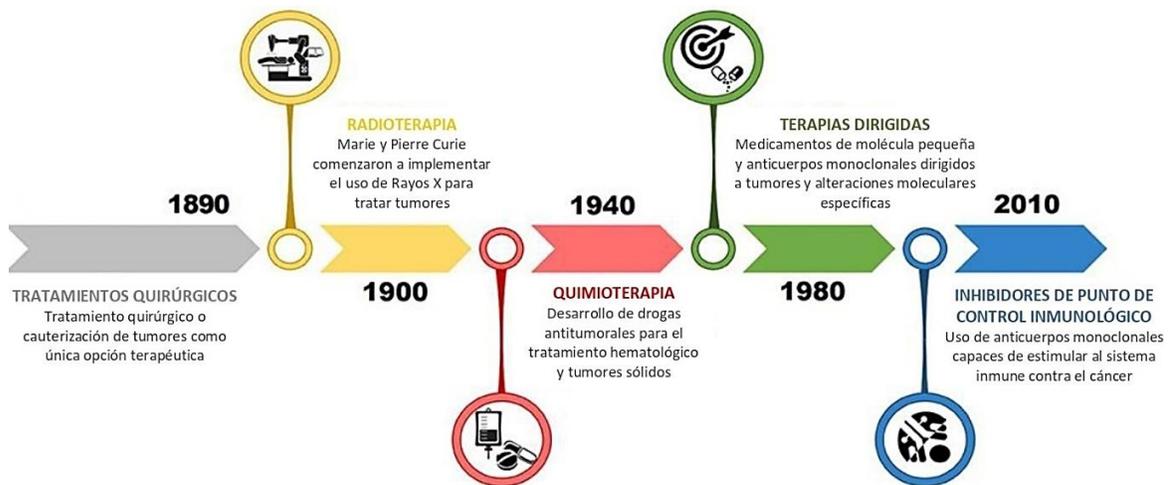


Figura 1: Cronología de los puntos de inflexión respecto de los tratamientos en la oncología moderna. *Luego del desarrollo de la radioterapia a principios del 1900, la oncología moderna comenzó con el descubrimiento de los primeros fármacos quimioterapéuticos alrededor de 1940. Posteriormente, se produjo un gran avance en el campo de la oncología médica con el desarrollo de la terapia dirigida en 1980, que determinó una mejora en la eficacia de los tratamientos contra el cáncer. La última innovación tuvo lugar en 2010 con la introducción de inhibidores de puntos de control inmunológicos para el tratamiento de tumores avanzados y metastásicos. Adaptado de Falzone et al., 2018.*

Con el fin de determinar si el paciente es apto para recibir la terapia, es necesario analizar el tumor para saber si contiene dianas para los medicamentos disponibles y aprobados. Para que se analicen las dianas del tumor, es necesaria una biopsia. Existen algunos riesgos al realizarse una biopsia sólida, que varían según el tamaño del tumor y su ubicación. Es por ello que en la actualidad se está tratando de implementar el uso de biopsias líquidas en la clínica debido a la baja invasión que tiene en el paciente respecto de la biopsia sólida. La principal ventaja de un abordaje de biopsia líquida radica en la posibilidad de capturar la heterogeneidad tumoral en su

conjunto (todos los subclones tumorales liberan CTC - células tumorales circulantes - y ctDNA - ADN tumoral circulante - en el torrente sanguíneo) a través de la evolución del tumor, ya que no son en absoluto invasivas para los pacientes. La combinación de este enfoque, junto con el estudio de las ómicas relacionadas, ha dado lugar a resultados prometedores en el mundo de la oncología. (Amelio *et al.*, 2020).

Se han aprobado una gran variedad de terapias dirigidas diferentes para su uso en el tratamiento del cáncer. Estas terapias incluyen terapias hormonales, inhibidores de la transducción de señales, moduladores de la expresión génica, inductores de apoptosis, inhibidores de la angiogénesis e inmunoterapias. Aunque las terapias dirigidas son beneficiosas, tienen algunos inconvenientes, como por ejemplo que las células tumorales puedan volverse resistentes a la terapia dirigida, o que los fármacos para algunas dianas sean difíciles de desarrollar ya que se debe conocer con exactitud la estructura de la diana y su función en la célula. La resistencia puede ocurrir de dos maneras, la diana a la cual estaba dirigida la terapia cambia a través de mutación/es, de modo que la terapia dirigida ya no interactúa bien con la misma, y/o el tumor encuentra una nueva vía para lograr el crecimiento tumoral que no depende de la diana.

1.2.1. Inmunoterapias

1.2.1.1. *Tipos de inmunoterapias*

En condiciones normales, el sistema inmunológico defiende al organismo de agentes extraños, ya sean biológicos o físico-químicos, detecta y destruye las células que no poseen un comportamiento normal, y previene o frena el crecimiento de muchos tumores. En este último caso, las células inmunes suelen encontrarse dentro y alrededor de los mismos, y reciben el nombre de células inmunes infiltrantes del tumor. Dentro de este grupo de células se encuentran los linfocitos infiltrantes de tumores o TIL (por su nombre en inglés *tumor-infiltrating lymphocytes*), y actúan como marcador de que el sistema inmunológico está respondiendo al tumor. Sin embargo, las células tumorales desarrollan mecanismos para evitar la destrucción por parte del sistema inmunológico. Estos mecanismos de evasión liderados por el tumor pueden ser: cambios genéticos que los hacen menos detectables para el sistema inmunológico, proteínas en su superficie que inhiben a las células inmunes, y/o señales liberadas hacia las células inmunes con el fin de obtener un fenotipo inmunosupresor. Por lo tanto, el fin de la

inmunoterapia es potenciar al sistema inmunológico para que actúe de manera eficiente contra el cáncer removiendo o disminuyendo estas barreras que el tumor desarrolla para defenderse.

Se utilizan varios tipos de inmunoterapias para tratar el cáncer. La terapia de transferencia de células T es un tipo de inmunoterapia, hay dos tipos principales que la conforman, la terapia de linfocitos infiltrantes de tumores y la terapia de células T con receptor de antígeno quimérico (CAR). Ambos implican recolectar las células inmunes del paciente, crecer una gran cantidad de estas células *in vitro* y luego devolver las células al paciente por vía intravenosa. Otro tipo de inmunoterapia son las vacunas de tratamiento que pueden ayudar al sistema inmunológico a aprender a reconocer y reaccionar contra antígenos específicos de un tumor, conocidos como antígenos asociados a tumores, que no se encuentran en las células normales y de esa manera destruir las células tumorales que sí los contienen. Los inmunomoduladores también se encuentran en esta categoría de inmunoterapias, estos agentes incluyen citoquinas (como interferones o interleuquinas) que son proteínas producidas por células inmunes que desempeñan funciones importantes en las respuestas inmunitarias logrando activar ciertos tipos de células inmunes. Por último, se encuentran los anticuerpos monoclonales que pueden cumplir diferentes funciones: marcan las células tumorales para que el sistema inmunológico las reconozca y las destruya de manera eficaz, como por ejemplo el Rituximab (Rituxan®), indicado para pacientes con células B malignas, donde el anticuerpo se une a CD20 en las células tumorales, lo que hace que el sistema inmunológico las destruya; algunos anticuerpos monoclonales ayudan a que el sistema inmunológico actúe contra el tumor logrando un acercamiento de ambos tipos celulares, como el Blinatumomab (Blinicyto®), que se une tanto a CD19 (proteína que se encuentra en la superficie de las células leucémicas) como a CD3 (proteína en la superficie de las células T), por lo tanto este proceso ayuda a que las células T se acerquen lo suficiente a las células leucémicas para reconocerlas y destruirlas; otros anticuerpos monoclonales funcionan como **inhibidores de los puntos de control inmunológico** (ICI por su nombre en inglés *immune checkpoint inhibitors*) los cuales se describen a continuación (Ventola *et al.*, 2017).

1.2.1.2. *Inhibidores de puntos de control inmunológico*

1.2.1.2.1. *Fundamentos y mecanismo de acción*

Los ICI bloquean los puntos de control inmunitarios. En condiciones normales, estos puntos de control evitan que las respuestas inmunitarias sean demasiado fuertes o mismo, cuando el sistema inmunológico finalizó su respuesta, estas moléculas cumplen el rol de disminuirla con el fin de evitar una respuesta exacerbada. Al bloquear estos puntos de control, la terapia permite que las células inmunitarias respondan al cáncer y no se encuentre inhibida su respuesta.

Los puntos de control inmunológico se activan cuando las proteínas en la superficie de las células inmunitarias, células T, reconocen y se unen a sus ligandos en otras células, como sucede en algunas células tumorales. Cuando el punto de control y su ligando se unen, envían una señal que inhibe la actividad efectora de las células T. Esto, como se mencionó, puede evitar una respuesta antitumoral efectiva imposibilitando la destrucción del tumor o el control de su crecimiento. Existe un único fármaco aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (*U.S. Food and Drug Administration*, FDA) desde el 2011 que actúa contra una proteína de punto de control CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico) que recibe el nombre de Ipilimumab (anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 IgG1-k humano); otro fármaco contra CTLA-4 que todavía no ha sido aprobado, pero se encuentra en investigación es Tremelimumab. La proteína CTLA-4 (CD152) corresponde a la familia B7/CD28 (cluster de diferenciación 28) y media la inmunosupresión al disminuir indirectamente la señalización a través del receptor coestimulador CD28. Como tiene mayor afinidad por B7-1/CD80 y B7-2/CD86, supera a CD28, lo que conduce a una reducción en la liberación de citoquinas efectoras como IL-12 (interleuquina 12) y enzimas citotóxicas como Perforina (PRF) y Granzima B. Esta proteína, CTLA-4, también media en la trasendocitosis de CD80 y CD86 de las células presentadoras de antígeno y, por tanto, reduce su disponibilidad para CD28. Por lo tanto, esto da como resultado una disminución de las respuestas inmunes a los antígenos débiles, como los antígenos propios y tumorales (Vaddepally *et al.*, 2020; Kuby *et al.*, 2007) (ver Tabla I).

| | CTLA-4 | PD-1 |
|--|---|--|
| Ligandos | CD80 y CD86 | PD-L1 y PD-L2 |
| Expresión del punto de control | Perfil de expresión limitado en células T naïve luego de activación, y células T regulatorias FoxP3+ | Perfil de expresión amplio en células B, T y NK |
| Expresión de sus ligandos | Perfil de expresión limitado en células T y APCs en órganos linfáticos, y en algunas de estas células en tejidos periféricos. No se expresan en células tumorales | Perfil de expresión amplio (particularmente PD-L1) en células B, T, dendríticas, macrófagos en tejidos periféricos, y en el TME por células tumorales y estromales |
| Estímulo para expresión | Se expresa en endosomas y la activación del TCR incrementa la expresión de CTLA-4 en superficie | La activación tanto del TCR como del BCR incrementa la activación de PD-1 |
| Señalización río abajo | Señales vía SHP-2 para inhibir PI3K. Señales vía PP2A para inhibir AKT | Señales vía SHP-2 para inhibir ZAP-70 y PI3K |
| Funciones en la modulación inmune | Actúa principalmente en órganos linfoides secundarios para la inducción de tolerancia periférica | Actúa principalmente en los tejidos periféricos para el mantenimiento a largo plazo de la tolerancia periférica. |
| Modulación de la respuesta de células T con ICI | Incremento de células T CD4 efectoras, y reducción de células T regulatorias FoxP3+ | Incremento de células T CD8 activadas |

Tabla I: Comparaciones de las vías inmunológicas y de señalización de PD-1 y CTLA-4.

APC: células presentadoras de antígeno; TCR: receptor de células T; BCR: receptor de células B; TME: microambiente tumoral; SHP-2: fosfatasa Src región-2 homóloga que contiene proteína tirosina fosfatasa; PP2A: proteína fosfatasa 2; AKT: también conocida como proteína quinasa B (PKB); PI3K: fosfoinositol 3-quinasa; ZAP-70: proteína quinasa 70 asociada a la cadena zeta, se expresa normalmente en la membrana de los linfocitos (células T, NK y un subconjunto de células B), es más conocido por ser parte del TCR. Las siglas corresponden a los nombres provenientes del inglés. Adaptado de Willsmore et al., 2021

Otros inhibidores del punto de control inmunológico actúan contra una proteína de punto de control llamada PD-1 (proteína de muerte celular programada 1) o sus proteínas asociadas PD-L1/PD-L2 (ligandos de PD-1), ya que algunos tumores reducen la respuesta de las células T al expresar niveles altos de PD-L1/ PD-L2. PD-1 es una proteína transmembrana inhibidora expresada en células T, células B, células asesinas naturales (NK por su nombre en inglés *natural killers*) y células supresoras derivadas de mieloides (MDSC por su nombre en inglés *myeloid-derived suppressor cells*). PD-L1, también conocido como B7-H1, se expresa en la superficie de múltiples tipos de tejidos, incluidas muchas células tumorales y células hematopoyéticas. La interacción PD-1/PD-L1 conduce directamente a varios mecanismos como la inhibición de la apoptosis de las células tumorales, el agotamiento de las células T

efectoras periféricas (denominadas células T exhaustas) y la conversión de las células T efectoras en células T reguladoras (células T-reg). Como tal, el bloqueo de la vía PD-1 puede mejorar la actividad antitumoral de las células T y, por lo tanto, el control inmunológico y la destrucción de las células tumorales (Vaddepally *et al.*, 2020; Kuby *et al.*, 2007) (ver Tabla I). Además, hay más agentes en investigación para puntos de control como BTLA (atenuador de linfocitos B y T), VSIR (receptor inmunorregulador V-set), TIM-3 (dominio de inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3), LAG-3 (gen 3 de activación de linfocitos) y CD47 (cluster de diferenciación 47) (Vaddepally *et al.*, 2020).

1.2.1.2.2. Fármacos aprobados por la FDA

Inhibidores de PD-1 como Nivolumab, Pembrolizumab, Cemiplimab e inhibidores de PD-L1 tales como Atezolizumab, Avelumab, y Durvalumab se encuentran en la lista actual de agentes aprobados, además de Ipilimumab (anti-CTLA-4) (ver Tabla II).

| Target inmunológico | Fármaco | Cáncer |
|---------------------|----------------------------------|---|
| PD-L1 | Avelumab (Bavencio®) | Cáncer de Vejiga avanzado; Cáncer de Riñón avanzado (incluso como terapia de primera línea en combinación con quimioterapia); Melanoma avanzado |
| | Atezolizumab (Tecentriq®) | Cáncer de Mama triple negativo (en combinación con la quimioterapia nab-paclitaxel (Abraxane®)); Cáncer de Hígado avanzado (en combinación con Bevacizumab (Avastin®), como tratamiento de primera línea); Cáncer de Pulmón avanzado subtipos NSCLC y SCLC (incluso como terapia de primera línea en combinación con quimioterapia); Melanoma avanzado (en combinación con Cobimetinib (Cotellic®) y Vemurafenib (Zelboraf®)) |
| | Durvalumab (Imfinzi™) | Cáncer de Vejiga avanzado; Cáncer de Pulmón subtipos NSCLC (que han completado quimiorradiación) y SCLC avanzado (en combinación con quimioterapia) |
| PD-1 | Cemiplimab (Libtayo®) | Cáncer de Pulmón avanzado subtipo NSCLC con PD-L1>50% y sin mutaciones en EGFR, ALK o ROS1 |
| | Nivolumab (Opdivo®) | Cáncer de Vejiga avanzado; Cáncer Colorectal avanzado con MSI-H (en combinación con Ipilimumab); Cáncer de Esófago subtipo Carcinoma de Células Escamosas de Esófago; Cáncer de Cabeza y Cuello avanzado; Cáncer de Riñón avanzado; Cáncer de Hígado avanzado (en combinación con Ipilimumab); Cáncer de Pulmón avanzado subtipo NSCLC (en combinación con ipilimumab, con o sin quimioterapia) y SCLC que ha avanzado después del tratamiento con quimioterapia a base de platino u otra línea de tratamiento; Linfoma-Hodgkin ; Melanoma avanzado (como monoterapia y en combinación con Ipilimumab) |
| | Pembrolizumab (Keytruda®) | Cáncer de Vejiga avanzado; Cáncer de Cerebro o SNC avanzado con MSI-H o TMB-H; Cáncer de Mama triple negativo PD-L1(+), MSI-H, dMMR o TMB-H; Cáncer de Cérvix Uterino avanzado PD-L1(+), MSI-H o TMB-H; Cáncer Colorectal avanzado con MSI-H, dMMR o TMB-H (incluso como tratamiento de primera línea); Cáncer de Esófago avanzado con PD-L1(+); Cáncer de Estómago avanzado con PD-L1(+); Cáncer de Cabeza y Cuello avanzado (incluso como terapia de primera línea); Cáncer de Riñón avanzado (incluso como terapia de primera línea); Cáncer de Hígado avanzado con MSI-H, dMMR o TMB-H; Linfoma-Hodgkin ; Cáncer de Pulmón avanzado subtipo NSCLC (incluso como terapia de primera línea solo o en combinación con quimioterapia); Melanoma avanzado (incluso en el entorno adyuvante, prequirúrgico); Cáncer de Ovario avanzado con MSI-H, dMMR o TMB-H; Cáncer de Páncreas avanzado con MSI-H, dMMR o TMB-H; Cáncer de Próstata avanzado con MSI-H o TMB-H; Sarcoma avanzado con MSI-H o TMB-H |
| CTLA-4 | Ipilimumab (Yervoy®) | Cáncer Colorectal avanzado con MSI-H (en combinación con Nivolumab); Cáncer de Riñón avanzado (en combinación con Nivolumab); Cáncer de Hígado avanzado previamente tratado (en combinación con Nivolumab); Cáncer de Pulmón avanzado subtipo NSCLC (en combinación con Nivolumab como tratamiento de primera línea, con o sin quimioterapia); Melanoma avanzado (incluso como terapia de primera línea y en combinación con Nivolumab) |

Tabla II: Fármacos aprobados por la FDA. *Se indican las dianas inmunológicas de cada uno de ellos y qué tipo tumoral puede ser tratado con dicho fármaco. SNC: Sistema Nervioso Central; MSI-H por su nombre en inglés high microsatellite instability, inestabilidad de microsatélite alta; TMB-H por su nombre en inglés high tumor mutational burden, carga mutacional tumoral alta; dMMR por su nombre en inglés DNA mismatch repair deficiency, deficiencia en reparación del ADN; NSCLC: Cáncer de Pulmón de Células No-Pequeñas; SCLC: Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas. Realizado con datos recuperados de Vaddepally et al., 2020 y del Cancer Research Institute disponibles en <https://www.cancerresearch.org/immunotherapy>.*

1.2.1.2.3. Efectos adversos

Es importante destacar que los ICI pueden causar efectos adversos que afectan a los pacientes de diferentes maneras, ello depende del estado de salud del paciente antes del tratamiento, su tipo de cáncer, qué tan avanzado está, el tipo de inhibidor del punto de control inmunológico administrado y la dosis. Los efectos adversos comunes de los ICI incluyen sarpullido, diarrea y fatiga. Los efectos adversos más extraños pueden incluir inflamación generalizada. Según el órgano que se vea afectado, la inflamación puede provocar: cambios en el color de la piel, sarpullido y sensación de picazón causados por inflamación de la piel, tos y dolores en el pecho causados por inflamación en los pulmones, dolor de estómago y diarrea causados por inflamación en el colon, diabetes causada por inflamación en el páncreas, hepatitis (inflamación del hígado), hipofisitis (inflamación de la glándula pituitaria), miocarditis (inflamación del músculo cardíaco), nefritis (inflamación del riñón) y función renal alterada, tiroides hiperactiva o hipoactiva, problemas del sistema nervioso como debilidad muscular, entumecimiento y dificultad para respirar (Ji et al., 2019).

1.3. Actualidad, incidencia del cáncer y medicina de precisión

En el año 2020 se diagnosticaron aproximadamente 19.292.789 nuevos casos de personas con cáncer a nivel global (*The Global Cancer Observatory*). Los casos más representativos corresponden a cáncer de mama, pulmón, colorrectal, próstata, estómago, hígado, esófago, tiroides, vejiga, páncreas, leucemia, riñón, melanoma, ovario, cerebro (sistema nervioso central), cérvix uterino y linfoma no-Hodgkin (Fig. 2). Según *The Global Cancer Observatory*, base de datos que presenta estadísticas globales respecto del cáncer para

contribuir al control e investigación del mismo, el número estimado de casos nuevos de 2020 a 2040 alcanzaría los 30.2 millones.

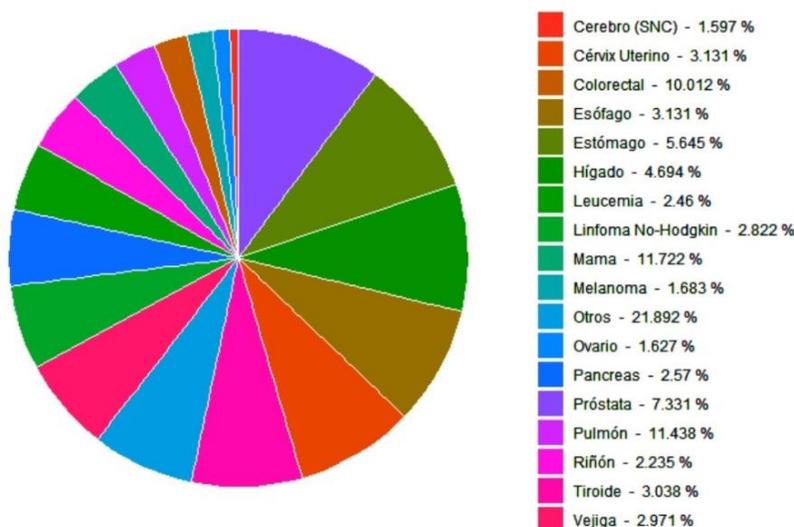


Figura 2: Gráfico de torta, porcentaje de personas diagnosticadas según tipo tumoral. Se muestran los tipos tumorales con mayor incidencia a nivel global hasta el 2020. Realizado con datos recuperados de The Global Cancer Observatory disponibles en <https://gco.iarc.fr/>.

Con un número tan elevado de pacientes, la principal preocupación es un tratamiento eficaz para detener la progresión o cura, en lo posible, de cada tipo de cáncer específico. A medida que mejora la comprensión de la complejidad y singularidad de cada tumor individual, se cuestiona la idoneidad de este enfoque de "terapia general" para los tratamientos del cáncer. La medicina de precisión o medicina personalizada surge con el propósito de finalizar con esa ideología ya que se basa en un enfoque personalizado para seleccionar la terapia adecuada a nivel de paciente individual. Dada la alta variabilidad de un paciente a otro, el cáncer es un candidato principal para el uso de la medicina de precisión. Hasta el momento, cuando se diagnostica cáncer a un paciente en la clínica, generalmente recibe el mismo tratamiento que otras personas que tienen el mismo tipo y estadio de cáncer. Aun así, diferentes personas pueden responder de manera distinta y también los cambios que ocurren en el tumor de una persona pueden no ocurrir en otras que tienen el mismo tipo de cáncer. De hecho, es importante que la terapia de primera línea (primer tratamiento que recibe el paciente) sea eficaz, ya que la resistencia puede reducir las tasas de supervivencia a cinco años en más del 50% en cánceres considerados agresivos. El tratamiento personalizado del cáncer implica una caracterización

bioquímica completa del tumor con el fin de tomar una decisión óptima respecto al tratamiento adecuado para ese paciente en particular. Por lo tanto, resulta en una mejora significativa en las tasas de respuesta, supervivencia global y libre de progresión (Maciejko *et al.*, 2017).

1.4. Generalidades del melanoma

1.4.1. Incidencia a nivel global, origen y factores de riesgo

El melanoma es uno de los tipos de cáncer más agresivos y el más grave de los tipos de cáncer de piel, así se lo considera debido a que es uno de los que presenta mayor resistencia a los tratamientos. El melanoma presenta un origen melanocítico, es decir, surge como consecuencia de la transformación maligna de los melanocitos y posee una alta capacidad para proliferar y producir metástasis. Puede originarse en la piel y las mucosas, y menos frecuentemente, en los ojos, el sistema nervioso central, el mesenterio y el oído interno. A nivel global, hasta el año 2020 según *The Global Cancer Observatory*, existen aproximadamente 324.635 personas diagnosticadas con melanoma al año, y se estima que este número continuará aumentando. El melanoma cutáneo ha incrementado su incidencia en las últimas décadas, especialmente en la población caucásica, más que ningún otro tipo de cáncer, siendo el responsable de casi el 90% de las muertes producidas por los tumores cutáneos malignos (Ferlay *et al.*, 2013). Los melanocitos son células pigmentadas especializadas que se encuentran predominantemente en la piel y en los ojos, donde producen melanina, siendo este el pigmento responsable de la coloración de la piel, el pelo y los ojos. En la piel, estas células se encuentran en la capa basal de la epidermis y en los folículos pilosos, y su homeostasis está regulada por los queratinocitos, las células predominantes de la epidermis (Slominski, 2004). Los melanocitos cutáneos se originan a partir de los progenitores de alta movilidad de la cresta neural que migran durante el desarrollo embrionario (Gray-Schopfer, Wellbrock y Marais, 2007).

Los mayores factores de riesgo en melanoma son los antecedentes familiares, la presencia de múltiples nevos benignos o atípicos, y melanoma previo. Adicionalmente, la inmunosupresión, la exposición a la radiación ultravioleta (UV) y la sensibilidad al sol son otros factores de riesgo importantes. Muchos de estos factores se corresponden con una predisposición genética o constituyen una presión ambiental que contribuye a la aparición de esta enfermedad (Miller y Mihm, 2006).

1.4.2. Bases moleculares del melanoma

1.4.2.1. Modelo de Clark

El modelo de Clark describe los cambios histológicos que se producen durante el desarrollo de la enfermedad, desde los melanocitos normales hasta el desarrollo del tumor maligno y la metástasis, se utiliza para describir la profundidad de la diseminación de este tipo de cáncer (Fig. 3). El primer cambio a nivel fenotípico es el desarrollo de nevos benignos. En este caso, el control de crecimiento celular se ve alterado, pero continúa siendo limitado, y raramente progresan a un cáncer (Greene *et al.*, 1984). Probablemente no hay progresión debido a la senescencia celular inducida por oncogenes, en donde el crecimiento estimulado por estas vías es limitado (Braig y Schmitt, 2006).

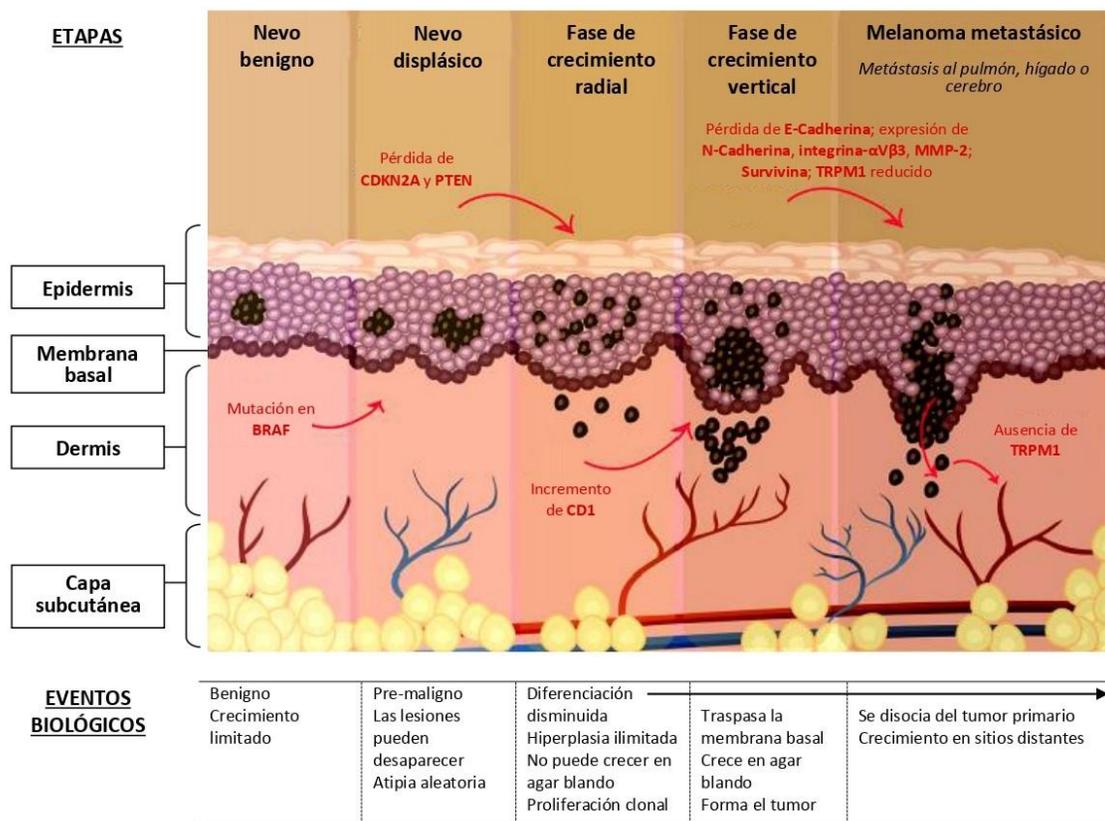


Figura 3: Eventos biológicos y cambios moleculares durante la progresión del melanoma. En la etapa de nevo benigno, la mutación de BRAF y la activación constitutiva de la vía de las MAPK son características. La atipia citológica en los nevos displásicos refleja alteraciones en PTEN y CDKN2A. Las siguientes etapas están caracterizadas por la pérdida de la

diferenciación de celular regulada por MITF. El crecimiento vertical y la metástasis están fuertemente asociados a alteración en la adhesión celular. En tanto, cambios en la expresión de TRPM1 correlacionan con la propensión a desarrollar metástasis; otros cambios incluyen la pérdida de E-Cadherinas y el aumento de N-Cadherinas, MMP2 y $\alpha V\beta 3$ integrina. El texto y flechas en rojo indican los cambios moleculares. Adaptado de Miller y Mihm, 2016; Rahmati et al., 2020.

A nivel molecular, la activación anormal de la vía de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) regula la proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte de las células de melanoma a través de la fosforilación de la quinasa relacionada con señal extracelular (ERK) (Lin *et al.*, 1998; Brunet, 1999; Welsh *et al.*, 2001). Normalmente esta vía es dependiente de factores de crecimiento que activen receptores tirosin-quinasa de la superficie de la membrana celular. La activación permanente de esta vía viene dada por mutaciones somáticas del gen NRAS, que codifica para la proteína GTPasa N-Ras (15% de los casos de melanoma) o en BRAF, gen que codifica para la proteína B-Raf perteneciente a la familia de las proteínas serina/treonina quinasas (alrededor del 50% de los casos). Estas mutaciones son excluyentes una de otra y generan la activación constitutiva de la vía RAS-RAF-MEK-ERK (Albino *et al.*, 1989; Davies *et al.*, 2002; Omholt *et al.*, 2003). RAS pertenece a una familia de proteínas de unión a GTP y consiste en las isoformas NRAS, HRAS y KRAS. Estas proteínas son fundamentales en la integración de las señales de los factores de crecimiento río arriba de RAF (Tannock *et al.*, 2016). Además de BRAF hay otras dos isoformas de RAF, ARAF y CRAF, pero las mutaciones en estos genes no son comunes. Dado que la mayor parte de los nevus no progresa, estos porcentajes indican que el desarrollo de un tumor maligno requiere mutaciones o lesiones moleculares adicionales. En melanocitos humanos la mutación de BRAF induce senescencia promoviendo el aumento de expresión del inhibidor de ciclo celular de la quinasa 4A (INK4A) (Michaloglou *et al.*, 2005). Este inhibidor limita el crecimiento causado por la mutación en BRAF. El mismo podría ser revertido por una mutación en el mismo INK4A o por mutaciones en otros factores reguladores del ciclo celular.

Otras mutaciones frecuentes en melanoma son las que ocurren en NF1 (neurofibromina 1), un gen asociado a un desorden hereditario denominado fibromatosis de tipo 1. Esta mutación no es excluyente con mutaciones en BRAF o RAS, aunque también existen tumores que no tienen alterados ninguno de estos dos genes y sí tienen una mutación en NF1. El subtipo mutado

en NF1 tiene una carga mutacional más alta y una firma de mutación de daño por radiación UV más fuerte. Además, se relacionan con pacientes de edad avanzada y un mayor riesgo de muerte en comparación con los otros subtipos de melanoma mencionados (Cirenajwis *et al.*, 2017). Los melanomas mutantes BRAF se asocian típicamente con la exposición solar intermitente, mientras que los melanomas mutantes NRAS o NF1 se asocian con la exposición solar crónica (Rose *et al.*, 2021). La pérdida de NF1 está asociada a la activación de RAS, y en concurrencia con la mutación en BRAF, colabora con la resistencia a terapias dirigidas contra la proteína BRAF mutada (Nissan *et al.*, 2014). Se encontraron mutaciones en BRAF, NRAS y NF1 en un 52%, 28% y 14% de las muestras de melanoma, respectivamente. Un 14% de las muestras fueron triple-WT (por su nombre en inglés *wild-type*). Además, con este estudio se confirmaron mutaciones significativas en genes como CDKN2A, TP53, PPP6C, ARID2, PTEN, IDH1, MAP2K1, DDX3X, RAC1 y RB1 (Akbari *et al.*, 2015).

1.4.2.2. *Nevo displásico*

Siguiendo el modelo de Clark, el próximo paso hacia el melanoma es el desarrollo de atipia citológica en el nevo displásico, que puede provenir de nevos benignos o de nuevas lesiones (Fig. 3). Las mutaciones y anormalidades moleculares en esta etapa suelen afectar al crecimiento celular, la reparación del ADN y la susceptibilidad a la muerte celular. Entre el 25% y el 40% de los casos de melanoma familiar (Thompson, Scolyer y Kefford, 2005) se presenta una mutación que inactiva CDKN2A, un gen que codifica para dos proteínas supresoras de tumores, p16INK4A y p19ARF (Kamb *et al.*, 1994; Nobori *et al.*, 1994). Entre un 25% y un 50% de los melanomas no familiares (Flores *et al.*, 1996; Wu, Goel y Haluska, 2003) tienen inactivado el gen homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN) (Li *et al.*, 1997; Steck *et al.*, 1997). PTEN codifica para una fosfatasa que disminuye la señal de una variedad de factores de crecimiento que usan fosfatidilinositol fosfato (PIP3) como señal intracelular. Por lo tanto, PTEN regula PIP3 manteniendo bajos sus niveles. En ausencia de la actividad de PTEN, PIP3 incrementa sus niveles desencadenando la activación de la proteína quinasa B (PKB, también llamada AKT). Este aumento de AKT prolonga la supervivencia de la célula a través de la inactivación de la proteína antagonista de muerte celular de BCL-2 (BAD) y el aumento de la expresión de CCND1, que contribuye a la proliferación celular. AKT también afecta a muchos otros genes del ciclo celular y genes relacionados con la supervivencia a través del factor de transcripción FKHR (Cantley y Neel, 1999; Wu, Goel y Haluska, 2003).

1.4.2.3. *Diferenciación de melanocitos y su relación con el melanoma*

El proceso normal de diferenciación conlleva principalmente el arresto del ciclo celular y la expresión de los genes necesarios para la producción de melanina, y está regulado por el factor de transcripción asociado con microftalmia (MITF) (Hodgkinson *et al.*, 1993). La desregulación de este proceso está asociada a la dediferenciación de los melanocitos, un aspecto fundamental en el desarrollo del melanoma. MITF es un factor clave en la vía de síntesis de melanina aumentando la transcripción de los genes encargados de llevar a cabo este proceso. MITF también regula genes específicos de melanocitos como el homólogo de plata (SILV) y melan-A (MLANA), relacionados con el diagnóstico por inmunohistoquímica (IHC) de melanoma. A su vez, MITF regula el arresto celular induciendo INK4A (Miller y Mihm, 2006). La disminución de la expresión de los genes SILV y MLANA, y la disminución en la pigmentación de los melanocitos son características de la progresión de nevo a melanoma. También se ve una disminución en la expresión de melastatina 1 (TRPM1), otro gen que se ve regulado por MITF. Estudios a gran escala de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en melanoma encontraron un incremento en el número de copias de una región del cromosoma 3 que contiene el locus MITF (Garraway *et al.*, 2005).

1.4.2.4. *Adhesión celular, invasión y metástasis*

La adhesión celular controla en gran medida la migración de las células y la organización de los tejidos. Las cadherinas son las proteínas responsables de las interacciones célula-célula. Son proteínas transmembrana con un dominio extracelular que se une al dominio extracelular de cadherinas de otras células, formando uniones adherentes. Hay tres tipos principales de cadherinas: E (epiteliales), P (placentaria) y N (neural), siendo las menos frecuentes R (retina) y VE (endotelial). El dominio intracelular está asociado a un complejo proteico que incluye a β -catenina y forma uniones estructurales con el citoesqueleto a través de los filamentos de actina. Existen varias vías de señalización que causan la disociación de β -catenina del complejo de adhesión celular y transducen señales al núcleo. Alteraciones en la expresión de cadherinas afectan la interacción de las células de melanoma con su entorno y alteran la señalización de β -catenina (Miller y Mihm, 2006). La expresión de E-cadherinas ocurren en melanocitos y queratinocitos de la epidermis, y son responsables de la asociación entre estas células (Hsu *et al.*, 2000). El contacto con los queratinocitos indiferenciados de la

lámina basal inhibe la proliferación de los melanocitos y la expresión de marcadores de melanoma.

La invasión local y posterior metástasis son responsables en gran medida de la mortalidad en melanoma. En el modelo de Clark las características invasivas aparecen en la fase de crecimiento vertical, que ocurre cuando los melanocitos no solo penetran la lámina basal, si no que crecen de manera intradérmica como un módulo en expansión (Fig. 3). En la metástasis, células tumorales se disocian de la lesión primaria, migran a través del estroma e invaden los vasos sanguíneos y linfáticos para formar nuevos tumores en sitios distantes. Tanto la invasión como la metástasis están fuertemente relacionadas con alteraciones en la adhesión celular. La fase de crecimiento radial del melanoma se caracteriza por la pérdida de E-cadherinas y el aumento de N-cadherinas (Fig. 3). Esto genera la pérdida de capacidad de adhesión de los melanocitos con los queratinocitos, y aumenta su posibilidad de interactuar con células que expresan N-cadherinas, como los fibroblastos de la dermis y el endotelio vascular. De esta forma, las células de melanoma adquieren la capacidad de penetrar la lámina basal e invadir otros tejidos llegando a los vasos sanguíneos y linfáticos. Además de los cambios en la adhesión, la pérdida de E-cadherinas y el aumento de N-cadherinas aumentan la supervivencia de las células tumorales a través de la activación de las vías de señalización de β -catenina (Miller y Mihm, 2006).

Las integrinas median las interacciones celulares con el colágeno, la fibronectina y la laminina, componentes de la matriz extracelular. La transición entre la fase de crecimiento radial y la de crecimiento vertical en melanoma está asociada con la expresión de la integrina- α V β 3. Esta integrina cumple varios roles que favorecen el desarrollo tumoral. Por un lado, induce la expresión de la metaloproteasa 2 (MMP2), una enzima que degrada el colágeno de la lámina basal (Brooks *et al.*, 1996; Hofmann *et al.*, 2000; Felding-Habermann *et al.*, 2002), y por otro, estimula la motilidad de las células de melanoma a través de mecanismos de reorganización del citoesqueleto (Li *et al.*, 2001). Tanto la degradación del colágeno en la lámina basal como el aumento en la motilidad celular son factores clave que posibilitan la invasión local y posterior metástasis en melanoma. Además, integrina- α V β 3 aumenta la expresión de la proteína anti-apoptótica BCL-2 (Petitclerc *et al.*, 1999).

1.4.3. Carga mutacional y efecto de la radiación UV

La carga mutacional en los melanomas está entre las más altas de todos los tipos de cáncer, generando una gran heterogeneidad a nivel molecular. Esta característica hace que en melanoma se presente uno de los mayores desafíos a la hora de analizar los genomas tumorales y dilucidar las mutaciones que llevan a su desarrollo. Esta alta tasa de mutaciones está asociada principalmente a los efectos mutagénicos de la radiación UV.

La radiación ultravioleta B (UVB) genera dímeros de pirimidinas en el ADN, siendo los más frecuentes los dímeros de timina. Cuando las citosinas forman estos dímeros son propensos a la desaminación hidrolítica que puede resultar en mutaciones C>T (Citosina > Timina). Esta firma mutacional es responsable de la mayor parte de las mutaciones en melanoma. Sin embargo, no todas las transiciones C>T son producto del daño por UVB. Otras causas de este tipo de mutaciones son la edad y los quimioterapéuticos. La radiación ultravioleta A (UVA), por otro lado, genera transversiones G>T (Guanina > Timina) debido al daño oxidativo originado por este tipo de radiación. La luz UVA es absorbida por fotosensibilizadores como la feomelanina, lo que produce especies reactivas de oxígeno (ROS) y genera daños asociados en el ADN (Lo y Fisher, 2014).

Otras mutaciones somáticas clave en el melanoma son independientes de los rayos UV, incluida la mutación BRAF V600E que se encuentra en el 60% de los melanomas y las mutaciones NRAS que se encuentran en el 15-20% de los melanomas (Ellerhorst *et al.*, 2011). Si bien estas mutaciones no son mutaciones de firma UV, son más comunes en la piel expuesta al sol (Curtin *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2011). Las mutaciones inducidas por los rayos UV se acumulan a medida que los nevos melanocíticos se transforman en melanoma, incluidas las mutaciones impulsoras en CDKN2A, TP53, NF1, RAC1 y PTEN (Viros *et al.*, 2014; Melamed *et al.*, 2017). Un estudio vinculó las firmas de daños en el ADN inducidas por rayos ultravioleta con aproximadamente el 46% de las mutaciones impulsoras (Hodis *et al.*, 2012).

En respuesta a la radiación UV los queratinocitos de la epidermis secretan factores que regulan la supervivencia, movilidad, diferenciación y proliferación de los melanocitos, estimulando la producción de melanina y dando como resultado el bronceado de la piel. En este sentido, los melanocitos cumplen un rol muy importante protegiendo la piel del daño por la radiación UV y, por consiguiente, previniendo el cáncer de piel (Gray-Schopfer, Wellbrock y Marais, 2007).

El efecto de la radiación UV está regulado principalmente por variaciones en genes particulares que afectan tanto la respuesta de la piel a la luz UV como al riesgo de desarrollar melanoma. Además de los daños ocasionados por la radiación UV ya mencionados, como los daños al ADN y la formación de ROS, la radiación también afecta la función del sistema inmune y aumenta el nivel de producción de factores de crecimiento. En este contexto, la melanina sintetizada por los melanocitos en respuesta a la radiación UV se transfiere a los queratinocitos y ayuda a absorber y disipar la energía. Los melanomas tienen mayor incidencia en personas sometidas a exposiciones intermitentes a la radiación UV y con quemaduras solares frecuentes que en las que tienen una exposición crónica y moderada. Estos últimos parecieran adquirir una protección contra el daño al ADN causado por la radiación (Gilchrest *et al.*, 1999).

1.4.4. Relación entre el sistema inmune y el microambiente tumoral

1.4.4.1. *Sistema inmune y melanoma*

En melanoma, la observación de tumores en remisión espontánea dio pie a un aumento en el interés de la comunidad científica por entender conceptos como la inmunovigilancia y la inmunoedición (Dunn *et al.*, 2002; Hanahan y Weinberg, 2011; Mittal *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta la relación natural de la piel con la respuesta inmune innata, no es de extrañar que el sistema inmunológico tenga un rol importante en el desarrollo del melanoma. Cuando las células de melanoma comienzan a dividirse de manera aberrante y a generar necrosis celular, liberan grandes cantidades de antígenos que pueden ser detectados por células presentadoras de antígeno. Estas células presentadoras exponen el antígeno a través del complejo mayor de histocompatibilidad de clase dos (MHC-II) en la superficie de la membrana celular. El antígeno es entonces presentado a los linfocitos T que lo reconocen a través del receptor de células T (TCR). Para que las células T puedan activarse es necesaria una segunda señal co-estimuladora del receptor CD28, que se encuentra en la membrana de las células T, el cual se une a CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2) en la superficie de la célula presentadora. Como resultado, se secreta interleuquina 2 (IL-2) y comienza la proliferación de las células T. Este mecanismo es el que desencadena la respuesta inmune adaptativa del organismo, generando células T efectoras y de memoria. Dependiendo de las concentraciones de las distintas citoquinas y otras señales del medio se genera una respuesta de células T CD4 colaboradoras o *helper* (Th por su nombre en inglés) de tipo Th1, Th2, Th17 y T regulatorias (T-reg). Además, se induce la diferenciación de

células T CD8 o citotóxicas que son las encargadas de la respuesta citotóxica del sistema inmune adaptativo (Fig. 4).

Como se mencionó en la **sección 1.2.1.2.**, un hito importante en la inmuno-oncología fue el descubrimiento del punto de control inmunológico CTLA-4, normalmente expresado en la superficie de las células T regulatorias (Leach, Krummel y Allison, 1996; Thompson y Allison, 1997) o células T recientemente activadas (Willsmore *et al.*, 2021), y el de muerte celular programada 1 que se encuentra en la superficie de las células T, B y NK e interacciona con los ligandos PD-L1 y PD-L2, expresados por las células de melanoma. Cuando un linfocito T CD8 reconoce a la célula de melanoma que expresa PD-L1, ocurre la interacción entre PD-1 con su ligando, desencadenando la inhibición de las funciones efectoras del linfocito T, induciendo la anergia de la célula y posibilitando el escape tumoral (Ishida *et al.*, 1992; Freeman *et al.*, 2000; Latchman *et al.*, 2001; Keir *et al.*, 2008). La activación del TCR aumenta tanto la expresión de CTLA-4 como de PD-1, el aumento de la expresión de este último también se da luego de la activación del BCR (receptor de células B). Los inhibidores de puntos de control modulan a las células T, al inhibir CTLA-4 aumenta el número de células T efectoras CD4 y disminuye el número de células T reguladoras, y al inhibir PD-1 aumentan las células T CD8 activadas (Willsmore *et al.*, 2021).

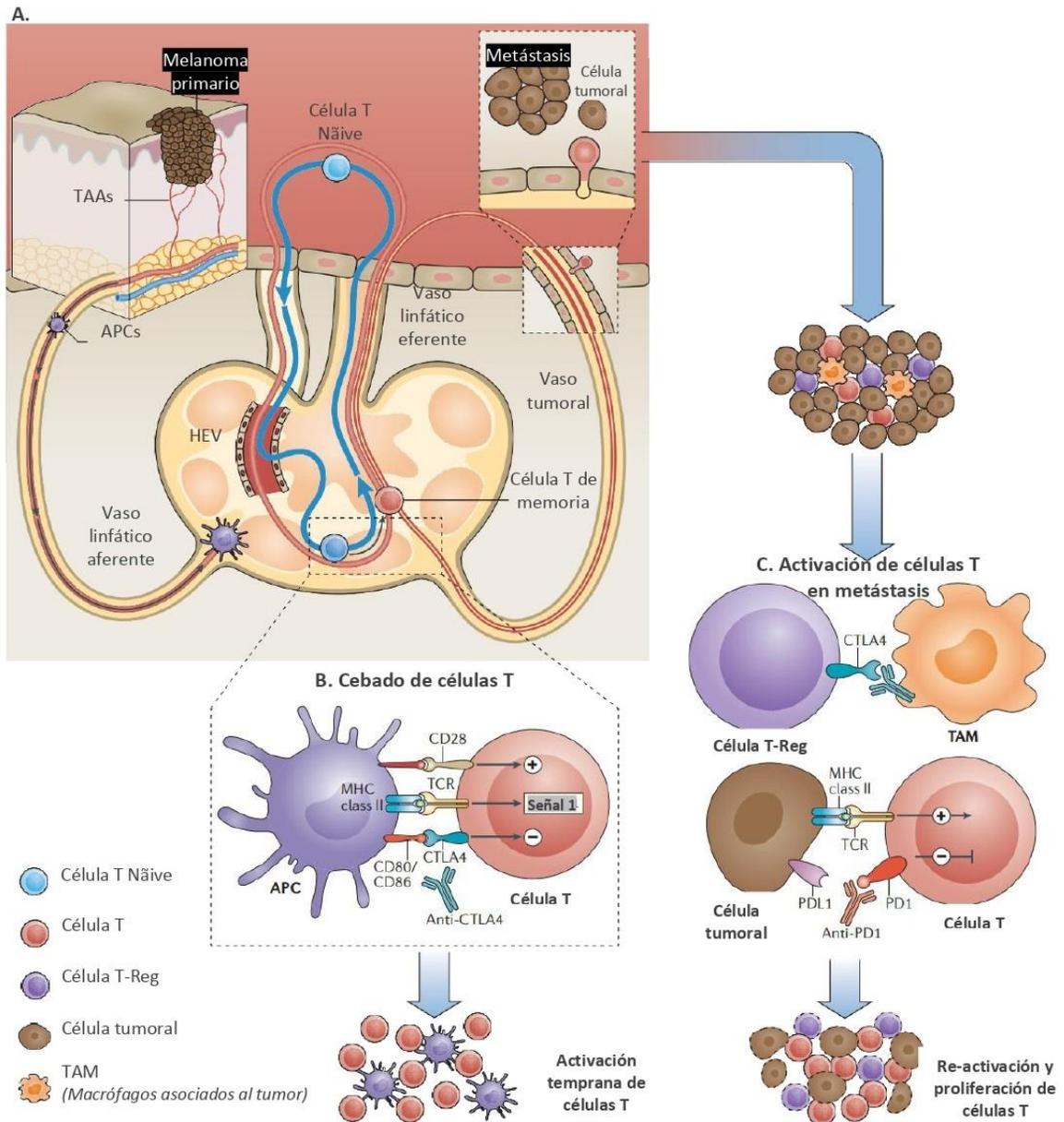


Figura 4: Puntos de control inmunológico y control de la activación de las células T en melanoma. **A.** CTLA-4 y PD-1 modulan la respuesta inmune de las células T en diferentes niveles. El cebado de células T naïve (T-cell priming en inglés) es iniciado por células presentadoras de antígeno (APC). Estas células recolectan antígenos asociados a tumores (TAAs) ubicados en el melanoma primario y migran a través de los vasos linfáticos aferentes a los ganglios linfáticos de la piel, donde presentan los TAAs a las células T naïve, iniciando así la maduración de las células T y una respuesta inmune específica. Las células T naïve circulan permanentemente entre la sangre y los órganos linfoides, y se extravasan a través de

las vénulas endoteliales altas (HEV) para ingresar al área dependiente de células T de los ganglios linfáticos, donde pueden encontrar su antígeno específico presentado por las APC. **B.** Se requieren dos señales para activar las células T naïve con el fin de que se conviertan en células T de memoria; Señal 1: reconocimiento de antígenos por el receptor de células T (TCR); Señal 2: coestimulación. Después de 48 a 72 horas, CTLA-4 se expresa en la superficie de las células T activadas, lo que continúa la interacción coestimuladora y suprime la activación de las células T. Los linfocitos T de memoria tienen distintas moléculas de adhesión que les permiten circular hacia los tejidos periféricos y reactivarse al reencontrarse con el antígeno. **C.** En el melanoma metastásico, la activación de las células T disminuye cuando PD-1 se une a sus PD-L1/PD-L2, que puede ser expresado por células tumorales. CTLA-4 también suprime la actividad de las células T en las metástasis al mejorar la actividad inmunosupresora de las células T reguladoras, que expresan altos niveles de CTLA-4. Los anticuerpos contra CTLA-4 actúan al inicio de la respuesta inmune manteniendo la activación de las células T en los ganglios linfáticos, así como en el sitio del tumor disminuyendo las células T-reg. Los anticuerpos anti PD-1 inducen la reactivación de las células T al evitar la unión de PD-1 con sus ligandos en el sitio del tumor. *Adaptado de Boutros et al., 2016.*

1.4.4.2. *Microambiente tumoral*

Otra área importante de estudio en el último tiempo ha sido el microambiente tumoral (TME por su nombre en inglés *tumor microenvironment*). El TME se encuentra estrechamente relacionado con el sistema inmunológico, ya que el infiltrado inflamatorio del tumor está compuesto de células del sistema inmune. Estas contribuyen a moldear el ambiente tumoral afectando su progresión. Además, el TME está compuesto de factores de activación y supresión de distintas vías, como factores de crecimiento, citoquinas, moléculas inductoras de la angiogénesis, apoptosis o invasión (Hanahan y Weinberg, 2011).

Dado que las citoquinas interactúan con las células inflamatorias y del sistema inmune, la proporción de cada una de ellas cumple un papel importante en la composición del TME. La compleja relación entre las distintas citoquinas presentes en el medio y las células inmunes que conforman el infiltrado implica que se origine una u otra respuesta inmune, debido a que estas citoquinas pueden jugar un rol inmunosupresor o inmunoestimulador. Dependiendo el rol de las diferentes citoquinas y células que se encuentren en el TME, ciertos tipos de células inmunológicas pueden tomar un fenotipo inmunosupresor o no, lo cual repercute tanto en la

progresión de la enfermedad como en la respuesta a los tratamientos. Por este motivo es muy importante el estudio de estas moléculas y su relación con el TME (Messina *et al.*, 2012).

1.4.5. Inmunoterapias en melanoma

Como se describió en la **sección 1.2.1.2.2.**, la utilización de Nivolumab, Pembrolizumab, Ipilimumab e incluso la combinación de terapias fue aprobada por la FDA para pacientes con melanoma, lo cual marcó un hito muy importante en el tratamiento de este tipo tumoral. Estas terapias han demostrado una supervivida libre de progresión y supervivida global prolongadas, con tasas de respuesta de hasta el 45% para los pacientes tratados con monoterapia anti PD-1 y del 60% tratados con una combinación de bloqueo anti PD-1+ CTLA-4 (Domingues *et al.*, 2018).

En la Argentina en el año 2016, Ipilimumab, Nivolumab y Pembrolizumab obtuvieron la aprobación por parte de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) para tratar el melanoma. Poder comprender los mecanismos que subyacen a la sensibilidad hacia la terapia anti CTLA-4 o anti PD-1 es fundamental para entender la resistencia primaria o adquirida a los ICI al igual que determinar biomarcadores capaces de predecir el éxito del tratamiento, lograr la estratificación de pacientes y la disminución de riesgos de padecer efectos adversos.

1.4.5.1. ***Combinación de terapias***

Como se mencionó en párrafos anteriores CTLA-4 y PD-1 son moléculas co-inhibidoras que actúan a través de distintos mecanismos moleculares y en ubicaciones y puntos temporales separados en la evolución de la respuesta inmune mediada por células T. La terapia combinada anti CTLA-4 y anti PD-1 puede conferir mejores resultados clínicos en comparación con la monoterapia. Sin embargo, no se sabe hasta el momento si las terapias combinadas operan de manera complementaria o no, varios estudios han explorado si estas moléculas pueden incluso funcionar de manera sinérgica (Willsmore *et al.*, 2021) (Fig. 5).

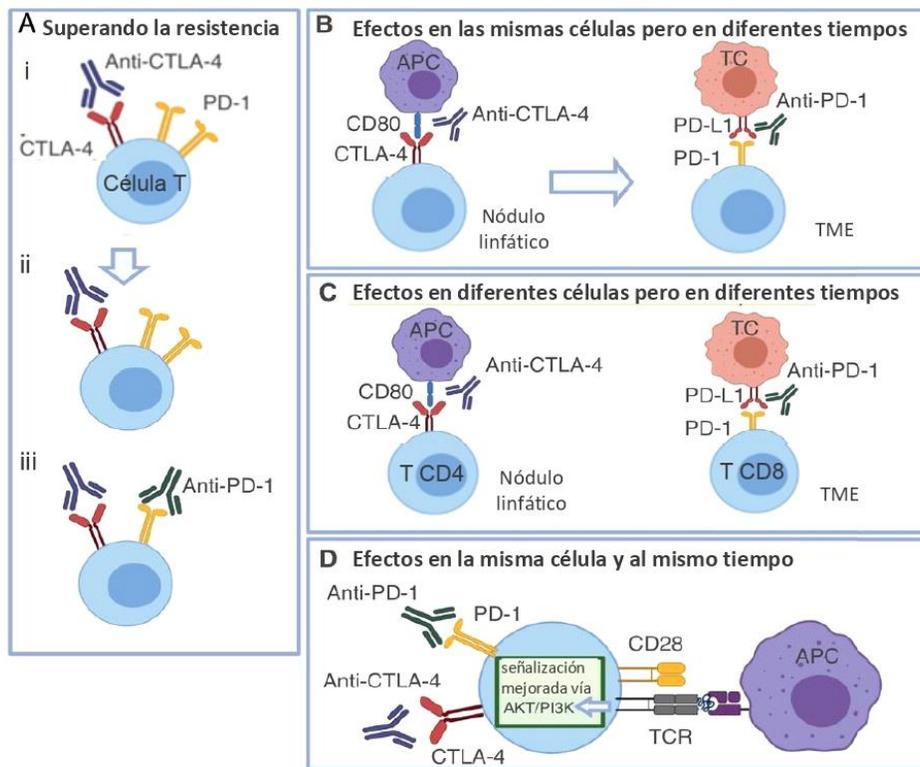


Figura 5: Efectos potenciales de la terapia combinada anti CTLA-4 y anti PD-1 en las células T. **A.** Superar la alta expresión de PD-1 asociada al bloqueo de CTLA-4 de PD-1: **(i-ii)** La monoterapia anti CTLA-4 puede incrementar la expresión de PD-1. Este mecanismo de escape permite la señalización de PD-1 y puede limitar una mayor expansión de la célula T. **(iii)** El bloqueo simultáneo de anti CTLA-4 y anti PD-1 supera esto y limita a las células T que expresan PD-1 y los fenotipos T agotados. **B.** Anti CTLA-4 y anti PD-1 pueden actuar sobre la misma célula T en diferentes tiempos, inicialmente durante la fase de cebado (T-cell priming) en el ganglio linfático (anti CTLA-4) y posteriormente en el microambiente tumoral (anti PD-1) para generar una respuesta efectora. Potencialmente, esto podría permitir una coestimulación sostenida durante un período de tiempo más largo. **C.** Anti CTLA-4 y anti PD-1 pueden actuar sobre diferentes poblaciones de células T en diferentes ubicaciones anatómicas; por ejemplo, anti CTLA-4 puede lograr el incremento de las poblaciones de células T CD4 en nódulos linfáticos, mientras que anti PD-1 puede lograr el incremento de las células T CD8 que infiltran el tumor. **D.** Anti CTLA-4 y anti PD-1 pueden actuar simultáneamente en la misma célula T, ya sea en el sitio de cebado (ganglio linfático) o en el microambiente del tumor (TME); esto puede incrementar y mejorar la coestimulación más allá

de la que se logra con la monoterapia, promoviendo así aún más la activación de las células T. Dado que la señalización intracelular de CTLA-4 y PD-1 converge en las vías PI3K/AKT, esta respuesta puede amplificarse con un bloqueo simultáneo de estos puntos de control. APC: célula presentadora de antígeno; TC: célula tumoral. *Adaptado de Willsmore et al., 2021.*

1.4.5.2. Biomarcadores predictivos de respuesta en melanoma

Los biomarcadores pueden clasificarse como pronósticos o predictivos, un biomarcador pronóstico proporciona información sobre el estado de un paciente durante la enfermedad (sin o con tratamiento), mientras que un biomarcador predictivo proporciona información para predecir el efecto de una intervención terapéutica particular (Oldenhuis *et al.*, 2008). Los biomarcadores predictivos permiten seleccionar el tratamiento más óptimo para un paciente específico entendiendo la biología del tumor. Los biomarcadores para la respuesta de ICI en melanoma se pueden dividir en tres subgrupos: intrínsecos del tumor, del microambiente tumoral, y del huésped (Nebhan y Douglas *et al.*, 2020). Los inhibidores de los puntos de control inmunitarios pueden lograr respuestas duraderas en pacientes con cáncer, pero no proporcionan un beneficio a largo plazo para la mayoría de los pacientes. Por lo tanto, predecir qué pacientes se beneficiarán de los ICI, ya sea como monoterapia o en combinación, continúa siendo un desafío.

1.4.5.2.1. Biomarcadores intrínsecos del tumor

1.4.5.2.1.1. Neotígenos y Carga Mutacional Tumoral

Los tumores pueden expresar antígenos aberrantes que pueden ser reconocidos por el sistema inmunológico (Schumacher y Schreiber. 2015; Seiwert *et al.*, 2015; Rooney *et al.*, 2015). Además, los tumores contienen acumulaciones de mutaciones, lo cual puede generar alteraciones en la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas. Estas proteínas mutadas, exclusivas del tumor que no se encuentran en las células normales, se conocen como neoantígenos (Schumacher y Schreiber, 2015; Chen y Mellman, 2017). Los neoantígenos a menudo son específicos de cada tumor y es poco probable que se compartan ampliamente entre los tumores, incluso aquellos con la misma histología. Si se presentan epítopes de neoantígenos al sistema inmune, estos epítopes generan una respuesta inmune adaptativa selectiva para las células tumorales que puede potenciarse y fortalecerse mediante los inhibidores de puntos de control inmunológico (Schumacher y Schreiber, 2015; Yarchoan *et al.*, 2017).

Existen evidencias, en diferentes estudios, acerca del rol de los neoantígenos en la respuesta a los ICI donde demuestran que una mayor carga de neoantígenos se asocia con una mejor respuesta al bloqueo de CTLA-4 y PD-1 en pacientes con melanoma (Van Allen *et al.*, 2015; Le *et al.*, 2015). El estudio de neoantígenos, a partir del análisis computacional de variantes somáticas, permite calcular la carga mutacional tumoral (TMB por su nombre en inglés *tumor mutational burden*), medida como el número de mutaciones no sinónimas por megabase secuenciada, la cual también se ha asociado con mejores respuestas a los ICI en estudios de melanoma (Van Allen *et al.*, 2015; Snyder *et al.*, 2014). Se ha demostrado que una TMB más alta se correlaciona con un aumento de neoantígenos presentados a través del MHC en las células tumorales, lo que se espera que resulte en un aumento de los niveles de TILs (Hugo *et al.*, 2016).

1.4.5.2.1.2. Exclusión e inestabilidad de células T

Numerosos estudios han revelado los mecanismos moleculares subyacentes a la falta de infiltración de células T en el tumor y la resistencia de los pacientes con melanoma a estas terapias, tales como la vía de señalización activa intrínseca de melanoma Wnt/ β -catenina (Spranger *et al.*, 2015) y el enriquecimiento de mutaciones en PTEN (Peng *et al.*, 2016), mutaciones de pérdida de función en las quinasas JAK1/JAK2 (que están involucradas en la señalización de IFN- γ) y microglobulina β 2 (una subunidad del MHC-I) (Shin *et al.*, 2017; Zaretsky *et al.*, 2016).

1.4.5.2.1.3. Tamaño del tumor

Además del perfil genético del tumor, se ha validado el tamaño del tumor inicial, más alcanzable clínicamente, como biomarcador predictivo en pacientes con melanoma. En un estudio evaluaron el tamaño de los tumores en pacientes con melanoma y observaron que un tamaño tumoral inicial por debajo de 10,2 cm se asoció con una mayor tasa de respuesta y supervivencia global en la cohorte Pembrolizumab. En un análisis multivariado de una cohorte de 459 pacientes también se demostró que los pacientes con un tamaño tumoral inicial aún más bajo y una expresión alta de PD-L1 (mayor al 1% medido por IHC) se asocian de forma independiente con una tasa de respuesta más alta y una supervivencia global más prolongada (Joseph *et al.*, 2018). Se propone que el tamaño del tumor inicial más bajo corresponde a una mayor respuesta inmune en estos tumores más pequeños (Davis *et al.*, 2019).

1.4.5.2.2. Biomarcadores del TME

1.4.5.2.2.1. PD-L1

Debido al mecanismo de acción de PD-1, PD-L1 parece ser la opción más "obvia" como biomarcador predictivo de respuesta. En algunos ensayos clínicos de estas terapias, no sólo en melanoma, es común observar el estado de PD-L1 inicial. En la práctica clínica actual, el estado de PD-L1 se puede obtener fácilmente con IHC, pero el umbral para definir el estado de PD-L1 es muy variable, entre el 1% y el 50%. Esta variación viene acompañada de la variabilidad técnica al momento de realizar el ensayo debido a la especificidad de los anticuerpos disponibles para IHC (Patel y Razelle, 2015). La biología de PD-L1 en sí misma también lo convierte en un biomarcador desafiante: está regulado por numerosas vías, incluidas muchas de las cuales están perturbadas en la transformación maligna (MAPK, PI3K, Akt, HIF1, STAT3, NFκB), es transitoria y está sujeta a error de muestreo significativo (incluso dentro de un solo paciente), y además puede ser expresado por células inmunes en el microambiente (Sanlorenzo *et al.*, 2018). Lo certero es que los pacientes cuyos tumores no expresan PD-L1 en la tinción IHC aún pueden responder a los ICI, por lo tanto, este no sería un criterio excluyente. El ensayo CheckMate-067 demostró una respuesta más baja pero aun así respondieron comparando entre los pacientes tratados con monoterapia o la combinación de ICI con expresión negativa de PD-L1 (Larkin *et al.*, 2015). No ocurre en ciertos tipos de cáncer, como cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama triple negativo, o carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, pero sí en melanoma donde tiene un valor limitado como biomarcador.

1.4.5.2.2.2. Moléculas de superficie celular

Además del estudio de PD-L1 en la superficie celular, en estudios preclínicos con modelos murinos se han estudiado el rol de otras moléculas inhibidoras alternativas, las cuales provocan resistencia a la terapia con anti-PD-1 (Koyama *et al.*, 2016). Estas moléculas incluyen TIM-3, LAG-3 y VISTA planteándose como posibles dianas para inhibidores de puntos de control alternativos a los convencionales. También podrían servir como biomarcadores potenciales para la respuesta de ICI y, de hecho, el aumento de la expresión de TIM-3 en las células T y NK circulantes, antes y durante el tratamiento, se asocia significativamente con una supervivencia global más corta en pacientes con melanoma tratados con Ipilimumab (Tallerico *et al.*, 2016).

1.4.5.2.2.3. Linfocitos infiltrantes del tumor

CD8(+): Múltiples estudios han demostrado que la respuesta a la inhibición de PD-1 en melanoma se puede predecir en base a la proporción de células T en el tumor. Estas células tienden a expresar más PD-1 y CD8, y presentar una mayor clonalidad del receptor de células T (Chen *et al.*, 2016; Daud *et al.*, 2016; Tumeh *et al.*, 2014). En melanoma, se cree que la terapia anti PD-1 induce el rechazo del tumor predominantemente al reactivar las células T CD8(+) que previamente se encontraban en un estado de agotamiento o exhausto. Muchos estudios se han publicado para caracterizar los fundamentos moleculares de los linfocitos en el tumor. Por ejemplo, los perfiles de expresión génica (GEP por su nombre en inglés *gene expression profiles*) de las células T han sido analizados por Ayres *et al.*, en donde se identificó una firma de interferón- γ compuesta de genes relacionados con la presentación de antígenos, la expresión de quimioquinas, y la actividad citotóxica, que son necesarias, pero no siempre suficientes para el beneficio clínico (Ayers *et al.*, 2014). Sade-Feldman *et al.*, utilizando scRNA-seq (por su nombre en inglés *single-cell RNA sequencing*) de células inmunes de 48 muestras de melanoma, clasificaron a las células T CD8 en dos grupos distintos asociados a regresión o progresión del tumor. Su análisis identificó un factor de transcripción clave, TCF7, como un marcador de la respuesta tumoral a anti PD-1 independiente de la infiltración total de células T CD8 en el tumor. Este factor de transcripción es parte de la vía de señalización Wnt/ β -catenina y es crucial para la diferenciación, autorrenovación y persistencia de las células T CD8 (Sade-Feldman *et al.*, 2018).

CD4(+): En otro estudio, describieron la expresión de células T no citotóxicas CD4(+)Foxp3(-)PD-1(+) luego del tratamiento con anti CTLA-4 (post-tratamiento) y postularon que este fenotipo, que es muy similar al de las células T auxiliares foliculares, puede estar asociado con la progresión del tumor. Más recientemente, ese mismo grupo de investigadores aclaró que la combinación anti CTLA-4 y anti PD-1 en realidad tiene un efecto modulador opuesto sobre este fenotipo (Zappasodi *et al.*, 2018). A partir de esto, es razonable plantear la evaluación pre- y post-tratamiento con ICI tanto en monoterapia como en el tratamiento combinado. Si bien la mayoría de las inmunoterapias contra el cáncer se centran en aprovechar la respuesta de las células T citotóxicas CD8 antitumorales, el papel potencial de las células T colaboradoras CD4 se ha mantenido en un segundo plano. Se ha reportado que el

papel multifacético de las células T CD4 desempeña un rol más importante de lo que se pensaba anteriormente en la inmunidad antitumoral (Tay *et al.*, 2021).

T-regulatorias: T-regs, una población caracterizada por células T FoxP3(+)CD25(+)CD4(+), suprime significativamente la respuesta inmunitaria (Tanaka y Sakaguchi, 2017). Además de su función inmunosupresora, pueden ser un objetivo para la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) por Ipilimumab debido a sus altos niveles de expresión de CTLA-4. De hecho, altos niveles de T-regs circulantes pre-tratamiento se asocian con una supervivencia global más prolongada en pacientes con melanoma tratados con Ipilimumab (Martens *et al.*, 2016).

1.4.5.2.2.4. Células supresoras derivadas de mieloides (MDSC)

Las MDSC son una población heterogénea de origen mielóide que se caracteriza por no diferenciarse en granulocitos, macrófagos o células dendríticas (Weber *et al.*, 2018). Se expanden en entornos tumorales y suprimen fuertemente la actividad de las células inmunes, incluidas las células T, a través de una variedad de mecanismos como la producción de NO (óxido nítrico) y la sobreexpresión de arginasa-1. Ambos procesos conducen a la detención del ciclo celular y la disminución en la expresión del receptor de células T. Estudios clínicos y experimentales han demostrado que una alta infiltración de estas células en los tumores se asocia con un mal pronóstico y resistencia a las terapias (Mantovani *et al.*, 2010; Gabrilovich *et al.*, 2012). La presencia de MDSC en sangre se correlaciona significativamente con una supervivencia global más corta en pacientes con melanoma tratados con Ipilimumab o Nivolumab (Weber *et al.*, 2016; Kitano *et al.*, 2014).

1.4.5.2.2.5. MHC-I y II

Otro biomarcador importante de la respuesta a ICI en melanoma son los principales complejos de histocompatibilidad I y II (MHC-I y II). La expresión de MHC-II se correlaciona positivamente con una mejor respuesta a anti PD-1, así como con una mejor respuesta y supervivencia global prolongada. Una mayor expresión de MHC-II también se correlaciona con un mayor infiltrado de células T CD4 y CD8 en el microambiente (Johnson *et al.*, 2016). Más recientemente, un estudio realizado por Rodig *et al* evaluaron la expresión de MHC-I y MHC-II en biopsias pre-tratamiento del CheckMate-064. Este análisis demostró que los pacientes con expresión de MHC-II mayor al 1% se correlacionaban con una mayor probabilidad de

enfermedad estable (SD por su nombre en inglés *stable disease*), respuesta parcial (PR por su nombre en inglés *partial response*) o completa (CR por su nombre en inglés *complete response*) en comparación con enfermedad progresiva (PD por su nombre en inglés *progressive disease*) tras el tratamiento con Nivolumab. Sin embargo, la expresión de MHC-II no predijo la respuesta a la inhibición de CTLA-4 con Ipilimumab, aunque niveles más bajos de expresión de MHC-I (menor al 30%) se correlacionaron con una mayor probabilidad de progresión de la enfermedad luego del tratamiento con Ipilimumab (Rodig *et al.*, 2018).

1.4.5.2.2.6. Índice citolítico

La expresión de granzima A (GZMA) y perforina (PRF1) se asocia con la presencia de infiltrado inmune citotóxico activado y expresión de genes de puntos de control inmune. Un análisis de expresión génica confirmó que la expresión de GZMA y PRF1 en muestras de melanoma se encuentra enriquecida en los pacientes respondedores a anti-CTLA-4 (Van Allen *et al.*, 2015). La expresión y relación entre GZMA y PRF1 se utiliza para comprender el microambiente tumoral. Este índice es calculado a partir de datos de expresión mediante la media geométrica de PRF1 y GZMA, es decir, la raíz cuadrada del producto entre la expresión de PRF1 y GZMA.

1.4.5.2.2.7. Metabolismo inmunológico

Un enfoque emergente para comprender la respuesta a los ICI se basa en las características del metabolismo inmunológico. En un análisis estadístico proteómico basado en espectrometría de masas se halló que los tumores sensibles a ICI tenían mayor fosforilación oxidativa y metabolismo de lípidos en comparación con los tumores resistentes a ICI. Los estudios moleculares demostraron que el aumento del metabolismo de los lípidos aumentaba la presentación de antígenos (Harel *et al.*, 2019).

1.4.5.2.3. Biomarcadores del huésped

1.4.5.2.3.1. Microbioma intestinal

Se ha demostrado, en un panel de pacientes con melanoma metastásico tratados con anti PD-1, que una mayor biodiversidad gastrointestinal se asocia con una respuesta positiva a los ICI (Zitvogel *et al.*, 2018). Se observó abundancia de bacterias de la familia *Ruminococcaceae* en los respondedores en comparación con los no respondedores. Se plantea la hipótesis de que este efecto se debe a una mayor respuesta inmunitaria y antitumoral mediada

por una mayor presentación de antígenos y una mejor función de las células T efectoras. Con el fin de probar su hipótesis, realizaron un trasplante fecal de muestras de heces de pacientes que respondieron o no a ICI en ratones y mostraron que los animales que recibieron trasplante fecal de pacientes que respondieron tuvieron una mejor respuesta al tratamiento anti PD-1 *in vivo* (Gopalakrishnan *et al.*, 2018). Además, en otro estudio sobre la evaluación de las muestras de heces de pacientes con melanoma metastásico antes del tratamiento con ICI mostró que las especies bacterianas *Bifidobacterium longum*, *Collinsella aerofaciens* y *Enterococcus faecium* estaban enriquecidas en los respondedores a ICI (Matson *et al.*, 2018). También se ha reportado que pacientes previos a ser tratados con ICI que tenían un tratamiento antibiótico previo (más de 30 días antes del inicio de la inmunoterapia) tuvieron una respuesta peor que los pacientes sin tratamiento con antibióticos previo (Pinato *et al.*, 2019).

1.4.5.2.3.2. Marcadores de sangre periférica

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) elevada, el recuento de neutrófilos y la proporción de neutrófilos/linfocitos se correlacionan con peor respuesta a la inhibición de PD-1 como agente único o al bloqueo combinado de CTLA-4 y PD-1 (Ferrucci *et al.*, 2016; Rosner *et al.*, 2018).

1.4.6. Terapias dirigidas en melanoma

Como se expuso anteriormente, la proteína quinasa BRAF está mutada en aproximadamente la mitad de los melanomas humanos (Davies *et al.*, 2002). Drogas como Vemurafenib y Dabrafenib, que inhiben BRAF, o Trametinib, que inhibe su sustrato río abajo, la proteína quinasa MEK, mejoran la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global en el 60-80% de los pacientes que sufren de melanoma con BRAF mutado (BRAF-mut) (Flaherty *et al.*, 2010, 2012; Falchook *et al.*, 2012; Hauschild *et al.*, 2012; Long *et al.*, 2012; Sosman *et al.*, 2012; Jang y Atkins, 2014). En el 2014, la FDA aprobó el tratamiento combinado contra BRAF+MEK basándose en los resultados superiores obtenidos en comparación con la monoterapia contra BRAF. La combinación Dabrafenib+Trametinib es ahora la primera opción para el tratamiento de melanoma metastásico. La ANMAT aprobó en Argentina tanto el uso de Vemurafenib como del inhibidor Dabrafenib.

1.4.6.1. *Resistencia a terapias dirigidas*

Aunque las respuestas de los pacientes a estas drogas son alentadoras, la duración del efecto clínico es limitada y la mayoría de los pacientes recaen después de sólo 6-8 meses de control de la enfermedad. Por otra parte, el 20-40% de los pacientes presentan resistencia intrínseca o primaria a las drogas inhibitorias de BRAF/MEK (iBRAF/iMEK) y de este modo pierden su respuesta al tratamiento. La resistencia a inhibidores de BRAF esta mediada por diferentes mecanismos de reactivación de las vías intracelulares de señalización favoreciendo la progresión tumoral (Johannessen *et al.*, 2010; Nazarian *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2012; Girotti *et al.*, 2013; Van Allen *et al.*, 2013). Además, se ha observado que aquellos pacientes que desarrollan resistencia a estas terapias no suelen responder a inmunoterapias como segunda línea de tratamiento. Esto establece nuevas preguntas acerca de los mecanismos subyacentes que no sólo generan resistencia a la terapia dirigida, si no que afectan también a la posible respuesta a otras terapias (Ascierto *et al.*, 2014). Se ha reportado que el desarrollo de resistencia a terapias dirigidas induce cambios en el transcriptoma, proteoma y glicoma de células de melanoma con un consecuente cambio en el microambiente tumoral que adquiere características inmunosupresoras, como un mayor reclutamiento de macrófagos M2 (pro-tumorigénicos) (Hugo *et al.*, 2015), disminución del infiltrado de células T CD8 y de la relación CD8/T-regulatorias (Frederick *et al.*, 2013; Wilmott *et al.*, 2012).

Cabe mencionar el rol del eje lectinas-glicanos, el cual forma un sistema de comunicación integrado y fuertemente regulado en el sistema inmune debido a que las lectinas son las proteínas encargadas de decodificar la información provista por los glicanos al reconocer estas estructuras glicosídicas en la superficie celular. A través de esta interacción, regulan procesos biológicos tales como el ciclo y la muerte celular, proliferación y diferenciación. Este control se basa no sólo en la regulación de la expresión de las lectinas, sino también en su afinidad y reconocimiento selectivo por ciertas estructuras glicosídicas, que resultan de la actividad modulada de glicosidasas y glicosiltransferasas. En este sentido, resultados han demostrado que Galectina-1 (Gal-1), una lectina de unión a β -galactósidos que confiere un estado de inmunosupresión en el tumor (Rabinovich y Toscano, 2009; Rabinovich y Croci, 2012), se encuentra sobre-expresada en células de melanoma resistentes a iBRAF e iBRAF+iMEK, pudiendo ser este incremento el responsable del escape inmunológico al

promover la polarización a macrófagos tipo M2 (Sef Starossom *et al.*, 2012) y apoptosis de células T (Chen *et al.*, 2017).

1.5. Generalidades del cáncer colorrectal

1.5.1. Incidencia a nivel global, origen y factores de riesgo

El cáncer colorrectal (CRC, por su nombre en inglés *Colorectal Cancer*) es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad, relacionada al cáncer, en todo el mundo. A nivel global, hasta el año 2020 según *The Global Cancer Observatory*, existen aproximadamente 1.931.590 personas diagnosticadas con cáncer colorrectal al año, y se estima que este número continuará aumentando. El CRC es una enfermedad heterogénea que se presenta en el colon y el recto, regiones del sistema gastrointestinal. El colon tiene cuatro secciones denominadas colon ascendente, transversal, descendente y sigmoide, y en esta última es donde surge la mayoría de los CRC. Gran parte de estos tumores se desarrollan lentamente a partir de pólipos adenomatosos o adenomas (Levine y Ahnen, 2006). Si este crecimiento anormal, conocido como pólipo, eventualmente se vuelve canceroso, puede formar un tumor en la pared del recto o el colon, y posteriormente crecer hacia vasos sanguíneos o vasos linfáticos, aumentando la posibilidad de metastatizar a otros sitios anatómicos. De los tumores que comienzan en la región colorrectal, más del 95% se clasifican como adenocarcinomas. Estos comienzan en las glándulas productoras de moco que recubren el colon y el recto (Marley y Nan, 2016).

La sobrevida de los pacientes con CRC depende en gran medida del estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico y, por lo general, varía entre una tasa de sobrevida del 70% al 90% a 5 años para pacientes en estadios no-metastásicos, mientras que para los pacientes con CRC metastásico la tasa es del 10% (Hagggar y Boushey, 2009). Generalmente, el riesgo de ser diagnosticado con este tipo de cáncer aumenta excesivamente luego de los 50 años; otro de los factores de riesgo más comunes son la historia familiar, enfermedades intestinales inflamatorias, síndromes hereditarios tal como el síndrome de Lynch o poliposis adenomatosa familiar (FAP por su nombre en inglés *familial adenomatous polyposis*). Además, llevar un estilo de vida no saludable incrementa el riesgo, tal como una dieta alta en grasas, tabaquismo, consumo de alcohol, y escasa actividad física.

1.5.2. Bases moleculares del cáncer colorrectal

Por lo general, la formación de CRC comienza con la transformación del epitelio colorrectal normal en un adenoma benigno y luego progresa a través de la acumulación gradual de múltiples aberraciones genéticas y epigenéticas, que posteriormente conducen a tumores invasivos y metastásicos. Hay tres vías principales asociadas a la progresión del cáncer colorrectal: inestabilidad cromosómica (CIN por su nombre en inglés *chromosomal instability*), inestabilidad de microsatélites (MSI por su nombre en inglés *microsatellite instability*) y fenotipo metilador de islas CpG (CIMP por su nombre en inglés *CpG island methylator phenotype*). La mayoría de los CRC esporádicos (~85%) presentan CIN, con cambios en el número y la estructura de los cromosomas. Los casos esporádicos restantes (~15%) tienen fenotipos de MSI. Sin embargo, el CRC hereditario tiene dos formas bien definidas: los pacientes con FAP (<1%) heredan una copia mutada del gen APC (*adenomatosis poliposis Coli*), mientras que el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPPC por su nombre en inglés *Hereditary Non-polyposis Colon Cancer* o síndrome de Lynch) (1-3%) se caracteriza por MSI, consecuencia de un sistema defectuoso en la reparación de errores del ADN; denominados estos genes en inglés *mismatch-repair genes* (MMR). Las otras formas de CRC hereditario incluyen un síndrome raro llamado síndrome de poliposis hamartomatosa (<1%) y los casos hereditarios comunes causados por mutaciones hereditarias menos penetrantes (32%) (Nguyen y Duong, 2018).

1.5.2.1. ***Inestabilidad genómica***

1.5.2.1.1. *Inestabilidad cromosómica*

En cáncer colorrectal la inestabilidad cromosómica es el tipo más común de inestabilidad genómica, la cual causa cambios en el número y estructura de copias cromosómicas (Lengauer *et al.*, 1997). Estos cambios incluyen ganancias o pérdidas de segmentos cromosómicos, reordenamientos cromosómicos y pérdida de heterocigosidad (LOH por su nombre en inglés *loss of heterozygosity*), lo que da como resultado variaciones en el número de copias de genes (CNV por su nombre en inglés *copy number variations*). Este tipo de inestabilidad causa la pérdida física de una copia WT de algún gen supresor tumoral, como APC, TP53 y SMAD4 (Grady y Markowitz, 2002; DeVita *et al.*, 2008). Además, los tumores CIN se destacan por la acumulación de mutaciones en oncogenes específicos, incluidos KRAS

y BRAF, contribuyendo así a la tumorigénesis de este tipo de cáncer. Según el modelo propuesto por Fearon y Vogelstein, la inactivación de APC ocurre como primer evento, seguida de mutaciones oncogénicas de KRAS en la etapa adenomatosa y, finalmente, la delección del cromosoma 18q y la inactivación de TP53 en el cromosoma 17p (Fig. 6). Una pérdida alélica de alta frecuencia en una región cromosómica específica denota la presencia de un gen supresor tumoral, que incluye APC en el cromosoma 5q, TP53 en el cromosoma 17p, DCC, SMAD2 y SMAD4 en cromosoma 18q. Por el contrario, una ganancia de material cromosómico sugiere la presencia de oncogenes. En cáncer colorrectal, las ganancias en el cromosoma 7 y los brazos cromosómicos 1q, 8q, 12q, 13q y 20q han sido reportados en diferentes estudios. Se propuso que estos cambios cromosómicos están asociados a una ganancia y pérdida de función de genes asociados a tumores ofreciéndoles ventajas que llevan a la conversión progresiva de células normales a tumorales (Nguyen y Duong, 2018).

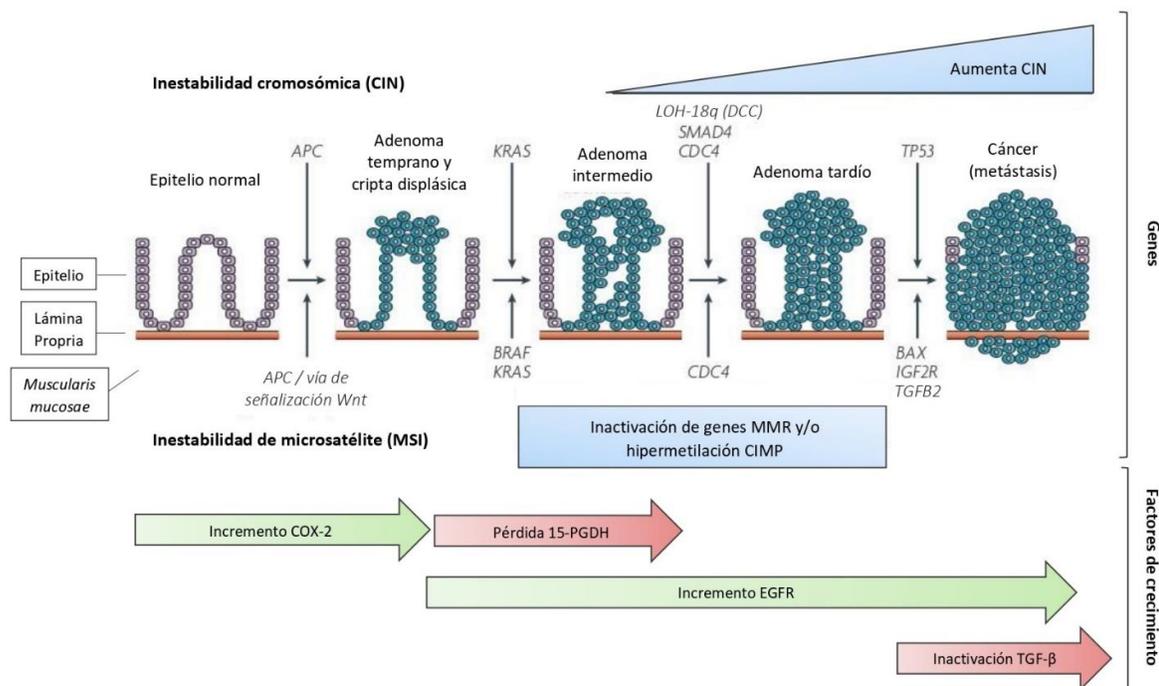


Figura 6: Modelo de progresión adenoma-carcinoma en cáncer colorrectal. La secuencia de adenoma-carcinoma está causada por tres vías principales: CIN (inestabilidad cromosómica), MSI (inestabilidad de microsatélite) y CIMP (fenotipo metilador de isla CpG). Respecto a la progresión de CRC-CIN, el paso inicial es la formación de adenomas, asociado con la pérdida de APC. Los adenomas más grandes y los carcinomas tempranos adquieren

mutaciones en *KRAS*, seguidas de la pérdida de *SMAD4*, que se encuentra río abajo de *TGF-β*, y finalmente mutaciones en *TP53*. Respecto a los CRC con MSI, se cree que el paso inicial implica una alteración en la señalización de *Wnt*. Luego, es probable que ocurran mutaciones en *BRAF*, en lugar de mutaciones de *KRAS*, aunque estas últimas ocurren en una minoría de casos. La dMMR en el CRC esporádico ocurre predominantemente por la disminución de *MLH1* a través de la metilación del promotor, y el estado de MSI (MSI status) aumenta por la selección positiva de células tumorales con microsatélites mutados en *MSH3* y *MSH6*. Se produce una selección positiva adicional para las mutaciones que afectan a los microsatélites en *TGFBR2*, *IGF2R* y *BAX*, que a su vez proporciona un mecanismo de progresión a carcinoma independiente de *TP53*. Las vías clave de los factores de crecimiento que se alteran durante el CRC se muestran en la parte inferior del diagrama. *CDC4*: proteína de control de división celular 4. **Adaptado y modificado con datos obtenidos de Walther et al., 2009; Markowitz y Bertagnolli, 2009; Nguyen y Duong, 2018.**

1.5.2.1.2. Defectos en la maquinaria de reparación del ADN

En un subgrupo de pacientes con cáncer colorrectal, existe la inactivación de los genes MMR, lo cual genera una deficiencia en la reparación del ADN (dMMR por su nombre en inglés *mismatch-repair deficiency*) (Fig. 6 y 7). La inactivación de estos genes puede heredarse (>95%), como en el HNPPC, o adquirirse (15-20%). En pacientes con HNPPC, los defectos en la línea germinal de los MMR (principalmente *MLH1* y *MSH2*) confieren un riesgo de por vida de ser diagnosticados con cáncer colorrectal, no sólo por estas mutaciones sino también por la inactivación somática del alelo parental de tipo WT (Leach et al., 1993; Papadopoulos et al., 1994; Fishel et al., 1993; Bronner et al., 1994; Lynch et al., 2008). Las mutaciones de la línea germinal de otro gen MMR, *MSH6*, atenúa la predisposición al cáncer familiar (Miyaki et al., 1997; Kastanos y Syngal, 2007). En pacientes con CRC esporádico, el silenciamiento bialélico de la región promotora del gen *MLH1* por metilación inactiva la reparación de errores del ADN (Veigl et al., 1998) (Fig. 6 y 7).

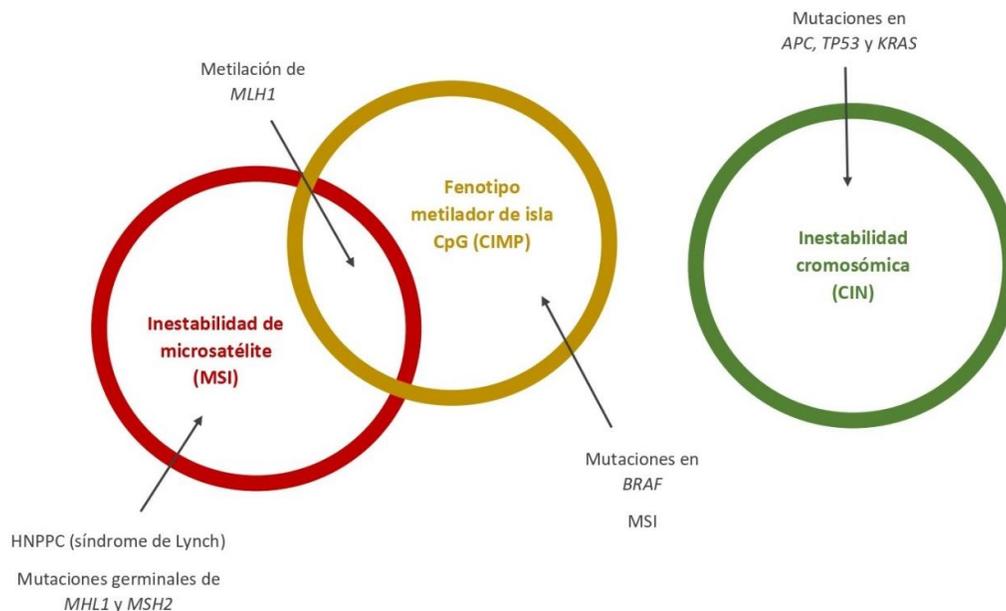


Figura 7: Vías de inestabilidad genética que impulsan las neoplasias colorrectales. Se muestran las relaciones superpuestas que definen las principales vías de inestabilidad genómica en CRC: inestabilidad cromosómica, el fenotipo metilador de isla CpG, y la inestabilidad de microsatélites causada por defectos en los genes de reparación de errores del ADN que se heredan como defectos de la línea germinal (como en el síndrome de Lynch) o son adquiridos somáticamente (por metilación y silenciamiento epigenético de *MLH1*). **Realizado con datos recuperados de Nguyen y Duong, 2018.**

La pérdida de la función de los MMR es fácil de reconocer por el fenómeno asociado de MSI, los microsatélites son secuencias de ADN repetitivas que consisten en repeticiones en tándem. Los pacientes con fenotipo MSI exhiben una alta frecuencia de errores de replicación, particularmente en secuencias de ADN repetitivas, principalmente debido al deslizamiento de la ADN polimerasa (Nguyen y Duong, 2018). La dMMR también se pueden detectar mediante análisis inmunohistoquímico, al identificar la pérdida de proteínas involucradas en la reparación del ADN (Thibodeau *et al.*, 1993). Los tumores caracterizados por dMMR surgen principalmente en el colon proximal y, en casos esporádicos, se asocian con la edad avanzada (Lynch *et al.*, 2008). Estos tumores se clasifican en función del número de microsatélites que presentan inestabilidad, cuando más del 30% de los marcadores presentan inestabilidad se lo considera MSI-alto, aquellos con <30% se definen como MSI-bajo, y aquellos sin inestabilidad

aparente poseen un fenotipo de microsatélites estables (MSS por su nombre en inglés *microsatellite stability*) (Nguyen y Duong, 2018).

En la deficiencia de reparación del ADN (dMMR), genes supresores de tumores, tales como los que codifican TGF- β 2 (receptor de TGF- β tipo II; TGF- β por su nombre en inglés *transforming growth factor- β*) y BAX (proteína X asociada a BCL2), las cuales tienen regiones funcionales que contienen secuencias repetidas en tándem, pueden ser inactivadas (Grady y Markowitz, 2002; DeVita *et al.*, 2008). Una ruta alternativa para el desarrollo de cáncer colorrectal implica la inactivación de la línea germinal de un gen de reparación de escisión de bases MUTYH, también llamado MYH (Kastrinos y Syngal, 2007). La proteína MYH escinde del ADN el producto 8-oxoguanina proveniente del daño oxidativo a la guanina (Kastrinos y Syngal, 2007).

1.5.2.1.3. Hipermetilación del ADN

El silenciamiento epigenético, principalmente mediado por hipermetilación del ADN, es otro mecanismo de inactivación de genes en pacientes con CRC (Kondo e Issa, 2004). Una forma metilada de citosina (5-metilcitosina) define una quinta base del ADN, introducida por metilasas que modifican las citosinas dentro de los dinucleótidos CpG. En el genoma normal, la metilación de citosinas ocurre en regiones de secuencias repetitivas de ADN por fuera de los exones; se excluye en gran medida de las "islas CpG", las cuales son ricas en CpG en las regiones promotoras, de aproximadamente, la mitad de todos los genes. En comparación, en el genoma del cáncer colorrectal, existe una reducción global de la metilación de citosina, pero adquieren hipermetilación dentro de ciertas islas CpG asociadas a promotores de genes supresores tumorales, lo que conlleva al tercer fenotipo CIMP. Esta hipermetilación asociada a promotores puede inducir el silenciamiento epigenético de la expresión génica. En el CRC esporádico con MSI, el silenciamiento epigenético somático bloquea la expresión de MLH1. Los tumores colorrectales esporádicos con MSI se asocian casi exclusivamente con la metilación de MLH1 asociada a CIMP, lo que conduce a la inactivación de este gen. Por el contrario, los casos familiares de MSI (síndrome de Lynch) generalmente son causados por mutaciones de la línea germinal en los genes MMR, que incluyen principalmente MLH1 y MSH2 (Fig. 6 y 7).

1.5.2.2. *Inactivación de genes supresores tumorales mediada por mutaciones*

1.5.2.2.1. *APC*

Los tumores colorrectales adquieren gran cantidad de cambios genéticos, pero ciertas vías de señalización se destacan como factores clave en la formación de tumores (Fig. 7). Uno de estos cambios, la activación de la vía de señalización Wnt, se considera como el evento iniciador en CRC. La señalización de Wnt ocurre cuando la proteína β -catenina se une a factores nucleares para crear un factor de transcripción que regula los genes involucrados en la activación celular (DeVita *et al.*, 2008; Goss y Groden, 2000). El complejo de degradación de β -catenina controla los niveles de β -catenina mediante proteólisis. Un componente de este complejo, APC, no solo degrada a β -catenina, sino que también inhibe su localización nuclear. La mutación más común en CRC inactiva el gen que codifica la proteína APC. Por lo tanto, en ausencia de APC funcional, la señalización de Wnt se activa de manera inapropiada y constitutiva. Las mutaciones de APC en la línea germinal dan lugar a FAP, síndrome hereditario de predisposición a CRC. Mutaciones somáticas y deleciones que inactivan ambas copias de APC están presentes en la mayoría de los tumores y adenomas colorrectales esporádicos. El gen APC también puede inactivarse epigenéticamente mediante la hipermetilación del promotor, ello se ha identificado en el 18% de los casos de carcinoma y adenoma colorrectal primario (Nguyen y Duong, 2018).

1.5.2.2.2. *TP53*

La inactivación de la vía de p53 debida a la mutación de TP53 es el segundo paso genético clave en el cáncer colorrectal. En la mayoría de los tumores, los dos alelos TP53 están inactivados, generalmente por una combinación de una mutación sin sentido (*missense mutation* en inglés; AT por GC) que inactiva la actividad transcripcional de p53 y una deleción cromosómica 17p que elimina el segundo alelo TP53 (Grady y Markowitz, 2002; DeVita *et al.*, 2008). TP53 codifica un factor de transcripción nuclear, en su forma WT regula el ciclo celular y, por lo tanto, funciona como supresor tumoral. La inactivación de TP53 a menudo coincide con la transición de adenomas grandes a carcinomas invasivos. En varios CRC con dMMR, TP53 sigue siendo WT, aunque en estos tumores la actividad de la vía de p53 probablemente esté disminuida debido a mutaciones en el inductor de apoptosis BAX2 (DeVita *et al.*, 2008).

1.5.2.2.3. *Vía supresora tumoral de TGF-β*

La inactivación mutacional de la señalización de TGF-β es un tercer paso en la progresión al cáncer colorrectal. En aproximadamente un tercio de los tumores colorrectales, las mutaciones somáticas inactivan TGF-βR2 (Markowitz *et al.*, 1995; Grady *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 2007). En los tumores con dMMR, TGF-βR2 se inactiva mediante mutaciones de cambio de marco de lectura (Markowitz *et al.*, 1995). En al menos la mitad de todos los tumores colorrectales con MMR-WT, la señalización de TGF-β se anula al inactivar mutaciones sin sentido que afectan el dominio quinasa TGF-βR2 o, más comúnmente, mutaciones y deleciones que inactivan el componente río abajo de la vía TGF-β, SMAD4, o sus factores de transcripción asociados, SMAD2 y SMAD3. Mutaciones que inactivan la vía TGF-β coinciden con la transición de adenoma a displasia de alto grado o carcinoma (Markowitz *et al.*, 1995; Eppert *et al.*, 1996; Grady *et al.*, 1999; Wood *et al.*, 2007; Leary *et al.*, 2008).

1.5.2.3. *Activación de vías oncogénicas*

1.5.2.3.1. *RAS y BRAF*

Varios oncogenes juegan un rol clave en el desarrollo de CRC (Fig. 6). Las mutaciones oncogénicas de RAS y BRAF, que activan la vía de señalización de MAPK, ocurren en el 37% y el 13% de los CRC, respectivamente (Bos *et al.*, 1987; Davies *et al.*, 2002; Kondo e Issa, 2004; Siena *et al.*, 2009). Mutaciones de RAS, principalmente en KRAS, activan la actividad GTPasa que envía señales directamente a RAF. Las mutaciones BRAF señalan la actividad serina-treonina quinasa BRAF, que impulsa aún más la cascada de señalización de MAPK (Siena *et al.*, 2009). Las mutaciones BRAF son detectables incluso en pólipos pequeños (Kondo e Issa, 2004), y en comparación con las mutaciones RAS, son más comunes en pólipos hiperplásicos, adenomas serrados sésiles y tumores de colon proximales, particularmente en aquellos con el fenotipo CIMP (Issa, 2004; Weisenberger *et al.*, 2006; Jass, 2007) (Fig. 7). Las mutaciones de KRAS han surgido como un importante biomarcador predictivo de resistencia a los agentes contra EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), incluidos Panitumumab y Cetuximab (Nguyen y Duong, 2018).

1.5.2.3.2. *PI3K*

Un tercio de los tumores colorrectales poseen mutaciones somáticas en PI3KCA, gen que codifica la subunidad catalítica de PI3K. Las alteraciones genéticas menos comunes que

pueden sustituir a las mutaciones de PI3KCA incluyen la pérdida de PTEN, un inhibidor de la señalización de PI3K, al igual que la amplificación de IRS2 (sustrato 2 del receptor de insulina), un activador río arriba de la señalización de PI3K, y coamplificación de AKT y PAK4, que son mediadores río abajo de la señalización de PI3K (Parsons *et al.*, 2005).

1.5.2.4. Vías de factores de crecimiento

1.5.2.4.1. Regulación de la señalización de prostaglandinas

La activación de las vías de factores de crecimiento es común en este tipo tumoral (Fig. 6). Un paso temprano y crítico en el desarrollo de un adenoma es la activación de la señalización de prostaglandinas. Esta respuesta anormal puede ser inducida por la inflamación o la alta regulación asociada a mitógenos de COX-2, una enzima inducible que media la síntesis de prostaglandina E2. La actividad de la prostaglandina E2 también puede incrementarse por la pérdida de 15-PGDH (15-prostaglandina deshidrogenasa), enzima que limita la velocidad de degradación de las prostaglandinas (Myung *et al.*, 2006; Backlund *et al.*, 2005). En aproximadamente dos tercios de los tumores colorrectales se han encontrado niveles elevados de COX-2, y una pérdida de 15-PGDH en el 80% de esos tumores.

1.5.2.4.2. Receptor del factor de crecimiento epidérmico

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es una proteína soluble que tiene efectos tróficos sobre las células intestinales. Los estudios clínicos han reportado un papel importante de esta señalización a través del receptor EGF (EGFR) en un subgrupo de tumores colorrectales (Saltz *et al.*, 2004; Cunningham *et al.*, 2004; Van Cutsem *et al.*, 2007). EGFR media la señalización activando las cascadas de señalización MAPK y PI3K.

1.5.2.4.3. Factor de crecimiento vascular endotelial

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que se produce en estados de lesión o durante el crecimiento del tejido normal impulsa la producción de nuevos vasos sanguíneos estromales (angiogénesis). Estudios clínicos han sugerido el rol de las vías angiogénicas como las involucradas en el crecimiento y desarrollo de cáncer colorrectal (Hurwitz *et al.*, 2004).

1.5.3. Sistema inmune y cáncer colorrectal

1.5.3.1. *Subtipos moleculares consenso de cáncer colorrectal (CMS)*

El sistema inmunológico tiene un efecto sustancial sobre la progresión del cáncer colorrectal. Con la propuesta de los subtipos moleculares consenso de cáncer colorrectal (CMS por su nombre en inglés *consensus molecular subtypes*) basados en perfiles transcriptómicos, se han planteado múltiples características como responsables del desarrollo del TME y los correspondientes mecanismos de evasión inmunológica (Roelands *et al.*, 2017). Guinney *et al.* propusieron cuatro subtipos bien definidos: CMS1 (MSI-inmune) caracterizado por hipermutaciones, MSI y una fuerte activación inmune; CMS2 (canónico) destacado por CIN y la activación de las vías de señalización Wnt y MYC; CMS3 (metabólico) se distingue por tener mutaciones en KRAS y desregulación metabólica evidente; y CMS4 (mesenquimal), este subtipo discierne del resto por incremento en la expresión de genes mesenquimales, activación de TGF- β , infiltración estromal y angiogénesis (Roelands *et al.*, 2017; Guinney *et al.*, 2017). La composición del TME varía significativamente entre los CMS. Tanto CMS1 como CMS4 presentan altos niveles de linfocitos CD8 citotóxicos y macrófagos. El infiltrado de células estromales es mayor en los tumores CMS4 en comparación con otros CMS. El análisis de expresión génica de quimioquinas, moléculas inflamatorias, genes inmunorreguladores, MHC, factores del sistema de complemento y angiogénesis demostró diferencias significativas entre CMS1 y CMS4, con CMS1 exhibiendo una polarización Th1, y CMS4 mostrando un incremento en la expresión de componentes del sistema de complemento, CCL2, factores angiogénicos y moléculas inmunosupresoras (Guinney *et al.*, 2017) (Fig. 8).

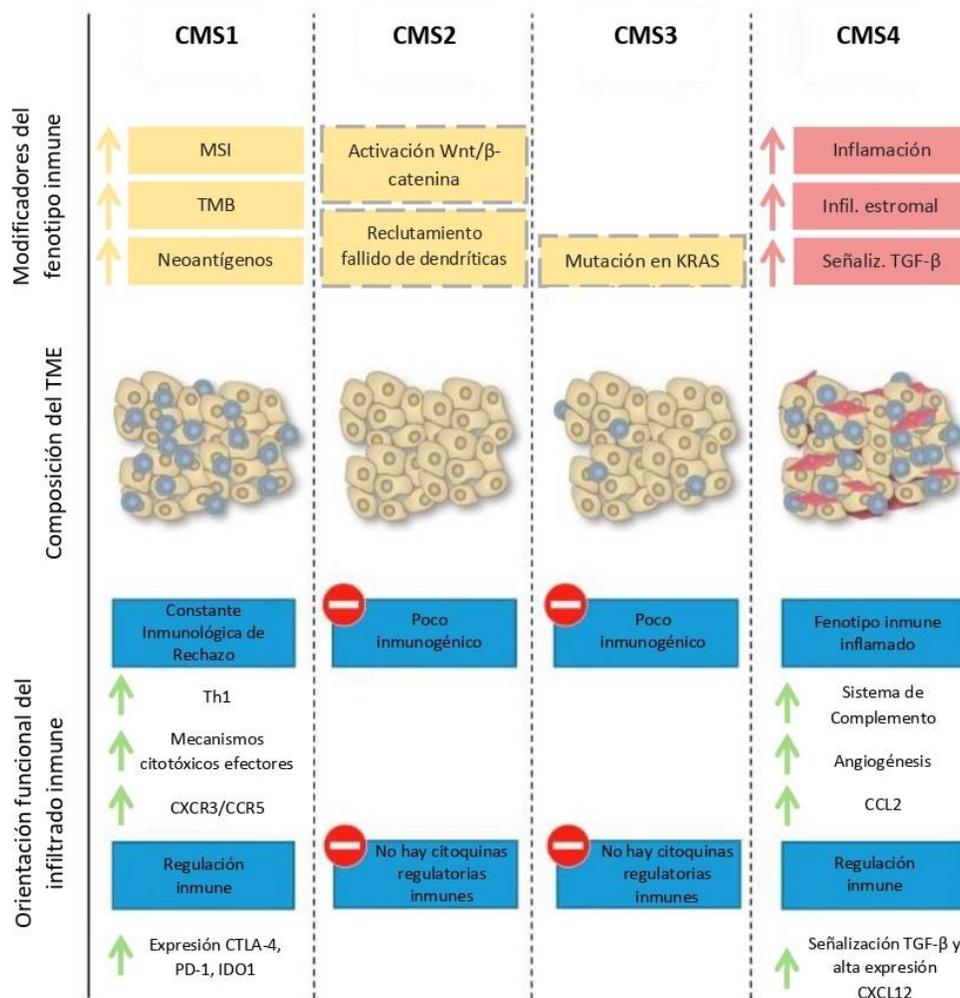


Figura 8: Perfiles de transcripción, mutaciones de los CMS y su asociación con fenotipos inmunes intratumorales característicos. Se muestran los modificadores propuestos del fenotipo inmunológico, ya sean genéticos (en amarillo) o ambientales (en rojo), respaldados por evidencia experimental en CRC (bordes sólidos) o respaldados por evidencia en otros tipos de cáncer (bordes discontinuos en gris). Respecto de la composición del TME, CMS1 y CMS4 se caracterizan por niveles altos de TILs (azul), mientras que CMS4 también contiene fibroblastos (rojo). Mientras que los tumores CMS1 muestran una orientación favorable definida por la expresión de genes de Constante Inmunológica de Rechazo (ICR), asociados con alta expresión contra-activa de moléculas de puntos de control inmunes, los tumores CMS4 tienen un fenotipo inmune inflamado y desfavorable, caracterizado por señalización de TGF- β , activación del complemento y aumento de la angiogénesis. CMS2 y CMS3 son ambos poco

inmunogénicos y se caracterizan por la exclusión de TILs en el sitio del tumor. CXCR3/CCR5: receptor 3 de quimioquina (motivo C-X-C)/receptor de quimioquina C-C tipo 5; IDO1: indolamina-pirrol 2,3-dioxigenasa; CCL2: ligando 2 de quimioquina (motivo C-C); CXCL12: ligando 12 de quimioquina (motivo C-X-C). Adaptado de Roelands et al., 2017.

Se ha observado, en un análisis de expresión génica mediante FACS (por su nombre en inglés *fluorescence-activated cell sorting*) en muestras de CRC aislando linfocitos, fibroblastos, células endoteliales y epiteliales, que los transcritos asociados con un pronóstico clínico deficiente se originan predominantemente en las células estromales y epiteliales asociadas al tumor. Muchas características de este subgrupo de mal pronóstico se superponen con los tumores CMS4, incluido su pronóstico, alta expresión de genes derivados del estroma y señalización de TGF- β . Por esta razón, se plantea que las células estromales determinan el destino de estos tumores, prevaleciendo sobre las células inmunes infiltrantes. Dado el rol inmunosupresor de TGF- β , se especula que esta citoquina es responsable del cambio en la orientación funcional del infiltrado inmune en estos subtipos de cáncer inmunodeficientes (Guinney *et al.*, 2017).

A diferencia de los tumores CMS1 y CMS4 que se caracterizan por altos niveles de infiltrado inmune, aunque antagonistas en cuanto a su orientación funcional, CMS2 y CMS3 carecen de éste. Los tumores CMS1 que evaden al sistema inmune se caracterizan por una alta expresión de PDCD1, CTLA-4 y PD-L1, mientras que los tumores CMS4 exhiben señalización de TGF- β y expresión de CXCL12. Por el contrario, la expresión de todos estos genes inmunosupresores en CMS2 y CMS3 es baja, lo que sugiere un mecanismo diferente de escape inmunológico en estos subtipos. Cada vez hay más evidencias que sugieren el rol de las vías oncogénicas intrínsecas del tumor como las involucradas en la evasión inmune mediante la exclusión de las células T, como por ejemplo la activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Este mecanismo de escape inmunológico también podría aplicarse a los tumores CMS2 caracterizados por la activación de esta misma vía. Otra estrategia de los tumores colorrectales para evadir el sistema inmunológico es la disminución de la expresión de MHC-I, lo que reduce la presentación de antígenos asociados a tumores y el reconocimiento por parte de las células inmunitarias. Dado que los tumores CMS2 y CMS3 representan aproximadamente el 50% de los tumores de colon, la identificación de los posibles mecanismos de evasión inmunitaria es muy importante (Guinney *et al.*, 2017) (Fig.8).

1.5.3.2. *Infiltrado inmune en la metástasis del CRC*

Aunque se ha realizado una extensa investigación para definir el fenotipo inmunológico del sitio primario del tumor colorrectal, la caracterización del CRC en el sitio metastatizado (generalmente en hígado o pulmones) es deficiente (Guinney *et al.*, 2017). Hasta el momento, el conocimiento acerca de la relación entre los perfiles inmunes moleculares del tumor en el sitio primario y metastásico asociado es relativamente escaso. Dado al avance de las terapias, como los ICI, será crucial definir las firmas de genes inmunes en las metástasis tumorales que permitan la selección de la terapia más beneficiosa.

1.5.4. Inmunoterapias en cáncer colorrectal

El pronóstico para los pacientes con CRC metastásico (mCRC) no es beneficioso. Por lo tanto, el desarrollo de tratamientos eficaces para estos pacientes es una necesidad urgente aún insatisfecha. En la última década, mediante el tratamiento con ICI se han obtenido resultados exitosos, logrando respuestas duraderas a largo plazo en tumores sólidos previamente difíciles de tratar, como en melanoma. Como se describió en la **sección 1.2.1.2.2.**, la utilización de Nivolumab, Pembrolizumab e Ipilimumab fue aprobada por la FDA en 2017 para pacientes con cáncer colorrectal con los biomarcadores establecidos (ver Tabla II). En la Argentina en el año 2018, Ipilimumab, Nivolumab y Pembrolizumab obtuvieron la aprobación por parte de la ANMAT para tratar el cáncer colorrectal.

Así como estas terapias son eficaces para los subtipos de CRC que cumplen con dichos biomarcadores, recibiendo el nombre de tumores dMMR-MSI-H, son ineficaces en tumores que son capaces de reparar errores en el ADN (pMMR por su nombre en inglés *mismatch-repair-proficient*) y poseen un fenotipo MSS o MSI-bajo, denominados pMMR-MSI-L. En estos tumores, los bajos niveles de TMB y la falta de células inmunes que infiltran al tumor se han postulado como mecanismos de inmunorresistencia (Galon *et al.*, 2006; Le *et al.*, 2017). Cabe destacar que el mecanismo de acción tanto de CTLA-4 como PD-1 es equivalente al propuesto en la **sección 1.2.1.2.**

1.5.4.1. *Biomarcadores predictivos de respuesta en cáncer colorrectal*

1.5.4.1.1. *dMMR-MSI-H y pMMR-MSI-L*

El CRC se puede clasificar en dos grupos discretos según los patrones de mutación: tumores que tienen una firma dMMR-MSI-H y una alta TMB, y tumores que tienen una firma

pMMR-MSI-L con una baja TMB. Es importante destacar que los tumores dMMR-MSI-H suelen encontrarse muy infiltrados por células inmunes, en particular linfocitos CD8, Th1, CD4 y macrófagos, y tienen un microambiente rico en interferones tipo I en comparación con otros CRC. Aproximadamente el 15% de todos los CRC son dMMR-MSI-H. Los tumores en estadio IV dMMR-MSI-H constituyen sólo del 2 al 4% de todos los mCRC. Los pacientes con este tipo de tumores que hacen metástasis tienen un pronóstico desalentador, pero la expresión de PD-1, PD-L1 y CTLA-4 es elevada. Estas observaciones sugirieron que los CRC dMMR-MSI-H podrían responder de manera eficiente al bloqueo de puntos de control inmunológico. A diferencia de los pacientes con CRC dMMR-MSI-H, los ICI no han demostrado un beneficio clínico en pacientes con CRC pMMR-MSI-L, los cuales constituyen la gran mayoría de los pacientes con mCRC. La falta de reclutamiento de células inmunes al tumor parece ser el obstáculo fundamental para la eficacia (Ganesh *et al.*, 2019).

1.5.4.1.2. *Neoantígenos y Carga Mutacional Tumoral*

La presencia de dMMR-MSI-H en tumores colorrectales, así como en otros tumores sólidos, es un biomarcador claro para la respuesta potencial a los ICI, pero la identificación de biomarcadores predictivos más precisos sigue siendo una necesidad clínica insatisfecha. Los fundamentos y la relación entre la carga mutacional, el rol de los neoantígenos y la respuesta a la inmunoterapia se describió inicialmente para melanoma, y es aplicable a CRC. La carga de mutaciones es casi veinte veces mayor en los tumores colorrectales dMMR-MSI-H que en los pMMR-MSI-L, ello como resultado la generación de neoepítopes en el primero (Tumeh *et al.*, 2014; Rooney *et al.*, 2015).

1.5.4.1.3. *Mutaciones en POLE*

Además de la hipermutación de los tumores causada por la vía dMMR-MSI-H, estudios genómicos han revelado que tumores con mutaciones en el dominio de la exonucleasa POLE también dan como resultado un perfil somático notablemente hipermutado. Las mutaciones recurrentes en POLE como R286R, R286H, V411L y S459F están presentes en 1% a 2% de los tumores CCR, con rara ocurrencia en mCRC. Los tumores con mutación POLE suelen ser MSS, ya que el sistema MMR permanece intacto. Al igual que los tumores inmunogénicos dMMR-MSI-H, los CRC con mutaciones en POLE también muestran un aumento de la infiltración de linfocitos T CD8, expresión de marcadores de células T citotóxicas y citoquinas efectoras, al

igual que alta expresión de PD-1, PD-L1 y CTLA-4. Con respecto a las características clínicas, los tumores con CRC con mutación en POLE generalmente se asocian con un estadio temprano de la enfermedad, con el sexo masculino, una ubicación del tumor en el lado derecho y edad más joven en el momento del diagnóstico. Dada la inmunogenicidad presente en los CRC con mutaciones en POLE, el potencial terapéutico de los ICI para este subtipo de CRC es de particular interés (Ganesh *et al.*, 2019).

1.5.4.1.4. Biomarcadores relacionados a los CMS

Como la mayoría de los subtipos CMS1 muestran los biomarcadores mencionados previamente, estos tumores logran ser candidatos óptimos para la inhibición de los puntos de control inmunitarios. Además, en este subtipo ocurre el comportamiento conocido como constante inmunológica de rechazo (ICR), se hace alusión a este concepto cuando ocurren activaciones de vías específicas asociadas consistentemente con la destrucción específica de tejido. Se requerirá una estrategia diferente para reactivar el sistema inmunológico para los tumores CMS4, ya que tanto los mecanismos inmunosupresores como las células inmunes presentes son diferentes (Fig. 8). Los tumores CMS2 y 3 son típicamente poco inmunogénicos y carecen de infiltración de células inmunitarias, por ende, para revertir estos tumores "fríos" en tumores "calientes", se deben identificar los mecanismos responsables de la ausencia de células inmunitarias intratumorales y proponer estrategias frente a ello.

1.5.4.1.5. Otros biomarcadores para anti PD-1

Como se mencionó en la **sección 1.4.8.2.2.**, el biomarcador más ampliamente investigado es la expresión de PD-L1 tumoral. Curiosamente, en algunos tipos de tumores, como lo es en melanoma, podría ser útil como biomarcador predictivo de respuesta a anti PD-1, pero en CRC no se ha encontrado que la expresión de PD-L1 estuviera asociada con respuesta o supervivencia (Ganesh *et al.*, 2019). Se han descubierto biomarcadores de resistencia al bloqueo de PD-1, como mutaciones adquiridas en JAK1, JAK2 y B2M en pacientes con melanoma, como se menciona en la **sección 1.4.8.2.1.**, pero su rol en pacientes con CRC no está bien definido. Además, la etiología de los tumores dMMR-MSI-H (línea germinal versus evento somático) no parece ser un biomarcador predictivo, ya que los tumores que surgen en pacientes con síndrome de Lynch tienen respuestas similares a la terapia anti PD1 como tumores esporádicos dMMR-MSI-H (Ganesh *et al.*, 2019).

1.6. Ensayos clínicos

1.6.1. Factores de estratificación

Los ensayos clínicos, aunque en teoría utilizan criterios de selección de pacientes similares, a menudo muestran una sorprendente heterogeneidad en las tasas de respuesta y supervivencia. Una explicación probable de este fenómeno son las diferencias en las características de los pacientes o los factores pronósticos, entendiéndolos a estos últimos como una variable que se puede utilizar para estimar la probabilidad de respuesta o supervivencia. Por lo tanto, un componente crítico del informe de un estudio sobre tratamientos contra el cáncer es la presentación de las características iniciales del paciente. La tabla de características de los pacientes debe convencer al lector de que la población incluida en el estudio, en la medida de lo posible, es representativa de la población con este tipo de cáncer visto en la práctica clínica (Sorbye *et al.*, 2007). Sin embargo, aunque se informan muchos de los factores conocidos que tienen valor pronóstico, no hay consenso sobre qué variables clínicas específicas del paciente informar y, a menudo, faltan datos importantes.

Los factores de estratificación son componentes esenciales de los ensayos clínicos. La estratificación adecuada facilita la interpretación simple de los resultados del estudio, el desafío es identificar un subconjunto mínimo de variables clínicamente relevantes para usar como factores de estratificación. El uso inadecuado de las variables de estratificación puede resultar en desequilibrios fortuitos entre los grupos de tratamiento, lo que podría provocar un cuestionamiento de las conclusiones de un estudio (Bajorin, 2004). Entre las variables de estratificación más comunes que utilizan los investigadores en los ensayos clínicos para cáncer se encuentra el sexo, la edad, el número de sitios metastásicos y cuáles son, valores de escalas de estado funcional (*Performance Status* en inglés; la escala más utilizada es *Eastern Cooperative Oncology Group*, ECOG), en algunos casos se informa el estado de PD-L1 en porcentaje, niveles de LDH u otras enzimas como menor o mayor a un valor determinado, número de terapias previas y cuáles fueron, estado de fumador, entre otros.

1.6.1.1. *La edad*

1.6.1.1.1. *Fundamentos y criterios para estratificación de pacientes*

Convencionalmente, "anciano" se ha definido como una edad cronológica de 65 años o más, mientras que los adultos de 65 a 74 años se denominan "ancianos tempranos" y los

mayores de 75 años como "ancianos tardíos". Sin embargo, se desconoce la evidencia en la que se basa esta definición. Se dice que originalmente se remonta a hace más de un siglo en Alemania, cuando el Canciller Bismarck del Imperio Alemán, seleccionó a los 65 años como la edad a la que los ciudadanos podrían participar en el plan nacional de pensiones, ya que se esperaba que la mayoría de la gente falleciera antes de llegar a esta edad. Sin embargo, con los avances recientes en la ciencia y la medicina, la esperanza de vida promedio ha aumentado rápidamente. Ahora, tal definición de "anciano" para incluir simplemente a todas las personas mayores de 65 años podría ya no ser apropiada para esta era con una esperanza de vida de 80 años (Orimo, 2006). Cabe destacar que el proceso de envejecimiento no es uniforme en toda la población debido a las diferencias genéticas, el estilo de vida y la salud en general. Por lo tanto, la edad cronológica no aborda la heterogeneidad observada entre los "ancianos", particularmente en lo que respecta a sus necesidades de farmacoterapia donde la farmacocinética y los factores farmacodinámicos requieren la individualización de los regímenes (Singh y Bajorek, 2014). Considerando lo mencionado, surge la pregunta si se debería utilizar un punto de corte global para la edad (ya sea 65 años u otra clasificación) en todos los tipos de cáncer o no, ya sea para tratar a un paciente con un tratamiento específico, analizar sobrevida o respuesta a tratamientos, o utilizar como criterio de exclusión a los pacientes con cierta edad mayor al punto de corte establecido.

En los ensayos clínicos, tomando en este caso la variable de estratificación **edad**, son los investigadores a cargo los encargados de seleccionar la manera en la cual se presenta la variable clínica. Esto se limita a tres opciones, la primera presentar la edad como variable continua tanto para el grupo en estudio como el control, es decir se presenta como la mediana o la media. Otra forma de presentarla es como categórica por defecto como " ≤ 18 años", " > 18 y < 65 años", " ≥ 65 años". Por último, los investigadores tienen la posibilidad de seleccionar ellos mismos la categoría de edad. Generalmente y en la mayoría de los ensayos ocurre lo descrito en el último caso, donde se suele elegir 65 años como límite entre dos categorías (National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, 2016).

Estos criterios de estratificación son diferentes para cada variable existente que se presenta, tanto las de alcance clínico, que informan las características de los grupos de pacientes previo a someterse al estudio, como las variables de respuesta, sobrevida o efectos adversos. Es importante destacar que en la presentación de resultados de ensayos clínicos ocurre una falta de

información individual respecto de los pacientes siendo esto una gran desventaja al momento de analizar o interpretar los resultados del tratamiento utilizado.

1.6.1.1.2. *Representación de adultos mayores en ensayos clínicos oncológicos*

Los adultos mayores son un segmento creciente en la población oncológica, se estima que la incidencia del cáncer aumentará un 67%, entre 2010 y 2030, en personas con 65 años o más. Sin embargo, un estudio del 2017 demostró que los adultos mayores no han estado proporcionalmente muy bien representados en los ensayos clínicos, especialmente los mayores de 75 años (Singh *et al.*, 2017). Considerando todos los tipos tumorales y terapias oncológicas, no sólo melanoma, CRC e ICI, los pacientes de 70 años o más representan el 42% de la población total de cáncer. Sin embargo, los pacientes de edad avanzada están muy poco representados en los ensayos clínicos que establecen los resultados para la eficacia y seguridad de los tratamientos contra el cáncer. Solo el 24% de los participantes en los ensayos registrados en la FDA tienen más de 70 años, y menos del 10% de los pacientes de este grupo de edad participan en los ensayos clínicos patrocinados por el Instituto Nacional del Cáncer (*National Cancer Institute*, NCI). En consecuencia, gran parte de lo que se sabe sobre los riesgos y beneficios de las terapias para el cáncer se basa en ensayos clínicos realizados en pacientes más jóvenes y sanos, lo cual conduce a diferencias sistemáticas en el tratamiento y disparidades en los resultados en la salud entre las personas mayores y pacientes más jóvenes con cáncer (Sedrak *et al.*, 2021).

A pesar de los esfuerzos de la FDA, a través de documentos preliminares, para promover la inclusión de más adultos mayores en los ensayos clínicos este sigue siendo un problema recurrente. Estos documentos preliminares incluyen recomendaciones específicas con respecto a la inclusión de pacientes con disfunción renal, cardíaca y hepática y de pacientes con neoplasias malignas previas o concurrentes, todas las cuales pueden aumentar con la edad. Es importante que el espectro de adultos mayores incluidos en los ensayos clínicos sea representativo de la población prevista, incluidos aquellos con deterioro fisiológico. Además, tener representados de forma equitativa a los adultos mayores en los ensayos clínicos respecto de los jóvenes es de gran importancia debido a que de esa forma se podrán comprender los resultados y el riesgo-beneficio del fármaco en toda la población de pacientes, que probablemente usará el tratamiento en la práctica clínica. Por lo tanto, la poca representación que tienen los adultos mayores en los ensayos clínicos no se debe a un criterio de exclusión de

los mismos, sino de una decisión del investigador a cargo (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Oncology Center of Excellence, Center for Drug Evaluation y Research, Center for Biologics Evaluation y Research, 2020; Abbasi, 2019).

1.6.2. Medidas tradicionales de variables de eficacia (*clinical endpoints*)

Se ha observado que las curvas de supervivencia obtenidas en los ensayos con inhibidores de puntos de control inmunológicos se comportan de forma diferente a los tratamientos convencionales. Si bien la pendiente no difiere mucho, e incluso se podría observar un efecto perjudicial temprano (o falta de efecto en absoluto) en estudios comparativos con quimioterapia o terapias dirigidas, es en la cola de la curva donde el beneficio de estas inmunoterapias es máximo. En los puntos finales a más largo plazo, la cola de la curva se aplana, identificando una meseta de supervivencia de pacientes con respuestas duraderas, que es lo que hace que estas terapias se distingan del resto de los tratamientos estándar (Champiat *et al.*, 2018). Múltiples estudios con largos períodos de seguimiento han abordado con éxito este concepto (Garon *et al.*, 2019; Topalian *et al.*, 2019; Larkin *et al.*, 2019).

La supervivencia global (OS por su nombre en inglés *overall survival*), definida como el tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la muerte, sigue siendo el criterio de valoración clínico de referencia para los ensayos clínicos citotóxicos oncológicos. La OS mide tanto el efecto del tratamiento como el impacto en la supervivencia de los eventos adversos relacionados con el tratamiento. El resultado es claro y mensurable, y el beneficio de una supervivencia más prolongada es irrefutable. Otro criterio de valoración de eficacia común en los ensayos clínicos ha sido la PFS (por su nombre en inglés *progression free survival*), definida como la duración, en tiempo, desde el inicio del tratamiento hasta el momento de la primera progresión tumoral documentada o la muerte por cualquier causa. Tanto la PFS como la OS requieren un comparador activo como terapia estándar existente o placebo, y además se necesitan grupos grandes y aleatorizados. La mayoría de las aprobaciones de inmunoterapias se han basado en la demostración del beneficio de PFS u OS sobre las terapias estándar como quimioterapia, radioterapia, terapias dirigidas o combinaciones de éstas. Otra medida, no tradicional, es el Criterio de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos (RECIST por su nombre en inglés *The Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*) el cual proporciona un conjunto estandarizado de reglas para la evaluación de la respuesta mediante la disminución del tamaño del tumor, basado en imágenes que están disponibles a nivel mundial e interpretables por la

mayoría de los médicos. Para utilizar RECIST, el tumor debe poder medirse en radiografías, tomografías computarizadas o resonancias magnéticas. Los tipos de respuesta que puede tener un paciente son una CR, PR, PD y SD (Anagnostou *et al.*, 2017)

La mayoría de las variables de eficacia utilizadas para la evaluación de la quimioterapia o la terapia dirigida, como la sobrevida global y la sobrevida libre de progresión, son precisas para medir tratamientos sin intención curativa. Tanto la OS como la PFS son apropiadas para evaluar la actividad de agentes con control rápido del crecimiento tumoral, pero no para terapias en las que su impacto en el control de la enfermedad puede verse sólo con el tiempo. Es importante tener en cuenta que, para los ICI, estas medidas podrían subestimar la actividad de los agentes con enfermedad estable prolongada o respuestas no convencionales en un porcentaje pequeño pero relevante de pacientes. Sin embargo, son las utilizadas en los ensayos clínicos actuales. Teniendo en cuenta lo anterior, el nuevo concepto de sobrevida sin tratamiento (TFS por su nombre en inglés *treatment free survival*) es un criterio de valoración ideal para la terapia del cáncer, ya que considera a los pacientes que sobreviven a largo plazo, que están libres de progresión y sin necesidad de tratamiento adicional. En el ensayo CheckMate-067, el 74% del 52% de los pacientes que permanecieron vivos a los cinco años en el grupo de terapia combinada no recibieron tratamiento (Larkin *et al.*, 2019). Dado que estos pacientes obtienen el mayor beneficio de los ICI, este criterio de eficacia debe introducirse en ensayos de este tipo. Otras métricas de beneficio a considerar son las pruebas de calidad de vida o el tiempo para iniciar el próximo tratamiento, considerando el bienestar de los pacientes de una manera global más significativa, además de la OS y PFS (de Miguel y Calvo, 2020).

1.7. Transcriptómica y cáncer

1.7.1. Introducción a la transcriptómica

La transcriptómica implica el estudio a gran escala de las moléculas de ARN expresadas por las células en un momento determinado. El avance de la tecnología hizo posible pasar de estudiar la expresión de genes individuales al análisis de todo el ARN expresado. A diferencia de lo que pasa con el ADN que es, en su mayor parte, idéntico en todas las células, el ARN que se transcribe activamente en las células es dinámico. Lo cual permite un mayor entendimiento de los procesos biológicos que suceden en las células y en condiciones específicas, y de los mecanismos de regulación de estos. Esta técnica puede también dilucidar la estructura,

modificaciones y variaciones de transcritos individuales en distintos contextos. De esta manera, la transcriptómica es actualmente la herramienta fundamental de la genómica funcional, un campo de estudio que intenta integrar grandes cantidades de datos con el objeto de entender los mecanismos que controlan el fenotipo celular, y en última instancia, el del organismo completo (Cieřlik y Chinnaiyan, 2017), en situaciones normales y patológicas. Las herramientas para el estudio de la expresión de ARN han evolucionado con el paso del tiempo, desde la aparición de las técnicas de *Northern blot* (Alwine, Kemp y Stark, 1977) hasta llegar a las tecnologías de nueva generación de las que disponemos hoy en día.

1.7.2. Secuenciación transcriptómica

1.7.2.1. *RNA-seq*

La secuenciación de ARN (*RNA sequencing* en inglés, RNA-seq) es una técnica de nueva generación que utiliza las nuevas tecnologías de secuenciación de ADN para el análisis transcriptómico. Previo a la secuenciación se debe aislar y purificar el ARN de la muestra a analizar, hay una gran variedad de protocolos para realizarlo dependiendo de la fuente desde la cual se hará la extracción y de las preguntas biológicas a ser interrogadas (Mortazavi *et al.*, 2008). Por ejemplo, en el caso de querer analizar solo el ARNm (ARN mensajero) se realizan purificaciones específicas para obtener solo estas moléculas de ARN. Los protocolos también toman en cuenta de la fragilidad del ARN en comparación con el ADN, además de su susceptibilidad a ser degradado por ribonucleasas. Luego de la purificación, es necesario fragmentar el ARN para obtener las longitudes óptimas según el secuenciador a utilizar, hacer la síntesis de ADN complementario (ADNc) y adicionar los adaptadores de secuenciación.

1.7.2.2. *scRNA-seq*

Las tecnologías basadas en NGS (por su nombre en inglés *next generation sequencing*) para genómica, transcriptómica y epigenómica se centran ahora cada vez más en la caracterización de células individuales. La secuenciación de ARN (RNA-seq) se realiza típicamente en "volumen", lo que se conoce como *bulk* en inglés, y los datos representan un promedio de patrones de expresión génica en miles o millones de células, esto podría ocultar las diferencias biológicamente relevantes entre las células. scRNA-seq representa un enfoque para superar este problema (Olsen y Baryawno, 2018) (Fig. 9). La primera descripción del análisis del transcriptoma por célula única basado en NGS se publicó en 2009, desde este

estudio, ha habido una explosión de interés para entender la heterogeneidad celular (Tang *et al.*, 2009).

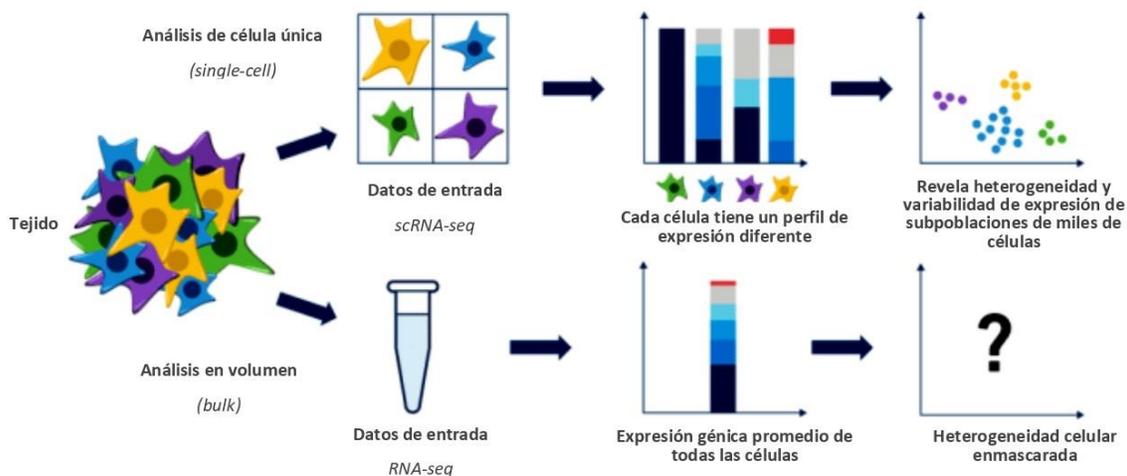


Figura 9: Diferencias entre RNA-seq y scRNA-seq. *scRNA-seq* revela heterogeneidad celular la cual está enmascarada en los métodos de RNA-seq. Adaptado de 10X Genomics, 2017. Disponible en <https://www.10xgenomics.com/blog/>.

1.7.3. La aplicación de la transcriptómica en cáncer

El análisis de la expresión genética ha demostrado ser una herramienta muy valiosa para entender los mecanismos moleculares detrás de la sensibilidad a fármacos y la respuesta a tratamientos. Aunque los tumores evolucionan de manera independiente, la mayoría termina en última instancia mostrando ciertos rasgos similares, conocidos como los sellos distintivos de la enfermedad. Las células cancerígenas poseen funciones proteicas alteradas y transcripción aberrante como consecuencia de mutaciones y cambios epigenéticos. Esto conduce a señalización celular y vías bioquímicas alteradas. Estas características del tumor pueden ser estudiadas mediante estudios de transcriptómica, ya que analizando la expresión de ARN es posible detectar genes o vías biológicas que tengan aumentada o disminuida su expresión en comparación con la referencia. Por otro lado, el campo de la transcriptómica se ha revolucionado con la aparición de las tecnologías de NGS, que incrementan la eficiencia del proceso, permiten analizar una mayor cantidad de muestras en simultáneo y a la vez reducen los costos (Ciešlik y Chinnaiyan, 2017).

El análisis transcriptómico se ha convertido en una modalidad clave para el estudio de los perfiles moleculares a gran escala en líneas celulares de cáncer (como *Encyclopedia of DNA Elements* - ENCODE, *The Cancer Cell Line Encyclopedia* - CCLE, y *Genetech*), de tejidos normales (como el proyecto *Genotype-Tissue Expression* - GTEx y *Human Protein Atlas* - HPA), y tejidos tumorales (como *The Cancer Genome Atlas* - TCGA) (Cieślik y Chinnaiyan, 2017). Estos proyectos con datos públicos disponibles posibilitan el análisis de la expresión de células y tejidos de distintos tipos de cáncer con grandes números de muestras y la comparación con datos de tejidos normales. Esto está acelerando el ritmo del avance en el conocimiento de la enfermedad ya que los centros de investigación de todo el mundo tienen a su alcance datos que de otra manera les sería difícil obtener.

1.7.4. Herramientas computacionales para el estudio transcriptómico del cáncer

La creación de bases de datos públicas con perfiles de expresión genética de miles de muestras tanto tumorales como de tejidos normales, junto a los adelantos en bioinformática y biología computacional, abren el abanico de posibilidades para avanzar en el estudio del cáncer a un ritmo que hubiera sido inimaginable hace unos pocos años atrás. Dentro de las herramientas disponibles para el análisis de información proveniente de estudios de transcriptómica podemos destacar el análisis de expresión genética, el estudio del microambiente tumoral y la composición celular del mismo, y el análisis global e integral de la enfermedad.

1.7.4.1. *Análisis de expresión genética*

Los análisis de expresión genética en cáncer se pueden clasificar principalmente en dos tipos: el análisis de expresión diferencial, que analiza el perfil de expresión del tumor en relación a muestras de tejido normal de referencia u otro tejido a comparar, y el análisis relativo, que compara los niveles de expresión entre los distintos tumores u otras muestras (Cieślik y Chinnaiyan, 2017). El análisis diferencial es útil para buscar cambios en genes específicos o grupos de genes que puedan explicar diferencias fenotípicas y la propia evolución de la enfermedad, al compararlos con los valores de expresión del tejido de referencia. De este análisis se desprende una lista de genes expresados diferencialmente, con la magnitud del cambio y la significancia estadística. A partir de esta información se pueden utilizar algoritmos de análisis para encontrar vías biológicas enriquecidas, es decir, vías que posean una cantidad de genes con expresión diferencial significativa. En cambio, el método de análisis relativo es

útil para caracterizar muestras individuales, siempre y cuando se cuente con una base de conocimiento externo o con datos de referencia. Lo que se busca normalmente es identificar aberraciones distintivas en un tumor individual, y poder clasificar subtipos tumorales en base a distintas firmas de expresión genética. De los dos, el análisis diferencial es el más utilizado en la investigación para generar nuevas hipótesis sobre los mecanismos tumorales, aunque el enfoque relativo tiene un gran uso en el ámbito clínico y la medicina de precisión ya que permite estratificar pacientes según las características individuales de cada tumor.

1.7.4.2. *Análisis funcionales*

Como se mencionó previamente el análisis de expresión diferencial devuelve una lista de genes expresados diferencialmente entre dos condiciones acompañado de un p-valor ajustado y estadísticos relevantes del análisis. Sin embargo, la lista en sí misma no brinda demasiada información, por lo tanto, surgen herramientas bioinformáticas que nos permiten interpretar esa lista, ya sea explorando la anotación de los genes obtenidos para encontrar términos enriquecidos o también analizando el enriquecimiento de ese set de genes que pueden estar o no asociados a una determinada vía de señalización biológica, a una enfermedad o a una firma genética. En este tipo de análisis se utilizan set de genes de diferentes bases de datos para comparar con los genes obtenidos en la lista de expresión diferencial. Una de las más utilizadas es *The Molecular Signatures Database* (MSigDB) (Subramanian *et al.*, 2005; Liberzon *et al.*, 2011), una colección de conjuntos de genes anotados en donde también podemos encontrar una recopilación de otros sets de genes pertenecientes a otras bases de datos (GO, KEGG, Reactome) (Ashburner *et al.*, 2000; Kanehisa *et al.*, 2000; Wu y Haw, 2017). Luego de seleccionar los sets de genes a utilizar se pueden realizar diferentes análisis funcionales, como lo son los análisis de sobre-representación de genes (*Over Representation Analysis* en inglés, ORA) los cuales permiten determinar si algún set de genes está sobre-representado en la lista de genes expresados diferencialmente. Otro ejemplo son los análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (*Gene Set Enrichment Analysis* en inglés, GSEA) que, a diferencia del anterior, utiliza la lista de todos los genes analizados ordenados según los estadísticos obtenidos en el análisis de expresión diferencial previo. De este análisis, se obtiene un puntaje que está relacionado con el grado de enriquecimiento de los distintos sets de genes entre aquellos que se encuentran aumentados o disminuidos de manera significativa con respecto a la referencia. Junto con este puntaje devuelve un p-valor ajustado para cada vía enriquecida o set de genes

que permite establecer la significancia estadística de los resultados (Mootha *et al.*, 2003; Subramanian *et al.*, 2005). Otro análisis de enriquecimiento que se utiliza es el que está basado en redes topológicas, las cuales incorporan al análisis de la lista de total de genes la topología de las redes de interacción de proteínas. Es decir que no sólo tiene en cuenta si los genes de una vía están aumentados o disminuidos, sino que también va a considerar cómo es la relación entre estos genes y en qué posición de la vía se encuentra.

1.7.4.3. *Análisis de inferencia de actividad*

Además de tener en cuenta los niveles de expresión de los genes y su participación en las distintas vías biológicas es importante entender el comportamiento o actividad de los factores de transcripción (FT) y de las vías de señalización. Para ello recientemente han surgido dos herramientas bioinformáticas que nos permiten realizar los análisis mencionados. DoRothEA (*Discriminant Regulon Expression Analysis*) (García-Alonso *et al.*, 2019) es una colección de recursos de dianas de transcripción (regulones) que pueden servir como conjuntos de genes para la inferencia de la actividad de los FT que los regulan. Estos regulones pueden acoplarse con varios métodos estadísticos convirtiéndose en una herramienta de análisis funcional para inferir la actividad de FT a partir de datos de expresión génica. La actividad se calcula considerando no la expresión génica de los propios FT, sino los niveles de ARNm de sus dianas transcripcionales directos. Por su parte, PROGEny (*Pathway Responsive GENes*) (Schubert *et al.*, 2018) estima la actividad de 14 vías de señalización mediante la combinación de conjuntos de genes correspondientes con un modelo lineal surgido de experimentos en donde se perturbaban estas vías para ver su impacto en la expresión génica. De esta manera logra inferir con precisión la actividad de la vía a partir de los datos transcriptómicos.

1.7.4.4. *Análisis del TME*

En el último tiempo se ha estado utilizando cada vez más la información obtenida de estudios transcriptómicos para dilucidar el rol del microambiente tumoral y su composición. Principalmente podemos distinguir dos tipos de acercamientos a este problema: el uso de scRNA-seq y la inferencia indirecta por computadora a partir de datos de RNA-seq. Si bien son cada vez más los estudios de secuenciación de células individuales, el uso de datos de expresión total en una biopsia es lo más utilizado hasta este momento debido a su mayor accesibilidad dentro del ámbito clínico. Este tipo de análisis se realiza principalmente con dos tipos de

métodos: los de enriquecimiento, que utilizan análisis de enriquecimiento como los mencionados anteriormente con set de genes específicos (marcadores) para cada tipo celular que se quiere estudiar, y los denominados de “deconvolución”, que utilizan firmas de expresión genética específicas de distintos tipos celulares para inferir cuáles están presentes en la muestra y en qué proporciones, utilizando modelos de combinaciones lineales (Finotello y Trajanoski, 2018). Entre las aplicaciones más importantes de este tipo de estudios se encuentran la posibilidad de estimar y evaluar el tipo de infiltrado inflamatorio que posee, las poblaciones del sistema inmune presentes, y su relación con el microambiente tumoral. De esta forma es posible alcanzar un conocimiento más profundo de estos factores, con el objeto de evaluar cómo influyen en el desarrollo del cáncer y en las respuestas a las distintas terapias.

Un ejemplo de estos métodos de deconvolución para el análisis de RNA-seq es MIXTURE, un algoritmo de deconvolución desarrollado en colaboración con nuestro grupo para inferir la proporción relativa de células específicas a partir de muestras de tejidos complejos utilizando su perfil de expresión genética (Fernández *et al.*, 2020). Requiere de una matriz con una firma de expresión de referencia que es utilizada para estimar las proporciones de cada tipo de célula de interés presente en la biopsia tumoral. La matriz utilizada por defecto es la LM22 (de 547 genes) la cual contiene la firma de expresión genética de referencia que permite diferenciar 22 tipos de células inmunes que infiltran tumores (Newman *et al.*, 2015). El programa cuenta con un modo relativo y otro absoluto. El modo relativo infiere la fracción relativa de cada tipo celular en una muestra, en donde el total de todos los tipos celulares siempre suma 1. Esto permite comparar la proporción en la que se encuentra un determinado tipo celular en cada muestra. Por otro lado, el modo absoluto realiza una estimación del infiltrado total relacionando la media de la expresión de todos los genes de la matriz (LM22 en este caso) y la media de la expresión del resto de los genes. Al comparar la expresión de estos genes que conforman la firma molecular de estos 22 tipos celulares del sistema inmune contra la expresión total es posible asignar un puntaje a la muestra que refleja el nivel de infiltrado absoluto y es comparable entre las distintas muestras. A partir de este valor, el programa ajusta las fracciones relativas calculadas para cada tipo celular calculando un valor absoluto para cada uno. Esto permite comparar el nivel de infiltrado absoluto de un tipo celular entre distintas muestras.

La integración de estas herramientas junto con el análisis del ADN (genómica) permiten obtener una visión global de la enfermedad. La combinación con la secuenciación de ADN permite evaluar y priorizar los genes que poseen mutaciones o alteraciones en el número de copia según su impacto real dentro de la dinámica tumoral. Los cambios a nivel genómico no necesariamente se relacionan con alteraciones en los niveles de expresión, y por lo tanto en las funciones biológicas. Por eso, es imprescindible la integración de ambos enfoques, aumentando de esta manera el potencial para entender los mecanismos biológicos que gobiernan el desarrollo y el escape tumoral.

1.7.5. Transcriptómica y medicina personalizada

La transcriptómica ha demostrado ser de suma utilidad para investigar la compleja biología del cáncer. La utilidad clínica de RNA-seq ha sido demostrada por una serie de programas de secuenciación en los que mediante esta tecnología se identificó un gran número de eventos genéticos procesables, es decir, potencialmente sensibles a una terapia dirigida. Aun así, la secuenciación de ADN dirigida es actualmente el método de elección para muchas aplicaciones clínicas en oncología de precisión. El ADN es un analito muy estable y, por lo tanto, es muy adecuado para el diagnóstico molecular. Aunque los resultados de los paneles de ADN más grandes, como por ejemplo MSK-IMPACT, son suficientes para guiar a la mayoría de los pacientes hacia drogas aprobadas por la FDA, muchos pacientes no responden a la terapia o se ven afectados por efectos adversos graves (Cieślik y Chinnaiyan, 2017).

En el contexto de la investigación en inmuno-oncología, es cada vez más claro que tanto la inmunogenicidad del tumor como el infiltrado inmune asociado son fundamentales para una respuesta positiva a las inmunoterapias. Debido a la complejidad de la respuesta inmune adaptativa y la naturaleza dinámica de la evolución y escape tumoral, es improbable que un único gen pueda predecir la respuesta a un tratamiento. En este sentido, el análisis transcriptómico puede dar una visión más precisa de los cambios que van sucediendo a lo largo del tratamiento y puede asistir en la búsqueda de biomarcadores de respuesta a inmunoterapias a través del estudio de firmas moleculares de expresión genética (Chen *et al.*, 2016). Además, el análisis del infiltrado inflamatorio y la composición de células del sistema inmune pueden servir como complemento al análisis de la expresión tumoral, dándole a la transcriptómica un valor inmenso en este campo de investigación.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

El presente trabajo de investigación, que conforma mi Proyecto Final de Licenciatura, tiene como objetivo realizar un análisis del impacto en la sobrevida libre de progresión, la sobrevida global y la respuesta a terapias de pacientes con diferentes tipos tumorales tratados con inhibidores de puntos de control inmunológico anti PD-1, anti PD-L1 y anti CTLA-4 respecto de las variables clínicas disponibles reportadas en ensayos clínicos, tal como la edad, sitios metastásicos, estatus de fumador, entre otras, de los pacientes. Para esto, nos planteamos analizar tanto datos genómicos como transcriptómicos de biopsias de pacientes tratados, disponibles en bases de datos públicas, mediante herramientas bioinformáticas (*in silico*). Asimismo, planteamos un abordaje experimental (*in vitro*) con el fin de estudiar el rol de Galectina-1, una lectina con un rol inmunosupresor, tanto a nivel de proteínas como de ARN mensajero en líneas celulares de melanoma, humanas y murinas, sensibles y resistentes a terapias dirigidas con inhibidores de BRAF y MEK. Nuestro objetivo general es expandir el conocimiento acerca de la respuesta a inmunoterapia en pacientes con cáncer identificando variables clínicas capaces de predecir el éxito de estas terapias, en combinación con biomarcadores establecidos que lo respalden.

2.2. Objetivos Específicos

Los objetivos específicos de este proyecto son:

- Analizar la sobrevida de pacientes tratados con inhibidores de punto de control inmunológico de interés teniendo en cuenta diferentes variables clínicas que puedan influir o no en la respuesta a estas terapias.
- Estudiar la relación entre las variables clínicas que influyen en la sobrevida y los biomarcadores predictivos de respuesta reportados (intrínsecos del tumor, del huésped y del TME) tanto en las cohortes de descubrimiento como de validación, permitiendo así una estratificación más precisa y exacta de pacientes candidatos para los ICI.
- Caracterización del microambiente tumoral teniendo en cuenta composición celular, vías biológicas activas, actividad de factores de transcripción, y expresión diferencial de genes tanto en el *bulk* como a nivel de célula única.

- Caracterización de las células de melanoma humanas y murinas resistentes a terapias dirigidas en cuanto a la expresión de inmunomoduladores, tal como Galectina-1, a través de técnicas de laboratorio.

3. Hipótesis

Las inmunoterapias, específicamente los inhibidores de puntos de control inmunológico, se consideran uno de los principales avances en el tratamiento del cáncer. A pesar de su éxito, solo un subconjunto de pacientes obtiene una respuesta benéfica, lo que conlleva a la búsqueda de biomarcadores predictivos. Estos biomarcadores se han explorado gradualmente desde el punto de vista intrínseco del tumor, su microambiente y del huésped. Han existido controversias acerca de si la eficacia de estos inhibidores difiere entre pacientes jóvenes y adultos, o mismo entre mujeres y hombres, pero con evidencias inconclusas (Yang *et al.*, 2020; Ye *et al.*, 2020).

En melanoma, otro hito importante previo a las inmunoterapias, fueron los fármacos de molécula pequeña para tratar a estos pacientes. Aunque las respuestas son alentadoras, la resistencia intrínseca y adquirida siguen siendo un problema clínico persistente, como se describió en la **sección 1.4.6.1.** y tiene como consecuencia resistencia cruzada a la inmunoterapia. Es por esto que existe una necesidad urgente de entender los mecanismos que impulsan la resistencia a las inmunoterapias.

Por lo tanto, nos planteamos las siguientes *hipótesis de trabajo*:

- A. *La supervivencia libre de progresión y global en pacientes tratados con agentes anti PD-1, anti PD-L1, anti CTLA-4 o la combinación de éstos se asocia a variables, como la edad y otras variables de alcance clínico, que pueden afectar a la respuesta de las terapias.*
- B. *En melanoma, el desarrollo de resistencia a iBRAF e iMEK genera un microambiente tumoral inmunosupresor, siendo Galectina-1 uno de estos moduladores que sostiene la resistencia cruzada a las inmunoterapias.*

4. Materiales y Métodos

4.1. Recolección de datos: ensayos clínicos y pacientes individuales

4.1.1. Ensayos clínicos

Se consideraron los meta-análisis de los autores Wallis *et al.*, Yang *et al.*, y Ye *et al* para obtener información sobre ensayos clínicos disponibles y actualizados de cáncer tratados con inhibidores de puntos de control inmunológico. Además, se realizó una búsqueda exhaustiva en la base de datos *Pubmed* a fin de obtener la mayor cantidad posible de ensayos clínicos para el análisis, utilizando los términos *immune checkpoint inhibitor*, *immune checkpoint blockade*, *PD-1*, *PD-L1*, *CTLA-4*, *ipilimumab*, *tremelimumab*, *nivolumab*, *pembrolizumab*, *atezolizumab*, *durvalumab*, *avelumab*, *clinical trials*, *cancer*. Para su inclusión, los estudios tenían que cumplir con los criterios que se muestran en la Tabla III.

| Requisitos | |
|------------|--|
| 1 | Ensayos clínicos de inmunoterapias (anti PD-1, anti PD-L1, anti CTLA-4 o la combinación de éstas) para tratamiento del cáncer en fases I, II y III. |
| 2 | Datos disponibles del cociente de riesgos (HR) e intervalo de confianza 95% (IC 95%) tanto para la supervivencia global como la supervivencia libre de progresión según la edad, <i>smoking status</i> (estado de fumador), <i>metastatic sites</i> (sitios metastásicos) o alguna otra variable clínica relevante de los pacientes. |
| 3 | Datos disponibles de la cantidad de pacientes en cada grupo a comparar tanto para la supervivencia global como la supervivencia libre de progresión según la edad, <i>smoking status</i> (estado de fumador), <i>metastatic sites</i> (sitios metastásicos) o alguna otra variable clínica relevante de los pacientes. |
| 4 | En el caso de la edad, el criterio de estratificación debía ser 65 años ya que, de acuerdo a la búsqueda realizada, es el más utilizado. |

Tabla III: Criterios de inclusión para los análisis de ensayos clínicos. *En caso de no cumplir con los requisitos detallados, el ensayo clínico fue descartado para el análisis.*

Se extrajeron los datos de las variables clínicas mencionadas, los cocientes de riesgo necesarios, los intervalos de confianza del 95%, el año de publicación, el primer autor, el tipo de cáncer, la línea de tratamiento y los controles. Se encontraron más de 50 estudios en *Pubmed*, pero de éstos sólo 34 fueron los que cumplieron con las condiciones necesarias para desarrollar el análisis, de los cuales 14 corresponden a cáncer de pulmón de células no pequeñas [NSCLC] (Antonia *et al.*, 2018; Barlesi *et al.*, 2018; Carbone *et al.*, 2017; Fehrenbacher *et al.*, 2018; Gandhi *et al.*, 2018; Hellmann *et al.*, 2019; Herbst *et al.*, 2016; Jotte *et al.*, 2020; Paz-Ares *et*

al., 2018; Reck *et al.*, 2016; Reck *et al.*, 2019; Rittmeyer *et al.*, 2016; Willemijn *et al.*, 2020; West *et al.*, 2019), 2 estudios a cáncer de pulmón de células pequeñas [SCLC] (Paz-Ares *et al.*, 2019; Horn *et al.*, 2018), 6 estudios a melanoma [SKCM] (Larkin *et al.*, 2018; Hodi *et al.*, 2010; Hodi *et al.*, 2016; Larkin *et al.*, 2019; Robert *et al.*, 2015; Ribas *et al.*, 2015), 3 estudios a carcinoma de la unión gastroesofágica [GOJC] (Kato *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2017; Shitara *et al.*, 2018), 2 a cáncer renal [RCC] (Rini *et al.*, 2019; Motzer *et al.*, 2018), 1 estudio a cáncer urotelial [URO] (Bellmunt *et al.*, 2017), 1 estudio a cáncer de cabeza y cuello [HNSC] (Cohen *et al.*, 2019), 1 estudio a cáncer de mama [BRCA] (Schmid *et al.*, 2019), 1 estudio a cáncer colorrectal [CRC] (Eng *et al.*, 2019), 1 estudio a cáncer de esófago [EC] (Kojima *et al.*, 2020), 1 estudio a carcinoma hepatocelular [HCC] (Finn *et al.*, 2020), 1 estudio a mesotelioma [MESO] (Maio *et al.*, 2017).

Cabe destacar que tanto las variables clínicas extraídas de los ensayos clínicos (ver Tabla V) como los datos acerca de los brazos de tratamiento (Fig. 10-13; ver Tablas VI-VIII) se encuentran en la **sección 5.2.** del presente trabajo acompañando a los resultados obtenidos.

4.1.2. Datos de pacientes a nivel individual

La obtención de datos de pacientes a nivel individual fue a través de bases de datos públicas como *cBioPortal*, TCGA y *Pubmed* utilizando los mismos términos que en la sección anterior. Además, como requisito adicional debían contar con datos transcriptómicos, genómicos o proteómicos para realizar los correspondientes análisis de biomarcadores. Para su inclusión, los estudios tenían que cumplir con los criterios que se muestran en la Tabla IV.

| Requisitos | |
|------------|--|
| 1 | Disponer de datos individuales de pacientes con distintos tipos de cáncer en estadios avanzados (III o IV) tratados con inmunoterapias (anti PD-1, anti PD-L1, anti CTLA-4 o la combinación de éstas). |
| 2 | Datos disponibles de la supervivencia global y libre de progresión (en días, meses o años) junto con el censor (1 = vivo o remisión; 0 = fallecido o progresión, dependiendo de la supervivencia analizada). |
| 3 | Datos de alguna de las variables clínicas: edad, historia de tabaquismo, sitios metastásicos o alguna otra variable relevante. |
| 4 | Datos pre y post-tratamiento, preferentemente previo al tratamiento. |
| 5 | En caso de no disponer de datos de supervivencia pero sí de variables clínicas, se incluyeron de igual manera para el uso en la validación de análisis con biomarcadores. |

Tabla IV: Criterios de inclusión para los análisis de los pacientes con diferentes tipos de cáncer a nivel individual. *En caso de no cumplir con los requisitos detallados, el ensayo clínico fue descartado para el análisis.*

Se extrajeron los datos de todas las variables mencionadas, el año de publicación, el primer autor, el tipo de cáncer, la línea de tratamiento específica, y datos de biomarcadores. Para las cohortes preliminares de descubrimiento, que cumplían con los requisitos 1 al 4, se tuvieron en cuenta 10 estudios, y los tipos de cáncer involucrados fueron diez: cáncer de cabeza y cuello (Samstein *et al.*, 2019), cáncer colorrectal (Samstein *et al.*, 2019), cáncer esofagogástrico (Samstein *et al.*, 2019), glioma (Samstein *et al.*, 2019), cáncer de mama (Samstein *et al.*, 2019), cáncer de origen primario desconocido (Samstein *et al.*, 2019), cáncer renal (Braun *et al.*, 2020; Samstein *et al.*, 2019), cáncer de vejiga (Miao *et al.*, 2018; Samstein *et al.*, 2019), cáncer de pulmón de células no pequeñas (Hellmann *et al.*, 2018; Miao *et al.*, 2018; Rizvi *et al.*, 2015; Samstein *et al.*, 2019) y melanoma (Gide *et al.*, 2019; Hugo *et al.*, 2016; Sade-Feldman *et al.*, 2018; Samstein *et al.*, 2019; Snyder *et al.*, 2014; Van Allen *et al.*, 2015). La información relevante acerca de las terapias involucradas y la cantidad de pacientes en cada tipo tumoral se encuentra en la **sección 5.3.** (ver Tabla IX) acompañada con los resultados obtenidos.

Como se verá en la **sección 5.3.** del presente trabajo, se obtuvieron resultados significativos con las cohortes de descubrimiento Gide *et al.* de melanoma tratados con la combinación anti PD-1+CTLA-4 y Samstein *et al.* de cáncer colorrectal tratados con anti PD-1, ergo como cohortes de validación se utilizaron datos de TCGA y estudios con datos de biomarcadores tanto para melanoma (Snyder *et al.*, 2014; Van Allen *et al.*, 2015; Hugo *et al.*, 2016; National Cancer Institute and National Human Genome Research Institute, 2016; Auslander *et al.*, 2018; Sade-Feldman *et al.*, 2018; Gide *et al.*, 2019 pre-anti PD-1) como para cáncer colorrectal (Yaeger *et al.*, 2018; Vasaikar *et al.*, 2019; Giannakis *et al.*, 2016; National Cancer Institute and National Human Genome Research Institute, 2016).

4.2. Programas y algoritmos para el análisis bioinformático

Para llevar a cabo los análisis bioinformáticos descritos a continuación se ha utilizado el lenguaje de programación de código abierto y gratuito R (www.r-project.org). Se ha utilizado el paquete de *Bioconductor* (www.bioconductor.org), que dispone de una biblioteca de librerías

diseñados para el análisis de datos biológicos. Para el análisis de sobrevida global y libre de progresión se utilizaron las librerías *survminer* y *survival* (Kassambara, Kosinski y Bieck, 2021; Therneau, 2020). El análisis de mutaciones se hizo mediante *maftools* (Mayakonda *et al.*, 2018). Para el análisis de expresión diferencial se utilizaron las librerías *edgeR* (Robinson *et al.*, 2010), *dplyr* (Wickham *et al.*, 2021), *ComplexHeatmap* (Gu *et al.*, 2016), *Glimma* (Su *et al.*, 2017). El análisis GSEA se realizó mediante *fgsea* y se utilizó la librería *msigdb* para obtener los sets de genes requeridos (colección *Hallmark*; colección de genes curados C2 de vías canónicas de *KEGG* y *REACTOME*; colección C5 de *Gene Ontology*). Los análisis de inferencia de actividad de factores de transcripción y vías de señalización se realizaron mediante los paquetes *dorothea* y *progeny*, respectivamente, y las librerías *tidyr* (Wickham, 2021), *tidyverse* (Wickham *et al.*, 2019) y *patchwork* (Pedersen, 2020). Para el análisis de scRNA-seq se utilizó el paquete *Seurat* (Stuart *et al.*, 2019). Para la creación de gráficos se utilizó *ggplot2* (Wickham, 2016), *ggpubr* (Kassambara, 2020), *pheatmap* (Kolde, 2019). Para el gráfico de la RT-qPCR se utilizó el programa *GraphPad Prism* versión 8 para Windows (*GraphPad Software*, San Diego, California USA, www.graphpad.com).

4.3. Análisis de los ensayos clínicos

Se realizó un enfoque hábil o *deft approach* (Fisher *et al.*, 2017) en el cual se evalúa solo la interacción dentro del ensayo, y no entre ensayos, en este caso para cada tipo tumoral específico. Este enfoque se adhiere al principio de evaluar el efecto de interés medido dentro de cada ensayo relevante. Por lo tanto, evaluamos el efecto de una variable clínica dada, como por ejemplo la edad, calculando la razón entre los cocientes de riesgo o *hazard ratios* (HR) de la sobrevida global (o sobrevida libre de progresión) entre pacientes menores a 65 tratados con inmunoterapia y control, y pacientes mayores a 65 años tratados de la misma forma. Esta interacción brinda información acerca de la sobrevida estudiada en pacientes menores o mayores a 65 tratados con inmunoterapia. Lo mismo se realizó para los sitios metastásicos y el estado de fumador del paciente, teniendo en cuenta que los grupos eran: metástasis presente en un órgano o no, y para el caso del tabaquismo, fumador, no fumador o ex-fumador. El código utilizado para este análisis se encuentra reportado en Ye *et al.* y los cocientes de riesgo utilizados fueron extraídos de los ensayos clínicos mencionados previamente.

4.4. Análisis de sobrevida

Las curvas de sobrevida Kaplan-Meier se modelaron mediante la función *survfit()*. Se utilizó la prueba de rango largo bilateral o *two-sided long-rank test* para comparar las curvas de sobrevida Kaplan-Meier. Los cocientes de riesgo (HR) se calcularon mediante el modelo de riesgos proporcionales de Cox, utilizando la función *coxph()*, y se informó el IC del 95%. En el caso específico de la edad, para hacer más eficiente el cálculo de los puntos de corte se realizaron iteraciones mediante un bucle *for* utilizando las mismas funciones descritas anteriormente.

4.5. Análisis del infiltrado inmune por RNA-seq y scRNA-seq

Los análisis de la composición del infiltrado inmune en las muestras tumorales de RNA-seq se realizaron mediante el algoritmo de deconvolución MIXTURE implementado en R (Fernández *et al.*, 2020). Se utilizaron para comparar las proporciones relativas de las poblaciones celulares inmunes. En la **sección 1.7.4.4.** se puede encontrar más información acerca del algoritmo.

Respecto a los porcentajes de células de cada grupo definido por los autores (Sade-Feldman *et al.*, 2018; Jerby-Arnon *et al.*, 2018) en los datos de scRNA-seq de pacientes con melanoma, se calculó el total de células de los grupos menores y mayores a 62 años, y con ello se calculó el porcentaje de cada población celular en cada grupo de edad; en los grupos de las células T CD8 se realizó lo mismo, con la salvedad de que no se calculó el porcentaje dentro del total de células sino dentro del total de las células T CD8.

4.6. Expresión diferencial en el *bulk* y célula única, y análisis funcionales

Para realizar el análisis de expresión diferencial en las muestras del Gide *et al.* (RNA-seq) se partió de las *counts*, y se realizó el análisis utilizando los paquetes mencionados previamente. A partir de la tabla generada de genes con los estadísticos se realizaron los análisis funcionales GSEA, PROGENy y DoRotheA explicados en la **sección 1.7.4.3.**

Para el análisis de expresión diferencial en cada grupo de célula inmune (Sade-Feldman *et al.*, 2018; Jerby-Arnon *et al.*, 2018) se utilizó el paquete *Seurat*, y los filtros para considerar válidos los resultados fueron: (1) genes detectados en al menos un 50% de las células de alguno de los dos grupos de pacientes, menores o mayores a 62 años; (2) genes para los cuales haya menos de un 25% de diferencia en el porcentaje de células que los expresan de cada grupo; (3)

$fold-change > 1$, lo mismo que $\log_2(FC) = \log_2(2)$, interpretándolo como un aumento del doble en la expresión de un grupo respecto al otro.

4.7. Líneas Celulares

Las líneas celulares A375, SKMEL28 y COLO829 son líneas humanas provenientes de la *American Type Culture Collection* cultivadas en *Dulbecco Modified Eagle Medium* (DMEM) o RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%. La línea celular RG13.2 es una línea celular murina. Las líneas resistentes A375, SKMEL28 y COLO829 ya habían sido generadas en el laboratorio cultivando las células a lo largo de tres meses en medio con las drogas (Dabrafenib 0,5 μ M y Trametinib 0,05 μ M). Respecto a la resistencia de la línea celular murina, fue generada en el laboratorio a partir de un tumor de ratón tratado previamente con las drogas mencionadas, momento en el cual no respondió más a la terapia se extrajo el tumor para establecer la línea celular. Las líneas celulares utilizadas cuentan con el gen BRAF mutado (BRAFFV600E).

4.8. Inmunodetección de proteínas por Western blot

4.8.1. Obtención de extractos celulares

Los extractos celulares fueron tratados 6 horas antes con las drogas Dabrafenib 0,5 μ M y Trametinib 0,05 μ M. Los pasos descritos a continuación se realizaron siempre sobre cubeta con hielo. Las placas de células fueron provistas para luego realizar la lisis celular utilizando *Buffer Ripa* (Sigma) con ayuda de un raspador, además a los extractos se les agregó tanto inhibidor de proteasas (100X) como de fosfatasas (50X). Previo a la utilización del buffer de lisis se removió el medio con pipeta y se realizaron tres lavados con solución fisiológica. Obtenidos los extractos en tubos *ependorf* 1,5 mL, se centrifugó y se tomó el sobrenadante donde se encontraban las proteínas. Luego, se almacenaron hasta el momento de su uso a -20 °C.

4.8.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas totales se realizó por BCA utilizando el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (*ThermoFisher Scientific*). Se agregaron 100 μ L de cada muestra diluida 1:100 en agua y 100 μ L de cada estándar de BSA (0, 5, 10, 25, 50, 100 ng/ μ L de BSA) en pocillos separados de placa de 96 pocillos. Los estándares de BSA fueron preparados con agua y según instrucciones del fabricante. Luego de obtener la placa con las muestras y la curva se

la llevó a bloque térmico por 30 minutos tapada con papel aluminio. Transcurrido ese tiempo se leyó la placa en lector de ELISA. La concentración de proteína de la muestra se determinó por extrapolación de los valores de absorbancia de la muestra en la curva estándar. A partir de la ecuación de la curva estándar se calcularon las concentraciones en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas en cada muestra.

4.8.3. Preparación de las muestras para Electroforesis en gel

Tras la cuantificación de las muestras, se mezclaron 18 μg de cada una de ellas con *buffer Laemmli 4X (Bio-Rad Laboratories)* conteniendo β -mercaptoetanol como agente reductor, y se hirvió a 100°C durante 5 minutos.

4.8.4. Geles de poliacrilamida y Western blot

Se sembraron 25 μL de extractos celulares en geles de SDS- PAGE al 12,5% de poliacrilamida, junto a marcadores de peso molecular (*Amersham™ECL™Rainbow™Marker - Full Range*) y se separó electroforéticamente en una cuba Mini- PROTEAN III (*BioRad Laboratories*) aplicando 90 V durante el pasaje de las proteínas por la porción concentradora del gel y 120 V en la porción resolutive del gel. Las proteínas así separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (*Amersham, GE Healthcare*) aplicando un voltaje de 90 V durante una hora en una cuba de transferencia del sistema Mini- PROTEAN III (*BioRad Laboratories*), en hielo. Finalizada la transferencia, la membrana fue bloqueada mediante tratamiento con leche descremada al 5% en TBS-*Tween* 0,05% durante 60 minutos a temperatura ambiente en agitador suave. Posteriormente se removió la solución de bloqueo, se realizó un lavado con TBS-*Tween* 0,05% y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (*anti-human Gal-1, Cell Signaling; anti-human ppERK 1/2, Cell Signaling; anti-human ERK 1/2, Sigma*) en leche descremada al 5% en TBS-*Tween* 0,05% durante 60 minutos en agitador. Se realizaron tres lavados con TBS- *Tween* 0,05% sobre la membrana, de 5- 10 minutos cada uno. Luego la membrana fue incubada por 120 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (*anti-rabbit* o *anti-mouse*) unido a la peroxidasa del rábano (HRP) diluido en TBS- *Tween* 0,05%. Seguidamente se realizaron 5 lavados con TBS- *Tween* 0,05% por 5 minutos cada uno y se reveló utilizando el equipo G:BOX.

4.9. PCR cuantitativa de transcripción reversa en tiempo real (RT-qPCR)

4.9.1. Purificación de ARN total

El ARN total de las líneas celulares en monocapa se extrajo con el reactivo *TRIzolTM Reagent* (*ThermoFisher Scientific*) según protocolo indicado por el fabricante, en algunos casos con ayuda de raspador. Las muestras de ARN total purificado fueron cuantificadas utilizando el espectrofotómetro a pequeña escala *Nanodrop 2000* (*ThermoFisher Scientific*). La integridad y calidad del ARN fue evaluada por la relación entre las absorbancias 260/280.

4.9.2. Retrotranscripción (RT)

La reacción de retrotranscripción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante del kit, *SuperScriptTM IV First-Strand Synthesis System*. La reacción enzimática de retrotranscripción se realizó con 2 µg de ARN total. El ADNc obtenido se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

4.9.3. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Las reacciones de qPCR fueron realizadas en placas de 96 pocillos *Multiplate* (*BioRad Laboratories*). En resumen, se incubó 1 µL del cDNA obtenido previamente con 10 µL de la mezcla maestra *SYBR-Green* (*ThermoFisher Scientific*) y la mezcla de cebadores correspondientes para cada reacción de interés. El control interno utilizado para la normalización en la cuantificación de ARN mensajero (ARNm) fue GADPH. Las reacciones fueron incubadas en el equipo de PCR en tiempo real *CFX96-Real Time System/C1000 Touch-Thermal Cycler* (*BioRad Laboratories*). Se utilizó el siguiente programa de PCR: 10 min. a 95°C; 39 ciclos de 15 segundos a 95 °C, 15 segundos a 58 °C y 60 segundos a 60 °C; y por último un aumento de 0.5 °C cada 5 segundos desde 65 °C hasta llegar a los 95 °C para evaluar las curvas de fusión (Curvas de *Melting*). Todas las muestras se evaluaron por duplicado técnico. El análisis de los datos se realizó con el programa Bio-Rad CFX Manager 3.1. Se utilizaron los valores de expresión en unidades arbitrarias calculados por el programa según el Ct (*Threshold Cycle* o Ciclo Umbral) detectado en cada muestra y se normalizaron contra los valores de GADPH.

4.10. Estadística

Se consideraron significativos resultados con un p-valor menor a 0,05. En el caso de pruebas múltiples se realizó un ajuste del p-valor por FDR (por su nombre en inglés *False Discovery Rate*; tasa de falsos descubrimientos). En el caso de los resultados GSEA se consideraron significativos los p-valores ajustados menores a 0,01.

Para los análisis de respuesta (RECIST) en melanoma y el estado de MSI en los pacientes con cáncer colorrectal, se utilizó la prueba exacta de Fisher. Prueba de significancia estadística utilizada en el análisis de tablas de contingencia (2x2), útil para datos categóricos. La V de Cramer se utilizó para comprender la fuerza de la asociación entre dos variables, la cual permite obtener un índice con valor máximo (que indica la mayor asociación entre variables) igual a 1, mientras que el valor mínimo es 0 e indica no asociación. Las fuerzas de asociación se consideran de 0,10-0,30 pequeña, de 0,30-0,50 mediana, y de 0,50 o más, fuerte.

Para los análisis de TMB, LDH, carga de neoantígenos y comparaciones entre las proporciones de poblaciones celulares entre dos grupos, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica. En el caso de que haya más de dos grupos para comparar se utilizó la extensión de la misma, la prueba de Kruskal-Wallis.

5. Resultados

5.1. Resultados obtenidos en laboratorio de mesada (wet-lab)

Para corroborar y evaluar la resistencia de las células A375, SKMEL28, COLO829 y RG13.2) a inhibidores de BRAF (Dabrafenib) y MEK (Trametinib) se realizó un *Western blot* a partir de los extractos de proteínas proveniente de los respectivos cultivos celulares. Además, se llevó a cabo la extracción de RNA de líneas celulares de melanoma humanas (A375, SKMEL28, COLO829) y murinas (RG13.2) sensibles y resistentes a inhibidores de BRAF y MEK para realizar una PCR cuantitativa de transcripción reversa en tiempo real (*quantitative reverse transcription real time PCR*, RT-qPCR) con el fin de observar los niveles de expresión de Gal-1.

5.1.1. Evaluación de la resistencia a terapias dirigidas y niveles de Galectina-1 en líneas celulares de melanoma humanas y murinas

Para el *Western blot*, se utilizó ERK total como control de carga y pp-ERK (ERK fosforilado) para corroborar la resistencia en presencia de las drogas (Dabrafenib y Trametinib). Se observa la resistencia de las células resistentes en medio con Dabrafenib y Trametinib (DT DT) ya que hay banda (pp-ERK) en el revelado (Fig. 34).

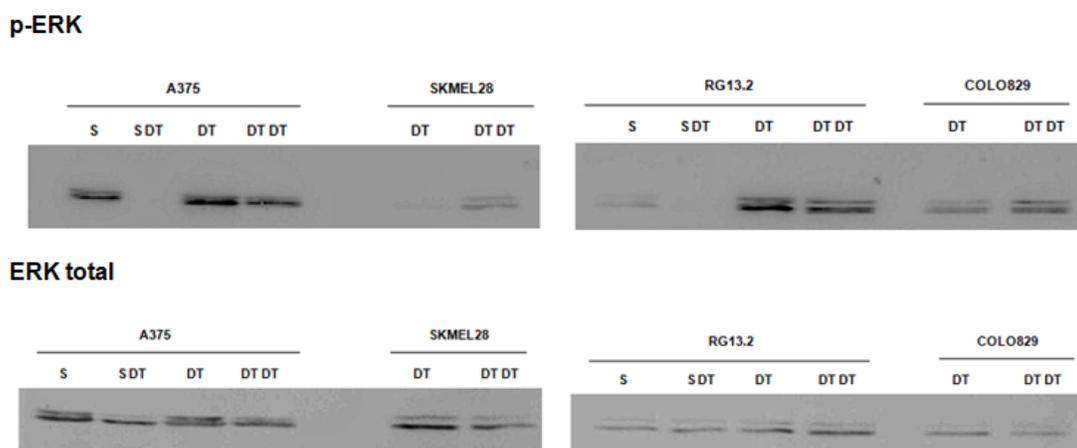


Figura 34: *Western blot* correspondiente a pp-ERK y ERK total. (S) hace referencia a las células sensibles sin drogas en el medio; (SDT) a las células sensibles con drogas en el medio; (DT) a las células resistentes sin drogas en el medio; (DT DT) a las células resistentes con drogas en el medio.

Se realizó una RT-qPCR para cuantificar los niveles de ARN mensajero de Gal-1 en las líneas A375, SKMEL28, COLO829 y RG13.2 sensibles y resistentes a Dabrafenib y Trametinib. Todos los genes fueron normalizados contra GADPH (*Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase*) para hacer el análisis. Dos de las líneas celulares (COLO829 y SKMEL28) no se muestran ya que no se observaron picos en las curvas ni de Gal-1 ni GADPH. Sin embargo, en las únicas muestras que se obtuvo un resultado, de la RT-qPCR, se puede observar el aumento de la expresión de Galectina-1 en las células resistentes a la droga (Fig. 35).

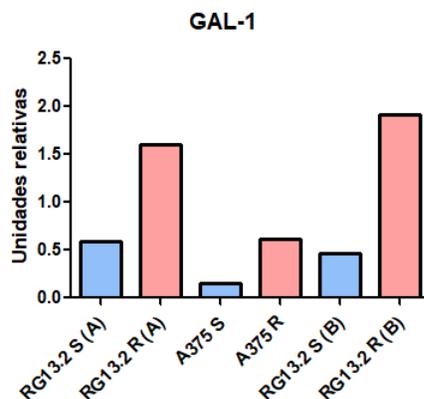


Figura 35: Gráfico de barras representando en unidades relativas la expresión de Galectina-1 en líneas celulares resistentes y sensibles. RG13.2 (A) y (B) son réplicas biológicas. (S) indica que son las células sensibles mientras que (R) resistentes.

No se pudieron realizar réplicas técnicas ni biológicas de las muestras debido a las condiciones que se vivieron durante el 2020 y actualmente, sólo fue posible una réplica biológica de la línea celular RG13.2 murina. Debido a la imposibilidad de continuar con los experimentos en laboratorio, por los motivos mencionados y de público conocimiento (COVID-19), se realizó el cambio de Propuesta de Tema para mi tesina de Licenciatura (Proyecto Final de Ingeniería, P.F.I.); ergo se la orientó hacia un enfoque bioinformático (*in silico*), siempre centrándonos en el ámbito de la inmuno-oncología. A continuación, se exponen los resultados obtenidos referidos al tema anterior con el fin de cumplir con los objetivos del trabajo y corroborar nuestra hipótesis propuesta (ver **Objetivos e Hipótesis**).

5.2. Análisis en ensayos clínicos para evaluar la asociación de variables clínicas con la sobrevida global y libre de progresión en pacientes con cáncer tratados con inmunoterapias

Con el fin de evaluar los efectos de las diferentes variables clínicas reportadas en diversos ensayos clínicos (fases I, II y III) de pacientes con distintos tipos de cáncer tratados con inmunoterapias anti PD-1, anti CTLA-4, anti PD-L1 o la combinación de éstas, y evaluar si cumplen un rol predictivo en la respuesta a inmunoterapia, se analizaron 34 ensayos clínicos (ver Tabla V) que cumplieron con los criterios de inclusión descritos en la **sección Materiales y Métodos**. Obtuvimos información acerca de la edad, la historia de fumador del paciente y si presentaban metástasis en hígado o cerebro. Para los análisis de sobrevida global las variables disponibles dentro de estos ensayos fueron la edad (n = 25), estado de fumador del paciente (n = 15), y si tenían o no metástasis en hígado (n = 7) o cerebro (n = 10). Para los análisis de sobrevida libre de progresión (PFS) las variables disponibles dentro de estos ensayos fueron la edad (n = 13) y el estado de fumador del paciente (n = 5).

| Ensayos clínicos | Sobrevida global | | | | Sobrevida libre de progresión | |
|-----------------------------------|------------------|------------|------------|---------|-------------------------------|------------|
| | Edad | Tabaquismo | Metástasis | | Edad | Tabaquismo |
| | | | Hígado | Cerebro | | |
| Antonia <i>et al.</i> , 2018 | Sí | Sí | No | No | No | No |
| Barlesi <i>et al.</i> , 2018 | Sí | Sí | No | No | No | No |
| Bellmunt <i>et al.</i> , 2017 | Sí | Sí | Sí | No | No | No |
| Carbone <i>et al.</i> , 2017 | Sí | Sí | No | No | Sí | Sí |
| Cohen <i>et al.</i> , 2019 | No | Sí | No | No | No | No |
| Eng <i>et al.</i> , 2019 | Sí | No | No | No | Sí | No |
| Fehrenbacher <i>et al.</i> , 2018 | Sí | Sí | No | Sí | No | No |
| Finn <i>et al.</i> , 2020 | Sí | No | No | No | Sí | No |
| Gandhi <i>et al.</i> , 2018 | Sí | Sí | No | Sí | Sí | Sí |
| Hellmann <i>et al.</i> , 2019 | No | No | Sí | Sí | No | No |
| Herbst <i>et al.</i> , 2016 | Sí | No | No | No | Sí | No |
| Hodi <i>et al.</i> , 2010 | Sí | No | No | No | No | No |
| Hodi <i>et al.</i> , 2016 | Sí | No | No | No | No | No |
| Horn <i>et al.</i> , 2018 | Sí | No | Sí | Sí | Sí | No |
| Jotte <i>et al.</i> , 2020 | No | Sí | Sí | No | No | No |
| Kang <i>et al.</i> , 2017 | Sí | No | Sí | No | No | No |
| Kato <i>et al.</i> , 2019 | Sí | Sí | No | No | No | No |
| Kojima <i>et al.</i> , 2020 | Sí | No | No | No | No | No |
| Larkin <i>et al.</i> , 2018 | Sí | No | No | Sí | No | No |
| Larkin <i>et al.</i> , 2019 | Sí | No | No | No | Sí | No |
| Maio <i>et al.</i> , 2017 | Sí | No | No | No | No | No |
| Motzer <i>et al.</i> , 2018 | No | No | Sí | No | No | No |
| Paz-Ares <i>et al.</i> , 2018 | Sí | No | No | No | Sí | No |
| Paz-Ares <i>et al.</i> , 2019 | Sí | Sí | No | Sí | Sí | No |
| Reck <i>et al.</i> , 2016 | No | Sí | No | Sí | No | Sí |
| Reck <i>et al.</i> , 2019 | No | Sí | No | Sí | No | No |
| Ribas <i>et al.</i> , 2015 | No | No | No | No | Sí | No |
| Rini <i>et al.</i> , 2019 | Sí | No | No | No | Sí | No |
| Rittmeyer <i>et al.</i> , 2106 | No | Sí | No | Sí | No | No |
| Robert <i>et al.</i> , 2015 | Sí | No | No | No | Sí | No |
| Schmid <i>et al.</i> , 2019 | No | No | Sí | Sí | No | No |
| Shitara <i>et al.</i> , 2018 | Sí | No | No | No | No | No |
| West <i>et al.</i> , 2019 | Sí | No | No | No | Sí | Sí |
| Willemijn <i>et al.</i> , 2020 | No | Sí | No | No | No | Sí |

Tabla V: Datos disponibles en ensayos clínicos. Se muestran los primeros autores de los artículos de los ensayos clínicos reportados donde se obtuvieron datos de diferentes variables clínicas (edad, tabaquismo y sitio metastásico) tanto para la supervivencia global como para la supervivencia libre de progresión. Para más información sobre cada ensayo clínico, se encuentran citados en la última sección del presente trabajo.

5.2.1. Evaluación de la edad como variable clínica de respuesta a terapias en cáncer

Como se mencionó en la **sección 1.6.1.1.**, generalmente y en la mayoría de los ensayos clínicos el investigador a cargo suele elegir 65 años como límite para estratificar a los pacientes en subgrupos de edad (National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, 2016). Es por esto que se tuvieron en cuenta los ensayos que reporten los resultados con este punto de corte.

A partir de los cocientes de riesgo (HR por su nombre en inglés *hazard ratio*) correspondientes a la supervivencia global tanto en pacientes menores y mayores a 65 años por separado, obtenidos de los ensayos clínicos, se realizó el enfoque hábil o *deft approach* (Fisher *et al.*, 2017; ver **Materiales y Métodos**) con el fin de obtener información acerca de la ventaja del tratamiento con inmunoterapia, o en combinación con otro tratamiento, en pacientes menores y mayores a 65 años. Teniendo en cuenta que los cocientes de riesgo obtenidos de los ensayos clínicos, de pacientes menores y mayores, toman como referencia al grupo control, mediante este enfoque se busca obtener como resultado si hay ventaja del tratamiento por sobre el control en la supervivencia global en pacientes menores o mayores a 65 años en un mismo tipo de ensayo clínico, es decir mismo tipo de cáncer en este caso. Cabe destacar que el grupo control puede ser placebo u otro tratamiento tal como terapia dirigida, quimioterapia, radioterapia (Fig. 10) u otro inhibidor de punto de control inmunológico distinto al grupo tratado a evaluar (Fig. 11).

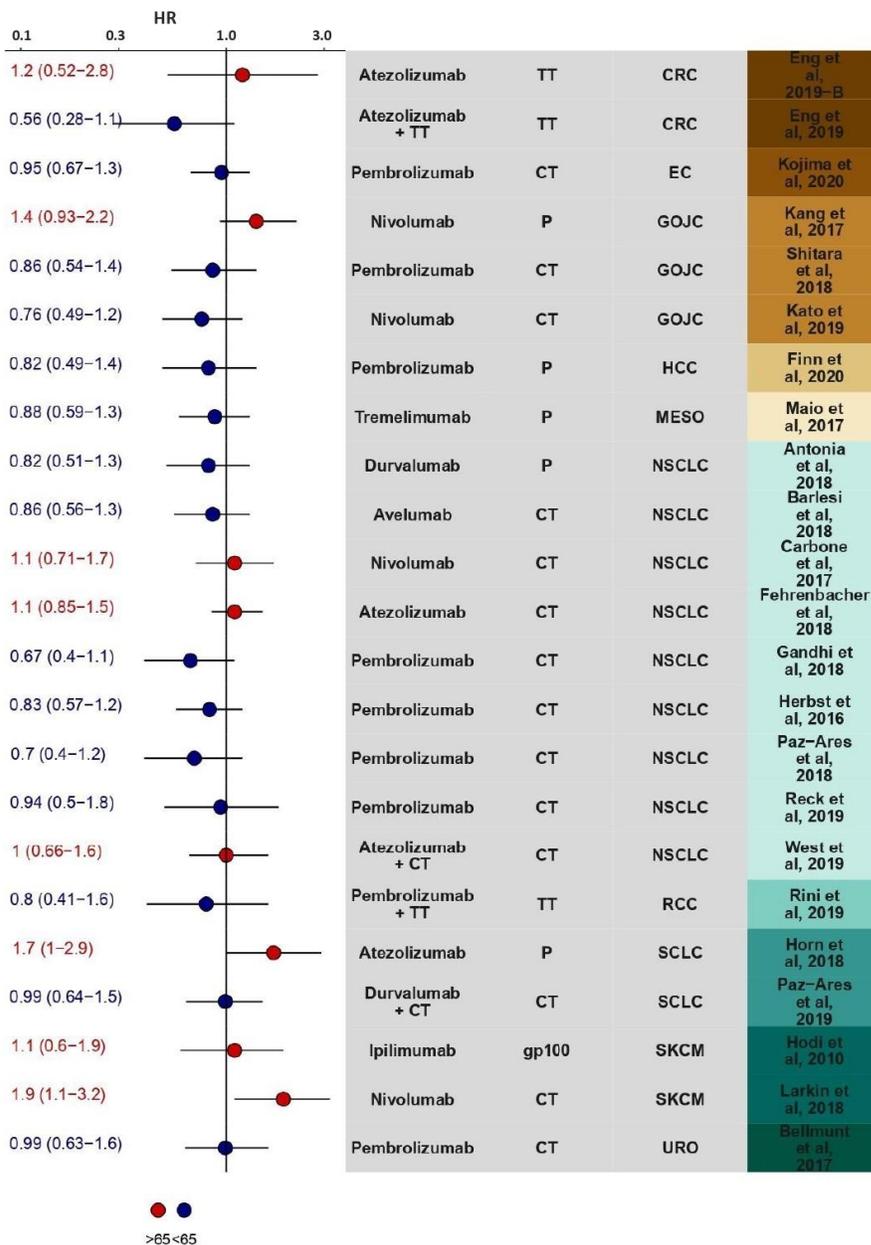


Figura 10: Gráfico de árbol para ensayos clínicos, supervivencia global: inmunoterapia vs. control (terapia dirigida, quimioterapia u otro que no sea inmunoterapia). El cociente de riesgo HR > 1 indica una ventaja de supervivencia global del tratamiento con inmunoterapia en pacientes mayores a 65, mientras que un HR < 1 indica una ventaja de supervivencia global del tratamiento con inmunoterapia en pacientes menores a 65, esto se debe a que se utilizó como grupo referencia a los mayores. HR = 1 no hay diferencia entre los grupos. CRC: cáncer

colorrectal; EC: cáncer de esófago; GOJC: carcinoma de la unión gastroesofágica; HCC: carcinoma hepatocelular; MESO: mesotelioma; NSCLC: cáncer de pulmón de células no-pequeñas; RCC: cáncer renal; SCLC: cáncer de pulmón de células pequeñas; SKCM: melanoma; URO: cáncer urotelial; TT: terapia dirigida; CT: quimioterapia; P: placebo.

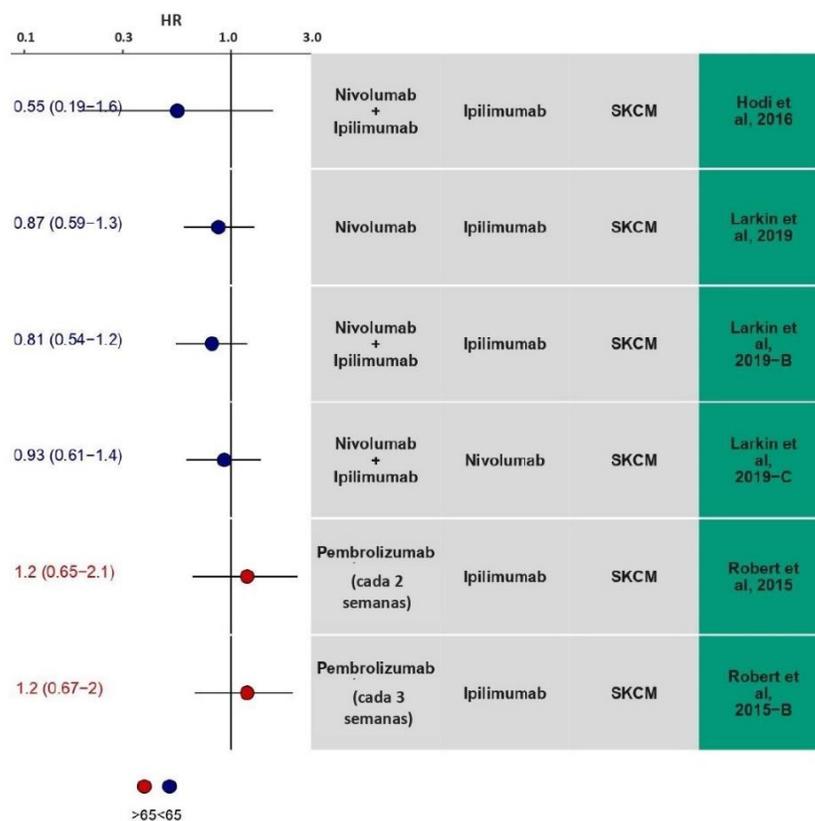


Figura 11: Gráfico de árbol para ensayos clínicos, supervivencia global: inmunoterapia vs. inmunoterapia. El cociente de riesgo $HR > 1$ indica una ventaja de supervivencia global del tratamiento de la primera columna en pacientes mayores a 65, mientras que un $HR < 1$ indica una ventaja de supervivencia global del tratamiento de la primera columna en pacientes menores a 65, esto se debe a que se utilizó como grupo referencia a los mayores. $HR = 1$ no hay diferencia entre los grupos. Aclaración: la primera columna corresponde al grupo tratamiento ya que es el que se encuentra en estudio en los ensayos clínicos del presente análisis. Por consiguiente, la segunda columna corresponde al grupo control. SKCM: melanoma.

Tomando las consideraciones descritas anteriormente, se realizó el mismo análisis para la sobrevida libre de progresión en pacientes menores y mayores a 65 años tratados con inhibidores de PD-1, PD-L1 y CTLA-4 (Fig. 12 y Fig. 13).

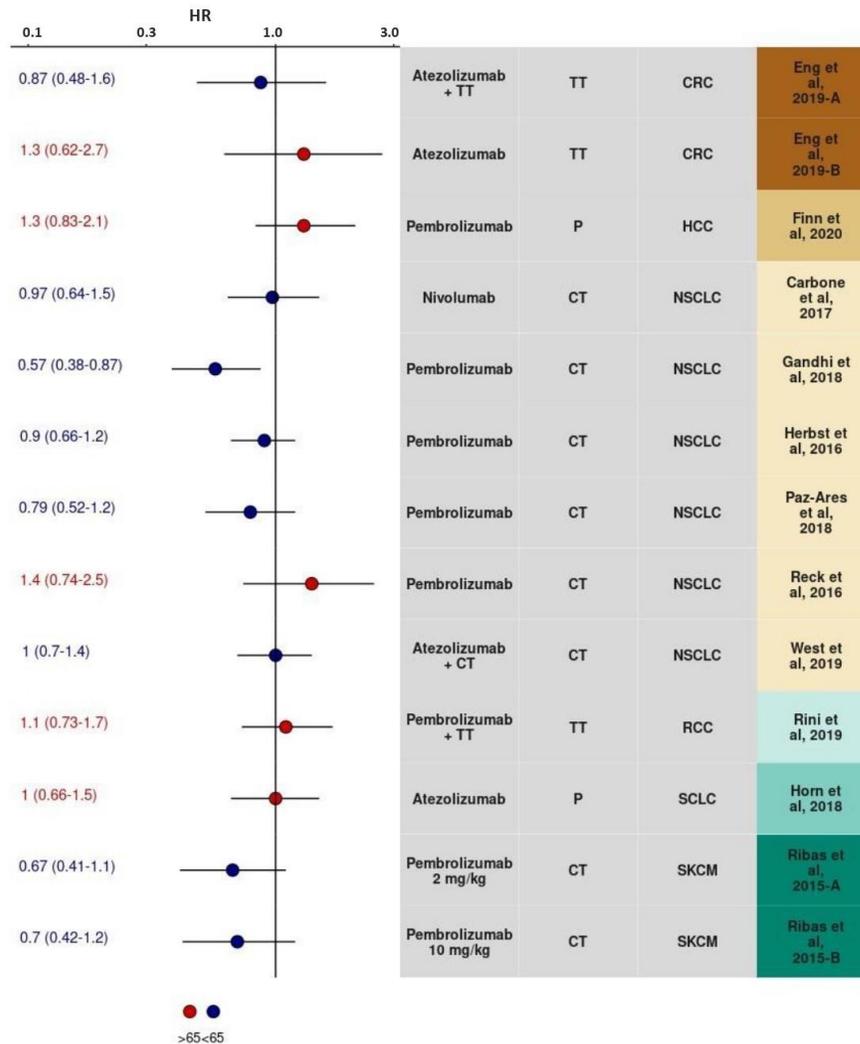


Figura 12: Gráfico de árbol para ensayos clínicos, sobrevida libre de progresión: inmunoterapia vs. control (terapia dirigida, quimioterapia u otro que no sea inmunoterapia). El cociente de riesgo HR > 1 indica una ventaja de sobrevida libre de progresión del tratamiento con inmunoterapia en pacientes mayores a 65, mientras que un HR <1 indica una ventaja de sobrevida libre de progresión del tratamiento con inmunoterapia en pacientes menores a 65, esto se debe a que se utilizó como grupo referencia a los mayores. HR = 1 no hay diferencia entre los grupos. CRC: cáncer colorrectal; HCC: carcinoma

hepatocelular; NSCLC: *cáncer de pulmón de células no-pequeñas*; RCC: *cáncer renal*; SCLC: *cáncer de pulmón de células pequeñas*; SKCM: *melanoma*; TT: *terapia dirigida*; CT: *quimioterapia*; P: *placebo*.

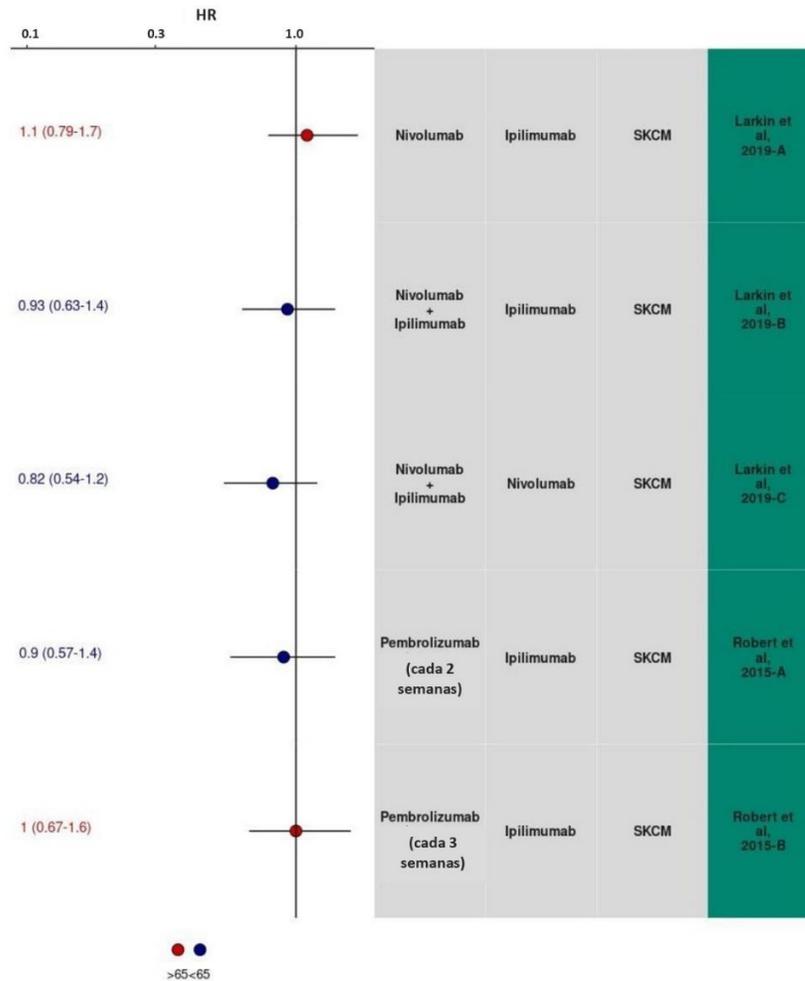


Figura 13: Gráfico de árbol para ensayos clínicos, **sobrevida libre de progresión: inmunoterapia vs. inmunoterapia**. El cociente de riesgo $HR > 1$ indica una ventaja de *sobrevida libre de progresión* del tratamiento de la primera columna en *pacientes mayores a 65*, mientras que un $HR < 1$ indica una ventaja de *sobrevida libre de progresión* del tratamiento de la primera columna en *pacientes menores a 65*, esto se debe a que se utilizó como grupo referencia a los mayores. $HR = 1$ no hay diferencia entre los grupos. Aclaración: la primera columna corresponde al grupo tratamiento ya que es el que se encuentra en estudio en los

ensayos clínicos del presente análisis. Por consiguiente, la segunda columna corresponde al grupo control. SKCM: melanoma.

Observando los cocientes de riesgo junto con sus intervalos de confianza (IC 95%) (Fig. 10-13) para cada ensayo clínico evaluado por separado, se concluye que ninguno de éstos mostró una ventaja de supervivencia global ni libre de progresión en pacientes menores o mayores a 65 años, comparando con el respectivo control. Ocurren dos excepciones, en el ensayo de Larkin *et al.*, 2018 donde se puede observar que el grupo de mayores a 65 años tendría ventaja, en la supervivencia global, respecto del grupo menor a 65 años, y en el ensayo de Gandhi *et al.*, 2018 donde se puede observar que el grupo de menores a 65 años tendría ventaja, en la supervivencia libre de progresión, respecto del grupo mayor a 65 años. Es importante destacar que, además de la heterogeneidad que hay entre los grupos control, otro aspecto a considerar es que en este análisis primero se parte de la comparación entre inmunoterapia y control de pacientes menores a 65 años, y la comparación entre inmunoterapia y control de pacientes mayores a 65 años, representados como cocientes de riesgo. A partir de allí, se obtiene el resultado presentado en las Figuras 10 a 13. Por lo tanto, no se compara la supervivencia global o libre de progresión de los pacientes tratados con inhibidores de puntos de control inmunológico menores y mayores a 65 años, para ello se debe realizar un análisis donde se tienen datos de pacientes individuales.

5.2.2. Evaluación del tabaquismo como variable clínica de respuesta a terapias en cáncer

La evidencia epidemiológica de la asociación entre el tabaquismo y el cáncer comenzó a surgir en la década de 1920, y en la década de 1950 se estableció la relación causal con el cáncer de pulmón. A partir de allí, la evidencia de la asociación entre el tabaquismo y el cáncer en otras partes del sistema respiratorio y del tracto digestivo comenzaron a acumularse (Gandini *et al.*, 2008). Es por ello que se tuvo en cuenta en este análisis la variable clínica del estado de fumador del paciente al recibir agentes anti PD-1, anti CTLA-4 y anti PD-L1, o la combinación de éstos. El estado de fumador reportado por los investigadores en los ensayos clínicos se puede exponer de la siguiente manera: ex-fumador, fumador o no fumador, aunque la mayoría de los reportes contienen la información de ex-fumador y fumador en un mismo grupo.

Se realizó el mismo análisis que en la sección anterior para la edad, con la salvedad de que se realizaron las siguientes comparaciones: fumador *vs.* no fumador, ex-fumador *vs.* no

fumador, y fumador/ex-fumador vs. no fumador, tanto para la sobrevida global (ver Tabla VI) como la sobrevida libre de progresión (ver Tabla VII).

FUMADOR vs. NO FUMADOR

| Autor | Cáncer | Tratamiento | Control | HR | IC 95% |
|------------------------|--------|--------------------|---------------|------|-----------|
| Kato et al., 2019 | GOJC | Nivolumab | CT | 0.81 | 0.34-2.00 |
| Cohen et al., 2019 | HNSC | Pembrolizumab | CT o TT | 0.79 | 0.38-1.70 |
| Carbone et al., 2017 | NSCLC | Nivolumab | CT | 1.00 | 0.46-2.30 |
| Reck et al., 2019 | NSCLC | Pembrolizumab | CT | 0.90 | 0.09-8.30 |
| Willemijn et al., 2020 | NSCLC | Pembrolizumab + RT | Pembrolizumab | 0.86 | 0.27-2.70 |
| Bellmunt et al., 2017 | URO | Pembrolizumab | CT | 0.30 | 0.13-0.99 |

Beneficio de la terapia
 No Fumador
 Fumador

EX-FUMADOR vs. NO FUMADOR

| Autor | Cáncer | Tratamiento | Control | HR | IC 95% |
|------------------------|--------|--------------------|---------------|------|-----------|
| Kato et al., 2019 | GOJC | Nivolumab | CT | 1.40 | 0.70-2.60 |
| Cohen et al., 2019 | HNSC | Pembrolizumab | CT o TT | 0.87 | 0.53-1.40 |
| Carbone et al., 2017 | NSCLC | Nivolumab | CT | 1.10 | 0.54-2.10 |
| Reck et al., 2019 | NSCLC | Pembrolizumab | CT | 0.66 | 0.08-5.60 |
| Willemijn et al., 2020 | NSCLC | Pembrolizumab + RT | Pembrolizumab | 0.81 | 0.39-1.70 |
| Bellmunt et al., 2017 | URO | Pembrolizumab | CT | 0.67 | 0.41-1.10 |

Beneficio de la terapia
 No Fumador
 Ex-Fumador

FUMADOR/EX-FUMADOR vs. NO FUMADOR

| Autor | Cáncer | Tratamiento | Control | HR | IC 95% |
|---------------------------|--------|------------------------|---------|------|-----------|
| Antonia et al., 2018 | NSCLC | Durvalumab | P | 2.10 | 0.91-4.70 |
| Barlesi et al., 2018 | NSCLC | Avelumab | CT | 0.49 | 0.27-0.90 |
| Fehrenbacher et al., 2018 | NSCLC | Atezolizumab | CT | 1.10 | 0.69-1.60 |
| Gandhi et al., 2018 | NSCLC | Pembrolizumab | CT | 2.30 | 0.97-5.70 |
| Reck et al., 2016 | NSCLC | Ipilimumab | CT | 0.94 | 0.68-1.30 |
| Rittmeyer et al., 2016 | NSCLC | Atezolizumab | CT | 1.00 | 0.66-1.60 |
| Hellmann et al., 2019 | NSCLC | Nivolumab + Ipilimumab | CT | 0.63 | 0.38-1.00 |
| Jotte et al., 2020 | NSCLC | Atezolizumab + CT | CT | 1.00 | 0.50-2.10 |
| Paz-Ares et al., 2019 | SCLC | Durvalumab + CT | CT | 0.80 | 0.34-1.90 |

Beneficio de la terapia
 No Fumador
 Fumador/Ex-Fumador

Tabla VI: Resultados obtenidos del análisis de tabaquismo para sobrevida global. Se observan los tres escenarios posibles: *fumador vs. no fumador*, *ex-fumador vs. no fumador*, y *fumador/ex-fumador vs. no fumador*. En cada caso se muestran el autor del artículo donde se obtuvieron los datos, el tipo tumoral, grupo tratamiento y grupo control, el cociente de riesgos (HR) y su intervalo de confianza del 95% (IC 95%). En estas últimas dos variables, el texto en verde indica beneficio para el grupo no fumador, mientras que el rojo indica beneficio para el grupo fumador, ex-fumador o fumador/ex-fumador, dependiendo el escenario. GOJC: carcinoma de la unión gastroesofágica; HNSC: cáncer de cabeza y cuello; NSCLC: cáncer de pulmón de células no-pequeñas; SCLC: cáncer de pulmón de células pequeñas; URO: cáncer urotelial; TT: terapia dirigida; CT: quimioterapia; RT: radioterapia; P: placebo.

FUMADOR vs. NO FUMADOR

| Autor | Cáncer | Tratamiento | Control | HR | IC 95% |
|--------------------------------|--------|--------------------|---------------|------|-----------|
| Carbone <i>et al.</i> , 2017 | NSCLC | Nivolumab | CT | 0.41 | 0.19-0.91 |
| Reck <i>et al.</i> , 2016 | NSCLC | Pembrolizumab | CT | 0.76 | 0.08-6.90 |
| Willemijn <i>et al.</i> , 2020 | NSCLC | Pembrolizumab + RT | Pembrolizumab | 0.52 | 0.17-1.70 |

Beneficio de la terapia
 No Fumador
 Fumador

EX-FUMADOR vs. NO FUMADOR

| Autor | Cáncer | Tratamiento | Control | HR | IC 95% |
|--------------------------------|--------|--------------------|---------------|------|-----------|
| Carbone <i>et al.</i> , 2017 | NSCLC | Nivolumab | CT | 0.45 | 0.23-0.91 |
| Reck <i>et al.</i> , 2016 | NSCLC | Pembrolizumab | CT | 0.52 | 0.06-4.50 |
| Willemijn <i>et al.</i> , 2020 | NSCLC | Pembrolizumab + RT | Pembrolizumab | 0.75 | 0.40-1.40 |

Beneficio de la terapia
 No Fumador
 Ex-Fumador

FUMADOR/EX-FUMADOR vs. NO FUMADOR

| Autor | Cáncer | Tratamiento | Control | HR | IC 95% |
|-----------------------------|--------|-------------------|---------|------|-----------|
| Gandhi <i>et al.</i> , 2018 | NSCLC | Pembrolizumab | CT | 2.30 | 0.97-5.70 |
| West <i>et al.</i> , 2019 | NSCLC | Atezolizumab + CT | CT | 1.00 | 0.55-1.90 |

Beneficio de la terapia
 No Fumador
 Fumador/Ex-Fumador

Tabla VII: Resultados obtenidos del análisis de tabaquismo para sobrevida libre de progresión. Se observan los tres escenarios posibles: *fumador vs. no fumador*, *ex-fumador vs. no fumador*, y *fumador/ex-fumador vs. no fumador*. En cada caso se muestran el autor del artículo de donde se obtuvieron los datos, el tipo tumoral que en este caso fue sólo NSCLC, grupo tratamiento y grupo control, el cociente de riesgos (HR) y su intervalo de confianza del 95% (IC 95%). En estas últimas dos variables, el texto en verde indica beneficio para el grupo no fumador, mientras que el rojo indica beneficio para el grupo fumador, ex-fumador o fumador/ex-fumador, dependiendo el escenario. NSCLC: cáncer de pulmón de células no-pequeñas; CT: quimioterapia; RT: radioterapia.

Analizando los cocientes de riesgo junto con sus intervalos de confianza, en cada ensayo clínico evaluado se observa que la mayoría no presenta una ventaja de sobrevida global ni libre de progresión en pacientes fumadores, ex-fumadores o no fumadores. Como se puede ver en las Tablas VI y VII en la columna de los intervalos de confianza, la gran mayoría toman al valor nulo, interpretando así que no habría beneficio significativo entre los grupos comparados. Las excepciones fueron tres estudios: Barlesi *et al.*, 2018 (fumador/ex-fumador vs. no-fumador; OS), Carbone *et al.*, 2018 (fumador vs. no-fumador; PFS) y Carbone *et al.*, 2018 (ex-fumador vs. no-fumador; PFS) donde se puede observar que los grupos fumador/ex-fumador, ex-fumador y fumador, respectivamente, tendrían ventaja, en la sobrevida global y libre de progresión, respecto del no-fumador. Al analizar estos resultados, se debe tener en cuenta la heterogeneidad que hay entre los grupos tratados y los controles, y que no se compara directamente la sobrevida global o libre de progresión de los pacientes tratados con

inmunoterapia fumadores y no fumadores, al igual que ocurría con la edad previamente. Otro aspecto a destacar es que son pocos los casos en los que el estado de fumador de los pacientes se encuentra disponible en los reportes de los ensayos clínicos.

5.2.3. Evaluación del sitio metastásico como variable clínica de respuesta a terapias en cáncer

La metástasis cerebral es una de las complicaciones más temidas del cáncer, plantea una importante mortalidad y morbilidad en pacientes con estadio avanzado. La esperanza y pronóstico de vida de las personas con metástasis hepáticas tiende a no ser curable definitivamente. Ambos sitios metastásicos, hígado y cerebro, suelen ser los más reportados en los ensayos clínicos. Por lo tanto, se realizó el mismo análisis que en las secciones de resultados previas para la edad y tabaquismo. La comparación fue entre grupos de pacientes que tenían o no metástasis hepáticas o cerebrales, sólo para la supervivencia global (ver Tabla VIII) ya que en los ensayos clínicos donde reportaban los datos de supervivencia libre de progresión no se encontraba la información acerca de sitios metastásicos.

METÁSTASIS EN CEREBRO

| Autor | Cáncer | Tratamiento | Control | HR | IC 95% |
|---------------------------|--------|------------------------|---------|------|-----------|
| Schmid et al., 2019 | BRCA | Atezolizumab + CT | P + CT | 1.60 | 0.85-3.10 |
| Fehrenbacher et al., 2018 | NSCLC | Atezolizumab | CT | 0.74 | 0.42-1.30 |
| Gandhi et al., 2018 | NSCLC | Pembrolizumab | CT | 0.68 | 0.36-1.30 |
| Reck et al., 2019 | NSCLC | Pembrolizumab | CT | 1.10 | 0.30-4.30 |
| Reck et al., 2016 | NSCLC | Ipilimumab | CT | 1.50 | 0.97-2.40 |
| Rittmeyer et al., 2016 | NSCLC | Atezolizumab | CT | 0.72 | 0.40-1.30 |
| Hellmann et al., 2019 | NSCLC | Nivolumab + Ipilimumab | CT | 0.83 | 0.49-1.40 |
| Horn et al., 2018 | SCLC | Atezolizumab | P | 1.60 | 0.66-3.70 |
| Paz-Ares et al., 2019 | SCLC | Duvalumab + CT | CT | 0.93 | 0.46-1.90 |
| Larkin et al., 2018 | SKCM | Nivolumab | CT | 1.80 | 0.85-3.60 |

Beneficio de la terapia
 Metástasis No
 Metástasis Si

METÁSTASIS EN HÍGADO

| Autor | Cáncer | Tratamiento | Control | HR | IC 95% |
|-----------------------|--------|------------------------|---------|------|-----------|
| Schmid et al., 2019 | BRCA | Atezolizumab + CT | P + CT | 0.87 | 0.61-1.20 |
| Kang et al., 2017 | GOJC | Nivolumab | P | 1.00 | 0.62-1.80 |
| Hellmann et al., 2019 | NSCLC | Nivolumab + Ipilimumab | CT | 1.40 | 0.93-2.10 |
| Jotte et al., 2020 | NSCLC | Atezolizumab + CT | CT | 1.40 | 0.89-2.10 |
| Motzer et al., 2018 | RCC | Nivolumab + Ipilimumab | TT | 0.97 | 0.60-1.60 |
| Horn et al., 2018 | SCLC | Atezolizumab | P | 1.30 | 0.75-2.10 |
| Bellmunt et al., 2017 | URO | Pembrolizumab | CT | 1.30 | 0.81-2.00 |

Beneficio de la terapia
 Metástasis No
 Metástasis Si

Tabla VIII: Resultados obtenidos del análisis de sitios metastásicos para supervivencia global.

Se observan los dos sitios metastásicos reportados en los ensayos clínicos analizados, **hígado** y **cerebro**. En cada caso se muestran el autor del artículo donde se obtuvieron los datos, el tipo tumoral, grupo tratamiento y grupo control, el cociente de riesgos (HR) y su intervalo de

confianza del 95% (IC 95%). En estas últimas dos variables, el texto en verde indica beneficio para el grupo que no tiene metástasis en ese órgano, mientras que el rojo indica beneficio para el grupo que tiene metástasis en ese órgano, ya sea hígado o cerebro. BRCA: cáncer de mama; GOJC: carcinoma de la unión gastroesofágica; NSCLC: cáncer de pulmón de células no-pequeñas; SCLC: cáncer de pulmón de células pequeñas; RCC: cáncer renal; SKCM: melanoma; URO: cáncer urotelial; TT: terapia dirigida; CT: quimioterapia; P: placebo.

Considerando los cocientes de riesgo junto con sus intervalos de confianza para cada ensayo clínico se concluye que ninguno presenta una ventaja de supervivencia global en pacientes que tengan o no metástasis al momento de recibir el tratamiento. Al igual que en los análisis previos, se debe tener en cuenta la heterogeneidad entre los grupos tratados, y de dónde surgen las comparaciones. Además, son pocos los casos en los que el sitio metastásico de los pacientes se encuentra disponible en los reportes de los ensayos clínicos, como ocurre con el tabaquismo.

5.3. Análisis genómico, transcriptómico y de supervivencia utilizando datos individuales de pacientes con cáncer tratados con inmunoterapias para evaluar su asociación con variables clínicas

Como se mencionó en cada caso analizado, una de las razones por las cuales, en los análisis anteriores realizados con datos obtenidos de ensayos clínicos, se obtuvieron resultados inconclusos podría ser que no se está comparando la supervivencia global o libre de progresión de los pacientes tratados con ICI respecto de alguna variable de interés de manera directa, tal como menores y mayores a 65 años, fumadores o no fumadores, o que presentan metástasis en ciertos sitios o no. Para ello se debe realizar un análisis donde se tienen datos individuales de pacientes junto con su respectiva OS y PFS. Por lo tanto, se analizaron otros 10 estudios, que contenían la información necesaria para realizar los análisis de supervivencia de forma directa entre los grupos de interés. Para los análisis de OS se tuvieron en cuenta 8 de los estudios (Snyder *et al.*, 2014; Van Allen *et al.*, 2015; Hugo *et al.*, 2016; Sade-Feldman *et al.*, 2018; Miao *et al.*, 2018; Gide *et al.*, 2019; Samstein *et al.*, 2019; Braun *et al.*, 2020), mientras que para los análisis de PFS fueron 6 estudios (Snyder *et al.*, 2014; Van Allen *et al.*, 2015; Rizvi *et al.*, 2015; Hellmann *et al.*, 2018; Gide *et al.*, 2019; Braun *et al.*, 2020). Se tuvo en cuenta la heterogeneidad que existe entre los diferentes tipos de cáncer dependiendo del tejido u órgano donde se formó, por lo tanto, no se evaluaron todos los tipos tumorales en conjunto, sino que se los evaluó por separado (ver Tabla IX).

| Cáncer | Estudios | Inmunoterapia | N |
|-------------------------------|----------------------------|---|-----|
| Cabeza y Cuello | Samstein <i>et al.</i> | PD-1/PD-L1; PD-1/PD-L1 + CTLA-4 | 139 |
| Colorectal | Samstein <i>et al.</i> | PD-1/PD-L1; CTLA-4; PD-1/PD-L1 + CTLA-4 | 110 |
| Esofagogastrico | Samstein <i>et al.</i> | PD-1/PD-L1; CTLA-4; PD-1/PD-L1 + CTLA-4 | 126 |
| Glioma | Samstein <i>et al.</i> | PD-1/PD-L1; PD-1/PD-L1 + CTLA-4 | 117 |
| Mama | Samstein <i>et al.</i> | PD-1/PD-L1; PD-1/PD-L1 + CTLA-4 | 44 |
| Melanoma | Gide <i>et al.</i> | PD-1; PD-1 + CTLA-4 | 105 |
| | Hugo <i>et al.</i> | PD-1 | 37 |
| | Sade-Feldman <i>et al.</i> | PD-1; PD-1 + CTLA-4 | 32 |
| | Samstein <i>et al.</i> | PD-1/PD-L1; CTLA-4; PD-1/PD-L1 + CTLA-4 | 320 |
| | Snyder <i>et al.</i> | CTLA-4 | 58 |
| | Van Allen <i>et al.</i> | CTLA-4 | 110 |
| Origen Primario Desconocido | Samstein <i>et al.</i> | PD-1/PD-L1; CTLA-4; PD-1/PD-L1 + CTLA-4 | 88 |
| Pulmon de Celulas No-Pequeñas | Hellmann <i>et al.</i> | PD-1 + CTLA-4 | 75 |
| | Miao <i>et al.</i> | PD-1/PD-L1 | 12 |
| | Rizvi <i>et al.</i> | PD-1 | 34 |
| | Samstein <i>et al.</i> | PD-1/PD-L1; PD-1/PD-L1 + CTLA-4 | 349 |
| Renal | Braun <i>et al.</i> | PD-1 | 596 |
| | Samstein <i>et al.</i> | PD-1/PD-L1; PD-1/PD-L1 + CTLA-4 | 151 |
| Vejiga | Miao <i>et al.</i> | PD-1/PD-L1 | 12 |
| | Samstein <i>et al.</i> | PD-1/PD-L1; PD-1/PD-L1 + CTLA-4 | 215 |

Tabla IX: Información relevante acerca de cada estudio. Se muestran los primeros autores de los artículos donde se obtuvo la información necesaria para el análisis, los tipos tumorales presentes en cada uno de ellos, las inmunoterapias utilizadas, al igual que la cantidad de pacientes (N). Para más información sobre cada ensayo clínico, estos se encuentran citados en la última sección del presente trabajo.

5.3.1. Asociación de la sobrevida global y variables clínicas disponibles de pacientes con diferentes tipos tumorales tratados con anti PD-1, anti CTLA-4 o la combinación de estos.

5.3.1.1. *Evaluación de la edad como variable clínica de respuesta a inhibidores de punto de control inmunológico en cáncer*

5.3.1.1.1. *Análisis de sobrevida del punto de corte más utilizado en ensayos clínicos para estratificar a los pacientes: 65 años*

En primer lugar, para realizar este análisis de sobrevida, se tomó como punto de corte 65 años de edad debido a que es el más utilizado en la estratificación de pacientes, respecto de esta variable clínica (ver **sección 1.6.1.1.1.**). Los tipos de cáncer presentes en los ocho estudios considerados para el análisis fueron: cáncer de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer esofagogastrico, glioma, cáncer de mama, melanoma, cáncer de origen primario desconocido, cáncer de pulmón de células no-pequeñas, cáncer renal y cáncer de vejiga (Fig. 14).

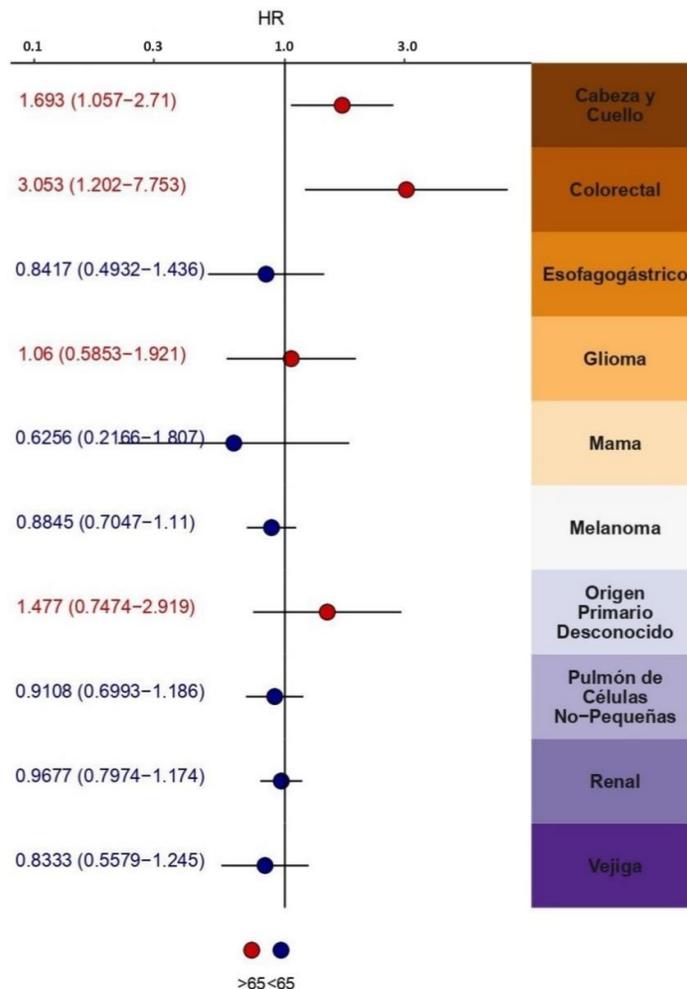


Figura 14: Gráfico de árbol para cada tipo tumoral específico. El cociente de riesgo HR > 1 indica una ventaja de supervivencia global del tratamiento con inmunoterapias en pacientes mayores a 65, mientras que un HR < 1 indica una ventaja de supervivencia global del tratamiento con inmunoterapias en pacientes menores a 65, esto se debe a que se utilizó como grupo referencia a los mayores. HR = 1 no hay diferencia entre los grupos. Como referencia: rojo, para los mayores a 65 años; azul, para los menores a 65 años.

A partir del gráfico de árbol, observando los HR e intervalos de confianza, se encuentran diferencias entre los grupos menores y mayores a 65 años de edad en cáncer colorrectal (CRC) y cáncer de cabeza y cuello (HNSCC por su nombre en inglés *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*), donde los mayores a 65 años tienen una supervivencia global superior respecto de los menores tratados con inmunoterapia. Sin embargo, el análisis anterior se realizó sin discriminar

entre los distintos inhibidores de punto de control inmunológico y, como se mencionó en la **sección 1.4.4.**, los ICI poseen mecanismos de acción diferentes. Por esa razón se decidió considerar esta variable (ver Tabla X). Cabe destacar que sólo se tuvieron en cuenta aquellos tipos tumorales donde la cantidad de pacientes era al menos mayor a veinte ($N > 20$).

PD-1/PD-L1

| Cáncer | p-valor | N Menores | N Mayores | HR | IC 95% |
|-------------------------------|---------------|-----------|-----------|-------------|------------------|
| Cabeza y Cuello | 0.0335 | 78 | 53 | 1.69 | 1.03-2.77 |
| Colorectal | 0.0172 | 76 | 23 | 2.95 | 1.16-7.53 |
| Esofagogastrico | 0.2026 | 55 | 38 | 0.67 | 0.36-1.25 |
| Glioma | 0.7150 | 97 | 17 | 1.11 | 0.61-2.00 |
| Mama | 0.2626 | 18 | 2 | 0.41 | 0.09-1.88 |
| Melanoma | 0.7038 | 109 | 136 | 1.08 | 0.73-1.58 |
| Origen Primario Desconocido | 0.2311 | 47 | 29 | 1.54 | 0.76-3.13 |
| Pulmon de Celulas No-Pequeñas | 0.5587 | 151 | 189 | 0.92 | 0.70-1.21 |
| Renal | 0.6676 | 491 | 227 | 0.96 | 0.79-1.16 |
| Vejiga | 0.6424 | 83 | 121 | 0.90 | 0.59-1.38 |

CTLA-4

| Cáncer | p-valor | N Menores | N Mayores | HR | IC 95% |
|----------|---------|-----------|-----------|------|-----------|
| Mama | 0.8848 | 17 | 3 | 0.88 | 0.20-4.00 |
| Melanoma | 0.4819 | 142 | 101 | 0.89 | 0.64-1.23 |

COMBO

| Cáncer | p-valor | N Menores | N Mayores | HR | IC 95% |
|-------------------------------|---------|-----------|-----------|------|-----------|
| Esofagogastrico | 0.5648 | 24 | 7 | 1.59 | 0.34-7.45 |
| Melanoma | 0.1900 | 111 | 63 | 0.68 | 0.38-1.21 |
| Pulmon de Celulas No-Pequeñas | 0.3484 | 14 | 7 | 2.14 | 0.43-10.6 |
| Renal | 0.1214 | 23 | 6 | Inf | 0-Inf |
| Vejiga | 0.2693 | 14 | 9 | 0.51 | 0.15-1.68 |

Tabla X: Resultados obtenidos discriminando por terapia y tipo tumoral para evaluar el punto de corte de 65 años en la supervivencia global de los pacientes. Se observan tres escenarios diferentes, pacientes tratados con anti PD-1/PD-L1, anti CTLA-4 o la combinación (combo) de estos dos. En cada caso se muestran el tipo tumoral, el p-valor obtenido de la curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de menores y mayores a 65 años, la cantidad de pacientes menores y mayores a ese punto de corte, el cociente de riesgos (HR) y su intervalo de confianza del 95% (IC 95%). En negrita se marcan los resultados estadísticamente significativos.

De los resultados obtenidos, se observa que sólo los pacientes tratados con anti PD-1/PD-L1 mayores a 65 años con cáncer colorrectal y cáncer de cabeza y cuello se encuentran beneficiados respecto de la supervivencia global (Fig. 15), mientras que en los tratados con anti CTLA-4 o la combinación de estos ICI (anti PD-1/PD-L1 y anti CTLA-4) no se observan diferencias significativas en ningún tipo tumoral. Cabe destacar que para los dos únicos tipos

de tumores en los cuales hay diferencias significativas (tratados con anti PD-1) no hay datos de respuesta a anti CTLA-4 o la combinación de terapias.

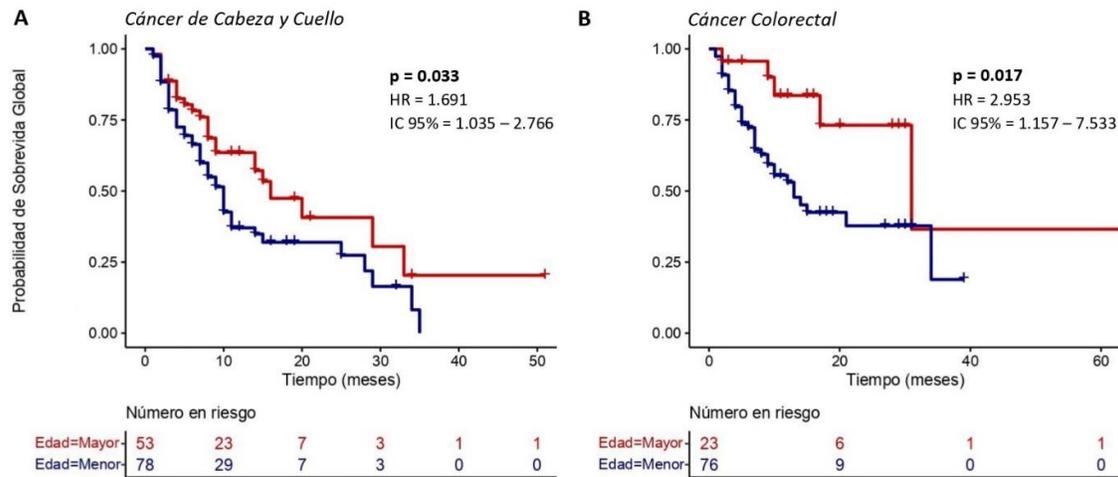


Figura 15: Curva de supervida global (Kaplan-Meier) para cáncer de cabeza y cuello y cáncer colorrectal tratados con PD-1/PD-L1. El punto de corte es 65 años para ambos. **A.** Pertenece a la curva de supervida global de pacientes con **HNSCC**. **B.** Pertenece a la curva de supervida global de pacientes con **CRC**. Se indica p-valor, cociente de riesgos (HR) e intervalo de confianza (IC 95%). Referencia: azul indica los pacientes menores a ese punto de corte, mientras que rojo indica los mayores.

5.3.1.1.1. Análisis de biomarcadores pronóstico para pacientes con HNSCC y CRC menores y mayores a 65 años.

Como se mencionó en la **sección 2.1.**, nuestro objetivo general consiste en identificar variables clínicas capaces de predecir el éxito de las inmunoterapias, en combinación con biomarcadores establecidos que lo respalden. Por lo tanto, se analizó el único biomarcador disponible dentro de los estudios analizados, siendo éste la carga mutacional tumoral (TMB) luego del tratamiento. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para comparar la TMB de los pacientes menores y mayores a 65 años, para cáncer de cabeza y cuello y cáncer colorrectal, se obtuvo un p-valor mayor al nivel de significancia en ambos casos, p-valor = 0,26 y p-valor = 0,17, respectivamente. Además, se encontraban disponibles las mutaciones post-tratamiento para analizar genes mutados diferencialmente entre los grupos, pero tampoco obtuvieron un p-valor ajustado significativo (datos no mostrados).

5.3.1.1.2. *Búsqueda de punto de corte óptimo para la edad en diferentes tipos de cáncer distinguiendo por terapia, considerando la supervivencia global de los pacientes.*

A través de un bucle *for* se realizaron iteraciones desde 55 hasta 70 años para obtener los p-valores, HR e intervalos de confianza del 95% para los diferentes tipos de cáncer, que presentaban información acerca de la supervivencia global, con el fin de encontrar el punto de corte óptimo para la edad en estos tipos tumorales discriminando entre inmunoterapias. El único tipo tumoral que obtuvo resultados significativos fue cáncer colorrectal tratado con inhibidor de PD-1/PD-L1 (ver Tabla XI), para el resto de los tipos de cáncer analizados no se encontraron puntos de corte significativos aun diferenciando por terapia (datos no mostrados).

| PD-1/PD-L1 | | | | | |
|-----------------------|---------------|-----------|-----------|-------------|------------------|
| Punto de corte (años) | p-valor | N Menores | N Mayores | HR | IC 95% |
| 67 | 0.0155 | 81 | 18 | 3.84 | 1.18-12.5 |
| 65 | 0.0172 | 76 | 23 | 2.95 | 1.16-7.53 |
| 63 | 0.0244 | 72 | 27 | 2.47 | 1.09-5.57 |
| 61 | 0.0357 | 65 | 34 | 2.10 | 1.03-4.29 |
| 70 | 0.0397 | 87 | 12 | 3.98 | 0.96-16.6 |
| 66 | 0.0437 | 79 | 20 | 2.53 | 0.99-6.46 |
| 60 | 0.0459 | 63 | 36 | 1.98 | 1.00-3.96 |
| 64 | 0.0608 | 74 | 25 | 2.14 | 0.95-4.82 |
| 68 | 0.0677 | 85 | 14 | 2.85 | 0.88-9.28 |
| 69 | 0.0677 | 85 | 14 | 2.85 | 0.88-9.28 |
| 62 | 0.0703 | 69 | 30 | 1.95 | 0.93-4.09 |
| 59 | 0.1371 | 61 | 38 | 1.63 | 0.85-3.15 |
| 56 | 0.1576 | 52 | 47 | 1.56 | 0.84-2.91 |
| 55 | 0.1597 | 48 | 51 | 1.55 | 0.84-2.85 |
| 57 | 0.2392 | 53 | 46 | 1.45 | 0.78-2.71 |
| 58 | 0.3952 | 56 | 43 | 1.31 | 0.70-2.44 |

Tabla XI: Puntos de corte para la edad en pacientes tratados con anti PD-1/PD-L1 con cáncer colorrectal considerando la supervivencia global. *Se muestran las iteraciones de 55 a 70 años, el p-valor obtenido de la curva de supervivencia (Kaplan-Meier) de menores y mayores a cada punto de corte, la cantidad de pacientes menores y mayores a ese punto de corte, el cociente de riesgos (HR) y su intervalo de confianza del 95% (IC 95%). En negrita se marcan los resultados estadísticamente significativos, es decir, p-valor < 0,05 e IC 95% sin tomar al 1,00.*

5.3.1.1.2.1. Análisis de biomarcadores pronóstico de la cohorte de descubrimiento para CRC tratado con anti PD-1/PD-L1 considerando los puntos de corte de edad significativos.

Los puntos de corte que se tuvieron en cuenta para realizar el análisis de TMB post-tratamiento fueron 61, 63, 65 y 67 años (Fig. 16). Las edades 60, 66 y 70 fueron significativas respecto del p-valor en el análisis anterior, pero al observar el intervalo de confianza toman al valor nulo indicando que no habría diferencias entre los menores y mayores a ese límite de edad. Sin embargo, cabe destacar que la tendencia se observa siempre en beneficio de la supervivencia global para los mayores a los puntos de corte analizados ($HR > 1$) (ver Tabla XI).

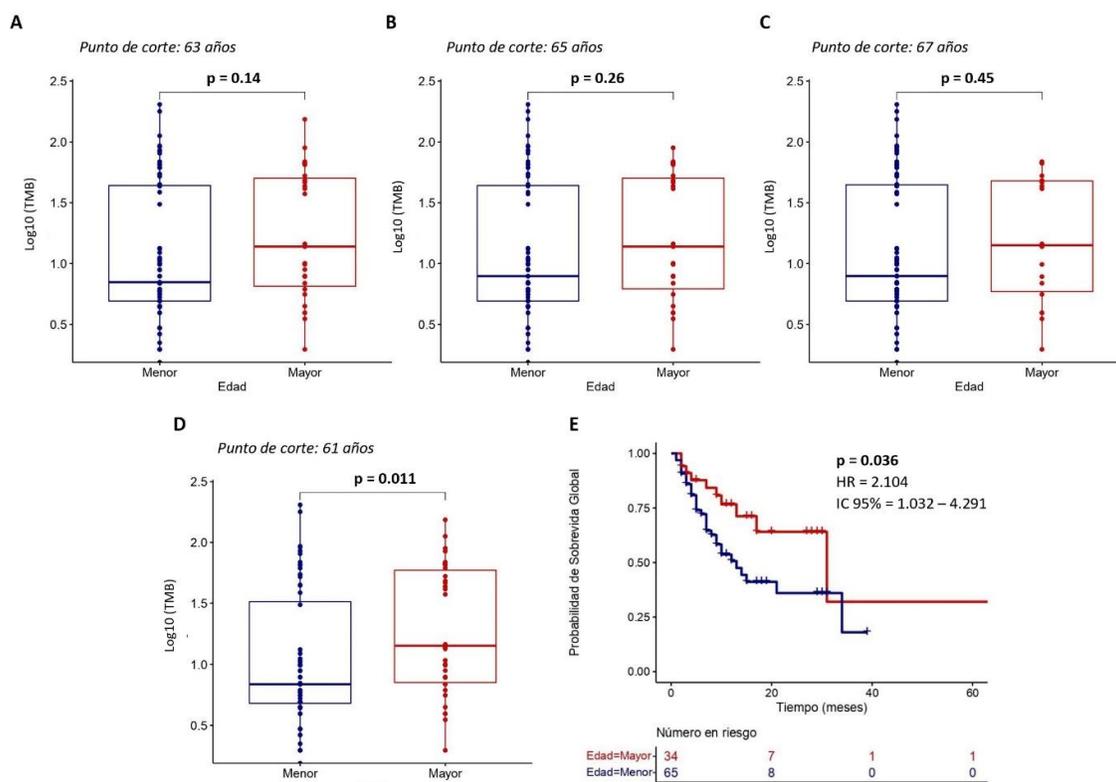


Figura 16: TMB y curva de supervivencia global (Kaplan-Meier) para CRC, tratamiento PD-1/PD-L1. *A., B., C., D.* Gráficos de caja para TMB post-tratamiento de pacientes con CRC con los puntos de corte seleccionados: 63, 65, 67, 61, respectivamente. *E.* Pertenece a la curva de supervivencia global de pacientes con CRC con punto de corte 61 años. Para los gráficos de caja se indica p-valor de la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica. Para la Kaplan-Meier, se indica p-valor, cociente de riesgos (HR) e intervalo de confianza (IC 95%). Log10(TMB):

logaritmo en base 10 para representar los valores de TMB. Referencia: azul indica los pacientes menores al punto de corte, mientras que rojo indica los mayores.

Con el único punto de corte que se obtuvo un p-valor menor al nivel de significancia fue con 61 años, donde los mayores a este límite tienen una TMB superior respecto de los menores. Al considerar los otros tres puntos de corte ninguno dio un resultado significativo para este biomarcador, aunque la tendencia se ve favorecida también hacia los mayores, al igual que se mencionó previamente con la supervivencia global. Se realizó otro análisis para encontrar genes mutados diferencialmente (post-tratamiento) entre los grupos, pero no se obtuvieron resultados significativos (datos no mostrados).

5.3.1.1.2.2. Validación, a través de biomarcadores predictivos establecidos, del uso de 61 años como punto de corte predictivo de edad para recibir anti PD-1/PD-L1 en CRC.

A. Carga mutacional tumoral (TMB) y mutaciones somáticas pre-tratamiento en pacientes menores y mayores a 61 años con CRC.

En cáncer colorrectal se observó una diferencia en la supervivencia global entre pacientes menores y mayores a 61 años tratados con PD-1/PD-L1, el biomarcador analizado (TMB) fue obtenido post-tratamiento, por ende, se decidió analizar biomarcadores predictivos disponibles en bases de datos públicas para este tipo tumoral. A través de la base de datos *cBioPortal* (Gao et al., 2013; Cerami et al., 2012) se obtuvieron tres estudios (Yaeger *et al.*, 2018; Vasaikar *et al.*, 2019; Giannakis *et al.*, 2016) con datos disponibles pre-tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal en estadio avanzado, la cual conforma la cohorte de validación. Los tres estudios tenían información acerca de los estados de MSI, mientras que uno de ellos tenía información del patrón de mutaciones, para evaluar genes mutados diferencialmente, y de TMB (Yaeger *et al.*, 2018) (Fig. 17 y Tabla XII).

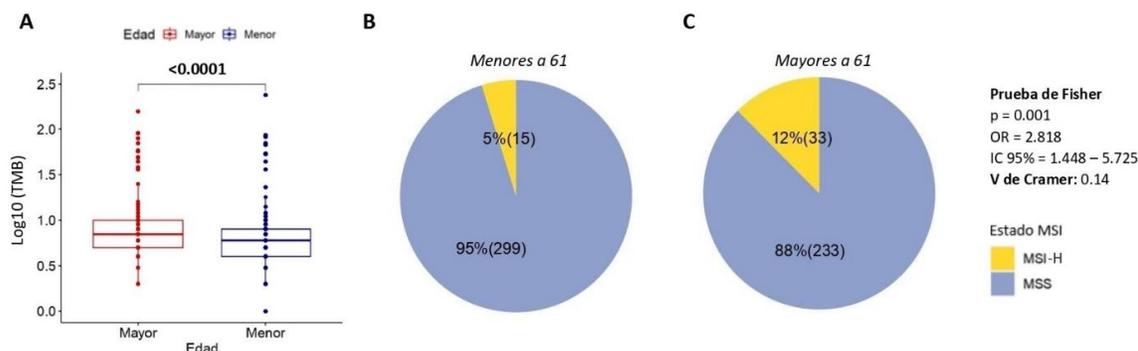


Figura 17: TMB y gráficos de torta para pacientes con CRC sin tratar, punto de corte 61 años. **A.** Gráfico de caja para TMB pre-tratamiento (menores = 327; mayores = 152). **B.** Gráfico de torta indica el porcentaje de pacientes **menores a 61 años** con estado de MSI alto o estable, entre paréntesis se encuentra el número de pacientes. **C.** Gráfico de torta indica el porcentaje de pacientes **mayores a 61 años** con estado de MSI alto o estable, entre paréntesis se encuentra el número de pacientes. Para los gráficos de torta se indica p-valor de la prueba de Fisher, cociente de probabilidades (OR), intervalo de confianza (IC 95%), V de Cramer para la fuerza de asociación. Para el gráfico de caja se indica p-valor de la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica. Log₁₀(TMB): logaritmo en base 10 para representar los valores de TMB. Referencia: en el gráfico de caja, azul indica los pacientes menores al punto de corte, mientras que rojo indica los mayores; en el gráfico de torta, celeste indica los pacientes con estado de microsatélites estables (MSS), mientras que amarillo indica inestabilidad de microsatélites alta (MSI-H).

| Gen mutado | Grupo afectado | p-valor | p-valor ajustado |
|--------------|----------------|-------------------|------------------|
| EPHA5 | Mayor | <0.0001 | 0.01006 |
| RNF43 | Mayor | <0.0001 | 0.15125 |
| KDM5C | Mayor | <0.0001 | 0.15125 |
| NOTCH2 | Mayor | <0.0001 | 0.15125 |
| KDR | Mayor | <0.0001 | 0.15125 |

Tabla XII: Mutaciones pre-tratamiento para pacientes con CRC, punto de corte 61 años. Se muestran algunos de los genes obtenidos del análisis, el grupo afectado (mutación del gen), el p-valor y el p-valor ajustado por el total de genes analizados. En negrita se marcan los resultados estadísticamente significativos, es decir, p-valor ajustado < 0,05. Menores = 327; mayores = 152.

La carga mutacional tumoral se encuentra significativamente incrementada en los pacientes mayores a 61 años. Respecto al estado de MSI analizado, el cual puede ser estable (MSS) o inestable (MSI-H), los pacientes mayores a 61 años suelen tener un estado de microsatélite más inestable que los menores a ese punto de corte. La diferencia es significativa pero la fuerza de asociación (V de Cramer) es pequeña. Cabe destacar que, como se mencionó en la **Introducción**, de los casos hereditarios del 1% al 3% presentan MSI. Al observar las mutaciones pre-tratamiento de estos pacientes, el único gen mutado con un p-valor ajustado significativo fue EPHA5 (*EPH receptor A5*, pertenece a la subfamilia de receptores de efrina de la familia de las proteínas tirosin-quinasa), el cual se encuentra mutado con mayor frecuencia en los pacientes mayores a 61 años.

B. Infiltrado inmune pre-tratamiento en pacientes menores y mayores a 61 años con CRC.

Otra de las variables analizadas para validar los resultados obtenidos en la **sección 5.2.1.1.2.**, fue el infiltrado inmune utilizando la herramienta bioinformática MIXTURE con biopsias de pacientes pre-tratamiento con cáncer colorrectal obtenidas de TCGA (Fig. 18). Se tomaron pacientes en estadios avanzados (III y IV) y que no hayan tenido malignidad previa.

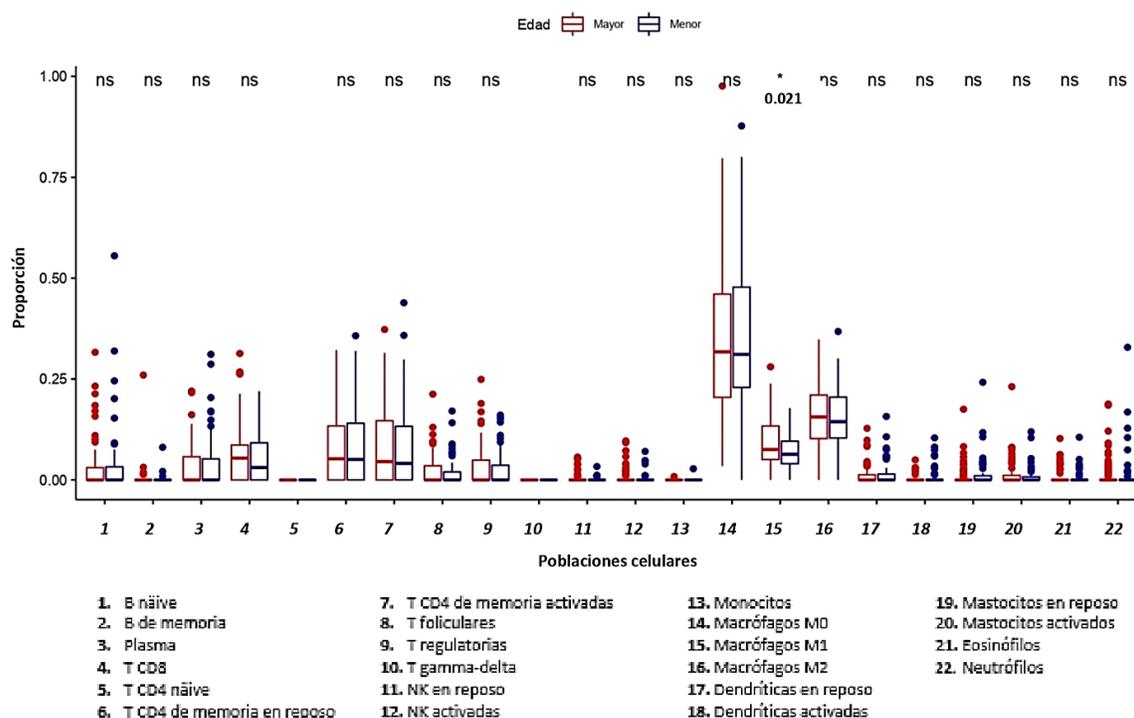


Figura 18: Gráficos de caja para cada población celular inmune analizada por MIXTURE.

Se comparan las proporciones de cada población celular inmune en pacientes menores y mayores a 61 años con CRC pre-tratamiento. En el eje de ordenadas se indican las proporciones son relativas, no absolutas; los números en el eje de abscisas indican cada población celular específica, detallada en las referencias debajo; se muestran sólo los p-valores significativos de la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica; ns: p-valor no significativo. Referencia: azul indica los pacientes menores al punto de corte, mientras que rojo indica los mayores. Menores = 66; mayores = 92.

Se observaron diferencias en una sola población, macrófagos M1, los cuales poseen una mayor proporción estadísticamente significativa en los pacientes mayores a 61 años. Cabe destacar que, aun quitando el *outlier* de los mayores (proporción = 0.28), se obtuvo un p-valor significativo igual a 0.027.

5.3.1.2. Evaluación del sitio metastásico como variable clínica de respuesta a inhibidores de punto de control inmunológico en cáncer

Para realizar el análisis de sobrevida global y sitio metastásico se utilizaron los mismos criterios mencionados anteriormente, donde se distinguía entre tipo tumoral e inmunoterapia aplicada. El único estudio que contaba con esta información fue Samstein *et al.*, en donde, se encontraban disponibles diferentes sitios de metástasis por paciente. Para el análisis sólo se tomaron los mayormente reportados en esta cohorte: pulmón, hígado, hueso y ganglio linfático (ver Tabla XIII). Cabe destacar que los primeros sitios metastásicos mencionados corresponden a pacientes en estadio IV, mientras que la metástasis en ganglios linfáticos indica estadio III del cáncer.

PD-1/PD-L1

| Cáncer | Ganglio | Hígado | Hueso | Pulmón |
|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Cabeza y Cuello | 26 | 1 | 0 | 4 |
| Colorectal | 12 | 30 | 0 | 25 |
| Esofagogastrico | 23 | 1 | 4 | 5 |
| Glioma | 20 | 2 | 3 | 10 |
| Mama | 3 | 7 | 0 | 2 |
| Melanoma | 28 | 13 | 4 | 26 |
| Origen Primario Desconocido | 4 | 10 | 5 | 2 |
| Pulmon de Celulas No-Pequeñas | 27 | 1 | 0 | 0 |
| Renal | 0 | 2 | 1 | 2 |
| Vejiga | 9 | 38 | 15 | 20 |

CTLA-4

| Cáncer | Ganglio | Hígado | Hueso | Pulmón |
|-----------------|-----------|----------|----------|-----------|
| Colorectal | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Esofagogastrico | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Mama | 1 | 7 | 2 | 2 |
| Melanoma | 15 | 4 | 1 | 17 |

COMBO

| Cáncer | Ganglio | Hígado | Hueso | Pulmón |
|-------------------------------|-----------|-----------|----------|-----------|
| Cabeza y Cuello | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Colorectal | 0 | 6 | 0 | 0 |
| Esofagogastrico | 7 | 0 | 2 | 2 |
| Glioma | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Mama | 1 | 2 | 0 | 0 |
| Melanoma | 32 | 11 | 1 | 18 |
| Origen Primario Desconocido | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Pulmon de Celulas No-Pequeñas | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Renal | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Vejiga | 1 | 2 | 4 | 1 |

Tabla XIII: Cantidad de pacientes con metástasis en ganglio linfático, hígado, hueso o pulmón, discriminando por terapia y tipo tumoral. Se observan tres escenarios diferentes, pacientes tratados con *anti PD-1/PD-L1*, *anti CTLA-4* o la *combinación* de estos dos. En cada caso se muestran el tipo tumoral y la cantidad de pacientes con los sitios metastásicos mayormente reportados: ganglio linfático, hígado, hueso y pulmón. En negrita se marcan los tipos de cáncer que se tuvieron en cuenta para el análisis.

Los análisis de sobrevida se realizaron para los tipos tumorales que tenían en al menos dos grupos de sitios metastásicos más de diez pacientes ($n > 10$), en este caso, pacientes con cáncer colorrectal, glioma, melanoma y cáncer de vejiga tratados con anti PD-1/PD-L1 (Fig. 19), y pacientes con melanoma tratados con anti CTLA-4 y la combinación de ambos (Fig. 20).

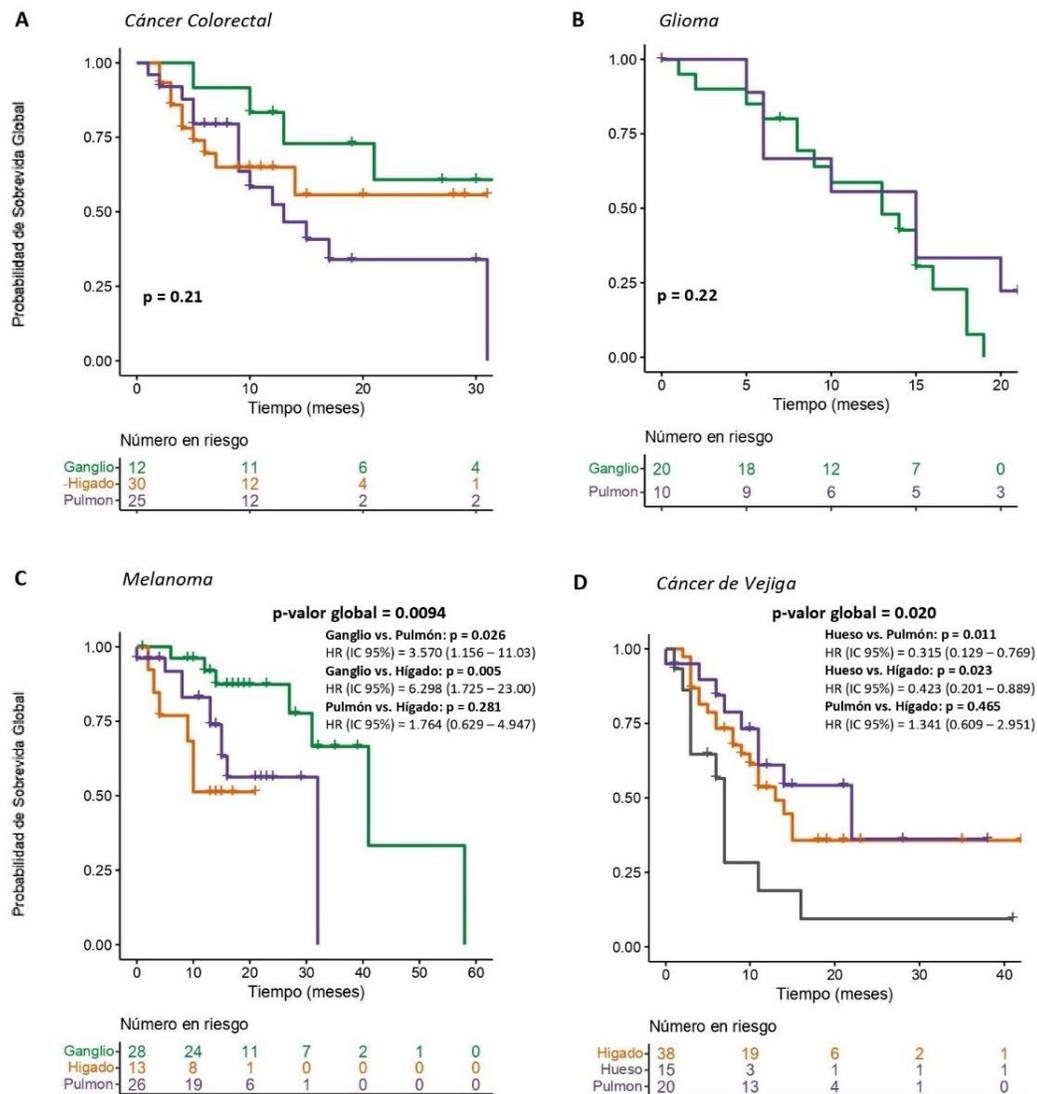


Figura 19: Curvas de supervida global (Kaplan-Meier) para diferentes tipos tumorales tratados con anti PD-1/PD-L1 comparando sitios metastásicos. **A. Cáncer colorrectal**, se comparan las metástasis en ganglio, hígado y pulmón. **B. Glioma**, se comparan las metástasis en ganglio y pulmón. **C. Melanoma**, se comparan las metástasis en ganglio, hígado y pulmón. **D. Cáncer de vejiga**, se comparan las metástasis en hueso, hígado y pulmón. Se indica p-valor global de cada Kaplan-Meier, en caso de ser significativo ese p-valor se realizaron las comparaciones entre los sitios metastásicos donde se informa el p-valor de cada una de las comparaciones, el cociente de riesgos (HR) e intervalo de confianza (IC 95%). Referencia: verde indica metástasis en ganglio linfático, naranja indica metástasis en hígado, violeta indica metástasis en pulmón, y gris indica metástasis en hueso.

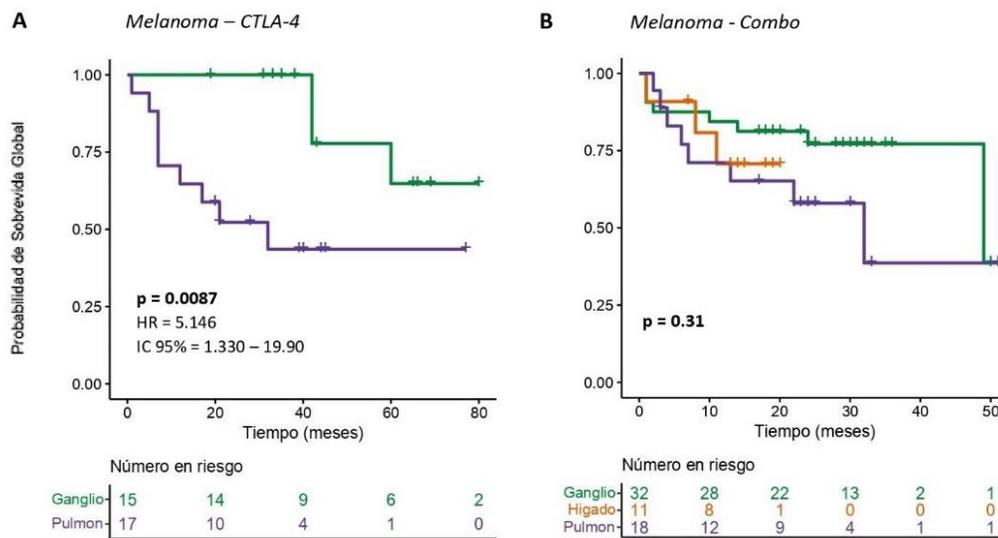


Figura 20: Curvas de supervida global (Kaplan-Meier) para pacientes con melanoma tratados con anti CTLA-4 o la combinación anti PD-1/PD-L1+CTLA-4, comparando sitios metastásicos. **A.** anti CTLA-4, se comparan las metástasis en ganglio y pulmón. **B.** anti PD-1/PD-L1+CTLA-4, se comparan las metástasis en ganglio, hígado y pulmón. Se indica p-valor global de cada Kaplan-Meier, el cociente de riesgos (HR) e intervalo de confianza (IC 95%). Referencia: verde indica metástasis en ganglio linfático, naranja indica metástasis en hígado y violeta indica metástasis en pulmón.

En el caso de los tipos tumorales tratados con anti PD-1/PD-L1 sólo se observaron diferencias significativas en la supervida global de los pacientes con melanoma y cáncer de vejiga. En melanoma la diferencia se observó entre metástasis en ganglios linfáticos e hígado, y entre metástasis en ganglios linfáticos y pulmón; no se obtuvo diferencias entre metástasis en pulmón e hígado. Respecto a cáncer de vejiga, la diferencia se encontró entre metástasis en hueso y pulmón, y metástasis en hueso e hígado; la diferencia entre metástasis en pulmón e hígado no fue estadísticamente significativa. Si consideramos al sitio metastásico de peor supervida global, en cada tipo tumoral, en melanoma es el hígado y en vejiga la metástasis en hueso.

En los pacientes con melanoma tratados con anti CTLA-4 se compararon dos sitios metastásicos, ganglios linfáticos y pulmón, donde el primero se encuentra beneficiado respecto de la supervida global. Por último, se compararon tres sitios metastásicos para los pacientes con melanoma tratados con la combinación de inmunoterapias, pero no se encontraron diferencias.

Si bien esta última comparación no fue estadísticamente significativa, se puede observar la tendencia de mejor supervivencia global para los pacientes con metástasis en ganglios linfáticos, al igual que en los pacientes con melanoma tratados con las monoterapias anti PD-1/PD-L1 y anti CTLA-4.

Es importante destacar que, como era esperado, la supervivencia global en melanoma se encuentra beneficiada en los pacientes con metástasis en ganglios linfáticos debido al estadio de la enfermedad. Sin embargo, las diferencias significativas se encontraron en las monoterapias, no así en la combinación de éstas, y en las mutaciones luego del tratamiento aplicado, como se muestra a continuación.

5.3.1.2.1. *Análisis de biomarcadores pronóstico de acuerdo a los sitios metastásicos en cáncer de vejiga tratados con anti PD-1/PD-L1, y melanoma tratados con anti PD-1/PD-L1 o anti CTLA-4*

Luego de obtener los resultados expuestos, se realizó el análisis de biomarcadores disponibles en el estudio, TMB y análisis de mutaciones diferenciales llevado a cabo post-tratamiento. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para comparar la TMB en caso de que sean dos sitios metastásicos, de lo contrario (>2) se utilizó la extensión de la misma, prueba de Kruskal-Wallis. Para cáncer de vejiga tratado con anti PD-1/PD-L1, no se obtuvo un p-valor significativo en ninguna de las comparaciones (hueso vs. pulmón = 0,79; hueso vs. hígado = 0,53; pulmón vs. hígado = 0,30). En melanoma tratados con anti PD-1/PD-L1 tampoco se obtuvo un p-valor menor al nivel de significancia requerido (ganglio vs. pulmón = 0,91; ganglio vs. hígado = 0,47; pulmón vs. hígado = 0,64). Por último, en los pacientes con melanoma tratados con CTLA-4 no se obtuvieron tampoco diferencias significativas (ganglio vs. pulmón = 0,84).

Respecto a los análisis de genes mutados en menor o mayor proporción, se realizaron las mismas comparaciones descritas para la TMB, pero se obtuvieron diferencias significativas sólo en las comparaciones de metástasis en pulmón y ganglios linfáticos en melanoma, tanto para los pacientes tratados con PD-1/PD-L1 como con CTLA-4 (ver Tabla XIV). En el resto, no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos (datos no mostrados).

Post PD-1/PD-L1

Metástasis: Ganglio vs. Pulmón

| Gen mutado | Grupo afectado | p-valor | p-valor ajustado |
|---------------|----------------|---------|------------------|
| KMT2A | Pulmón | <0.0001 | 0.0100 |
| EPHA7 | Pulmón | 0.0034 | 0.0206 |
| EP300 | Pulmón | 0.0034 | 0.0206 |
| MDC1 | Pulmón | 0.0034 | 0.0206 |
| PGR | Pulmón | 0.0034 | 0.0206 |
| CARD11 | Pulmón | 0.0100 | 0.0429 |
| TET2 | Pulmón | 0.0100 | 0.0429 |
| TP53 | Pulmón | 0.0123 | 0.0464 |

Post CTLA-4

Metástasis: Ganglio vs. Pulmón

| Gen mutado | Grupo afectado | p-valor | p-valor ajustado |
|-------------|----------------|---------|------------------|
| NRAS | Pulmón | 0.0020 | 0.0125 |
| CDKN2A | Ganglio | 0.1790 | 0.3580 |
| CTNNB1 | Ganglio | 0.1790 | 0.3580 |

Tabla XIV: Mutaciones post-tratamiento para pacientes con melanoma metastásico en ganglio o pulmón tratados con anti PD-1/PD-L1 y anti CTLA-4. Se muestran algunos de los genes obtenidos para el análisis *post-anti PD-1/PD-L1* y *post-anti CTLA-4*, el grupo afectado (mutación del gen), el p-valor y el p-valor ajustado por el total de genes analizados. En negrita se marcan los resultados estadísticamente significativos, es decir, p-valor ajustado < 0,05. Las biopsias provienen del tumor primario.

Al observar las mutaciones post-tratamiento anti PD-1/PD-L1 de los pacientes, se obtuvieron ocho genes con p-valor ajustado significativo, los cuales se encuentran mutados en mayor medida en los pacientes con melanoma metastásico en pulmón. Los genes son: KMT2A (*lysine methyltransferase 2A*), EPHA7 (*EPH receptor A7*), EP300 (*E1A binding protein p300*), MDC1 (*mediator of DNA damage checkpoint 1*), PGR (*progesterone receptor*), CARD11 (*caspase recruitment domain family member 11*), TET2 (*tet methylcytosine dioxygenase 2*) y TP53 (*tumor protein p53*). Respecto a los pacientes tratados con anti CTLA-4, al observar las mutaciones post-tratamiento, el único gen mutado con un p-valor ajustado significativo fue NRAS (*NRAS proto-oncogene, GTPase*), el cual se encuentra más mutado en los pacientes con melanoma metastásico en pulmón.

5.3.2. Asociación de la sobrevida libre de progresión y variables clínicas disponibles de pacientes con diferentes tipos tumorales tratados con anti PD-1, anti CTLA-4 o la combinación de estos.

5.3.2.1. Evaluación de la edad como variable clínica de respuesta a inhibidores de punto de control inmunológico en cáncer

5.3.2.1.1. Búsqueda de punto de corte óptimo para la edad en diferentes tipos de cáncer distinguiendo por terapia, considerando la sobrevida libre de progresión de los pacientes.

En los análisis previos se observaron diferencias en los resultados al discriminar por terapias, es decir entre inhibidores de punto de control inmunológico, probablemente porque los ICI poseen mecanismos de acción diferentes. Por esa razón, se consideró esta variable para buscar el punto óptimo de corte para la edad tomando en cuenta la sobrevida libre de progresión de los pacientes. Los tipos de cáncer presentes en los seis estudios considerados para el análisis fueron: melanoma, cáncer de pulmón de células no-pequeñas y cáncer renal. Las terapias disponibles en los estudios fueron anti PD-1 para los tres tipos de cáncer (ver Tabla XV), anti CTLA-4 sólo para melanoma (ver Tabla XVI), y la combinación de ambas para melanoma y cáncer de pulmón de células no-pequeñas (ver Tabla XVII).

| MELANOMA | | | | | | CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO-PEQUEÑAS | | | | | | CÁNCER RENAL | | | | | |
|-----------------------|---------|-----------|-----------|------|-----------|---|---------|-----------|-----------|------|-----------|-----------------------|---------|-----------|-----------|------|-----------|
| Punto de corte (años) | p-valor | N Menores | N Mayores | HR | IC 95% | Punto de corte (años) | p-valor | N Menores | N Mayores | HR | IC 95% | Punto de corte (años) | p-valor | N Menores | N Mayores | HR | IC 95% |
| 58 | 0.0407 | 17 | 37 | 2.02 | 1.00-4.04 | 56 | 0.0608 | 10 | 36 | 2.30 | 0.94-5.65 | 55 | 0.0534 | 169 | 427 | 1.21 | 0.99-1.46 |
| 70 | 0.0409 | 35 | 19 | 2.23 | 1.00-4.95 | 57 | 0.1711 | 14 | 32 | 1.78 | 0.76-4.15 | 68 | 0.0610 | 461 | 135 | 1.21 | 0.99-1.49 |
| 61 | 0.0645 | 20 | 34 | 1.87 | 1.95-3.68 | 58 | 0.1711 | 14 | 32 | 1.78 | 0.76-4.15 | 61 | 0.0680 | 294 | 302 | 1.17 | 0.98-1.39 |
| 57 | 0.0742 | 16 | 38 | 1.86 | 0.93-3.75 | 59 | 0.1774 | 17 | 29 | 1.75 | 0.77-1.98 | 63 | 0.0966 | 343 | 253 | 1.16 | 0.97-1.38 |
| 69 | 0.0798 | 34 | 20 | 1.95 | 0.91-4.18 | 55 | 0.2587 | 8 | 38 | 1.77 | 0.65-4.83 | 60 | 0.0980 | 271 | 325 | 1.15 | 0.97-1.37 |
| 62 | 0.1032 | 22 | 32 | 1.74 | 0.88-3.41 | 60 | 0.2662 | 19 | 27 | 1.59 | 0.70-3.62 | 65 | 0.1023 | 406 | 190 | 1.16 | 0.96-1.40 |
| 59 | 0.1157 | 18 | 36 | 1.72 | 0.86-3.41 | 62 | 0.3993 | 23 | 23 | 1.42 | 0.62-3.26 | 59 | 0.1337 | 243 | 353 | 1.14 | 0.96-1.36 |
| 60 | 0.1157 | 18 | 36 | 1.72 | 0.86-3.41 | 64 | 0.5337 | 29 | 17 | 1.32 | 0.54-3.23 | 69 | 0.1403 | 479 | 117 | 1.17 | 0.94-1.46 |
| 68 | 0.1198 | 30 | 24 | 1.73 | 0.85-3.51 | 61 | 0.5620 | 22 | 24 | 1.27 | 0.56-2.90 | 67 | 0.1477 | 446 | 150 | 1.15 | 0.94-1.41 |
| 55 | 0.1475 | 15 | 39 | 1.67 | 0.82-3.41 | 68 | 0.6771 | 35 | 11 | 0.81 | 0.29-2.23 | 58 | 0.1767 | 219 | 377 | 1.13 | 0.94-1.35 |
| 56 | 0.1475 | 15 | 39 | 1.67 | 0.82-3.41 | 69 | 0.6771 | 35 | 11 | 0.81 | 0.29-2.23 | 64 | 0.1863 | 383 | 213 | 1.12 | 0.94-1.35 |
| 67 | 0.2112 | 29 | 25 | 1.55 | 0.77-3.10 | 70 | 0.6771 | 35 | 11 | 0.81 | 0.29-2.23 | 62 | 0.1923 | 314 | 282 | 1.12 | 0.94-1.33 |
| 63 | 0.3979 | 24 | 30 | 1.33 | 0.68-2.62 | 63 | 0.6771 | 26 | 20 | 1.19 | 0.51-2.77 | 56 | 0.2037 | 188 | 408 | 1.12 | 0.93-1.36 |
| 66 | 0.4467 | 27 | 27 | 1.30 | 0.65-2.56 | 65 | 0.7764 | 31 | 15 | 1.14 | 0.47-2.76 | 66 | 0.2144 | 431 | 165 | 1.13 | 0.93-1.36 |
| 64 | 0.6366 | 25 | 29 | 1.17 | 0.59-2.31 | 66 | 0.9078 | 33 | 13 | 1.05 | 0.41-2.68 | 57 | 0.4536 | 205 | 391 | 1.07 | 0.89-1.28 |
| 65 | 0.6366 | 25 | 29 | 1.17 | 0.59-2.31 | 67 | 0.9078 | 33 | 13 | 1.05 | 0.41-2.68 | 70 | 0.4841 | 498 | 98 | 1.08 | 0.86-1.36 |

Tabla XV: Puntos de corte para la edad en pacientes tratados con anti PD-1 con melanoma, cáncer de pulmón de células no-pequeñas y cáncer renal, considerando la sobrevida libre de progresión. Se muestran tres escenarios diferentes: melanoma, NSCLC, y RCC, para cada uno de estos tipos tumorales se exponen las iteraciones de 55 a 70 años, el p-valor obtenido de la curva de sobrevida (Kaplan-Meier) de menores y mayores a cada punto de corte, la cantidad

de pacientes menores y mayores a ese punto de corte, el cociente de riesgos (HR) y su intervalo de confianza del 95% (IC 95%).

| MELANOMA | | | | | |
|-----------------------|---------|-----------|-----------|------|-----------|
| Punto de corte (años) | p-valor | N Menores | N Mayores | HR | IC 95% |
| 67 | 0.3091 | 65 | 45 | 0.81 | 0.54-1.21 |
| 58 | 0.5834 | 48 | 62 | 1.12 | 0.75-1.66 |
| 65 | 0.5885 | 61 | 49 | 0.89 | 0.60-1.33 |
| 66 | 0.6260 | 62 | 48 | 0.90 | 0.60-1.35 |
| 70 | 0.6817 | 78 | 32 | 0.91 | 0.59-1.40 |
| 68 | 0.6915 | 71 | 39 | 0.92 | 0.60-1.39 |
| 57 | 0.7139 | 47 | 63 | 1.08 | 0.72-1.60 |
| 59 | 0.7609 | 51 | 59 | 1.06 | 0.71-1.58 |
| 69 | 0.8723 | 76 | 34 | 1.03 | 0.67-1.59 |
| 60 | 0.8792 | 52 | 58 | 0.97 | 0.65-1.44 |
| 55 | 0.8887 | 44 | 66 | 1.03 | 0.69-1.54 |
| 56 | 0.8887 | 44 | 66 | 1.03 | 0.69-1.54 |
| 63 | 0.9018 | 58 | 52 | 0.97 | 0.65-1.45 |
| 62 | 0.9068 | 56 | 54 | 0.97 | 0.65-1.45 |
| 61 | 0.9225 | 55 | 55 | 0.98 | 0.66-1.46 |
| 64 | 0.9609 | 59 | 51 | 1.01 | 0.67-1.50 |

Tabla XVI: Puntos de corte para la edad en pacientes con melanoma tratados con anti CTLA-4 considerando la sobrevida libre de progresión. Se muestran las iteraciones de 55 a 70 años, el p-valor obtenido de la curva de sobrevida (Kaplan-Meier) de menores y mayores a cada punto de corte, la cantidad de pacientes menores y mayores a ese punto de corte, el cociente de riesgos (HR) y su intervalo de confianza del 95% (IC 95%).

| MELANOMA | | | | | | CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS NO-PEQUEÑAS | | | | | |
|-----------------------|---------|-----------|-----------|------|-----------|---|---------|-----------|-----------|------|-----------|
| Punto de corte (años) | p-valor | N Menores | N Mayores | HR | IC 95% | Punto de corte (años) | p-valor | N Menores | N Mayores | HR | IC 95% |
| 62 | 0.0036 | 33 | 18 | 6.59 | 1.52-28.5 | 68 | 0.2009 | 48 | 27 | 1.47 | 0.81-2.68 |
| 63 | 0.0062 | 34 | 17 | 6.04 | 1.39-26.1 | 70 | 0.2331 | 52 | 23 | 1.46 | 0.78-2.71 |
| 59 | 0.0106 | 32 | 19 | 4.35 | 1.27-14.8 | 67 | 0.2345 | 45 | 30 | 1.42 | 0.79-2.53 |
| 60 | 0.0106 | 32 | 19 | 4.35 | 1.27-14.8 | 69 | 0.3621 | 51 | 24 | 1.32 | 0.72-2.43 |
| 61 | 0.0106 | 32 | 19 | 4.35 | 1.27-14.8 | 66 | 0.3813 | 40 | 35 | 1.28 | 0.73-2.25 |
| 64 | 0.0113 | 35 | 16 | 5.41 | 1.25-23.4 | 55 | 0.4551 | 14 | 61 | 1.32 | 0.63-2.73 |
| 65 | 0.0113 | 35 | 16 | 5.41 | 1.25-23.4 | 56 | 0.6232 | 19 | 56 | 1.18 | 0.61-2.25 |
| 66 | 0.0196 | 36 | 15 | 4.84 | 1.12-20.9 | 64 | 0.6710 | 36 | 39 | 1.12 | 0.64-1.96 |
| 58 | 0.0312 | 29 | 22 | 2.89 | 1.05-7.98 | 60 | 0.6867 | 28 | 47 | 0.88 | 0.49-1.59 |
| 68 | 0.0312 | 40 | 11 | 6.65 | 0.88-49.8 | 65 | 0.7172 | 37 | 38 | 1.11 | 0.63-1.93 |
| 69 | 0.0312 | 40 | 11 | 6.65 | 0.88-49.8 | 63 | 0.7827 | 35 | 40 | 1.09 | 0.61-1.88 |
| 67 | 0.0329 | 37 | 14 | 4.31 | 0.99-18.6 | 58 | 0.7916 | 25 | 50 | 1.09 | 0.59-1.96 |
| 70 | 0.0524 | 41 | 10 | 5.79 | 0.77-43.4 | 57 | 0.8844 | 22 | 53 | 1.95 | 0.50-1.79 |
| 57 | 0.0594 | 27 | 24 | 2.44 | 0.94-6.37 | 62 | 0.8969 | 32 | 43 | 0.96 | 0.54-1.69 |
| 56 | 0.1144 | 24 | 27 | 2.03 | 0.83-4.98 | 61 | 0.9113 | 31 | 44 | 0.97 | 0.54-1.71 |
| 55 | 0.2304 | 21 | 30 | 1.70 | 0.70-4.09 | 59 | 0.9830 | 27 | 48 | 0.99 | 0.55-1.78 |

Tabla XVII: Puntos de corte para la edad en pacientes tratados con PD-1+CTLA-4 con melanoma y cáncer de pulmón de células no-pequeñas, considerando la sobrevida libre de progresión. Se muestran dos escenarios diferentes: *melanoma* y *NSCLC*, para cada tipo tumoral se exponen las iteraciones de 55 a 70 años, el p-valor obtenido de la curva de sobrevida (Kaplan-Meier) de menores y mayores a cada punto de corte, la cantidad de pacientes menores y mayores a ese punto de corte, el cociente de riesgos (HR) y su intervalo de confianza del 95%

(IC 95%). En negrita se marcan los resultados estadísticamente significativos, es decir, p -valor $< 0,05$ e IC 95% sin tomar al 1,00.

Tanto para los pacientes tratados con anti PD-1 como con anti CTLA-4, en los tipos tumorales estudiados, los resultados no fueron significativos. En el caso de los pacientes con melanoma tratados con PD-1, se vieron dos puntos de corte con p -valor significativo, pero se descartaron debido al IC 95% que toma al valor nulo. Para los pacientes tratados con la combinación de terapias en cáncer de pulmón de células no-pequeñas tampoco se obtuvieron diferencias. Sin embargo, sólo en los pacientes tratados con el combo de terapias en melanoma se observaron diferencias, donde el punto de corte más significativo fue 62 años (p -valor = 0.0036). En este caso, los mayores a 62 años tratados con el tratamiento mencionado muestran una mayor supervivencia libre de progresión respecto de los menores a dicho punto de corte. Además del nivel de significancia estadística dada por el p -valor, a este resultado, lo acompaña un intervalo de confianza del 95% para el cociente de riesgos bastante alejado del valor nulo. Como se puede observar en la Tabla XVII de melanoma, la diferencia no sólo se obtuvo con 62 años, sino que se obtuvo para un rango de edades de 59 a 66 años, donde el beneficio siempre tiende a los mayores.

Teniendo en cuenta lo anterior, se analizaron las respuestas según el Criterio de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos, las cuales se encontraban disponibles en tres estudios (Auslander *et al.*, 2018; Sade-Feldman *et al.*, 2018; Gide *et al.*, 2019) con el fin de encontrar si existe relación entre los puntos de corte significativos (59-66 años), la supervivencia libre de progresión y la respuesta, y poder disminuir este rango de edades. En el estudio Sade-Feldman *et al.*, su criterio para dividir a los grupos en respondedores (R) y no respondedores (NR) fue CR/PR (Respuesta Completa/Respuesta Parcial) y SD/PD (Enfermedad Estable/Enfermedad Progresiva), respectivamente. En el estudio Auslander *et al.*, sólo un paciente fue tratado con el combo y fue considerado respondedor según los autores. Por último, en el estudio Gide *et al.*, las respuestas RECIST se encontraban por separado para cada paciente: CR, PD, PR y SD. Debido al criterio que utilizaron en el Sade-Feldman *et al.* y que las respuestas RECIST no se encontraban de manera individual, se tomó ese criterio para los respondedores y no respondedores de los tres estudios (ver Tabla XVIII).

| Punto de corte (años) | N Menores | N Mayores | R | NR | p-valor (Fisher) | OR | IC 95% |
|-----------------------|-----------|-----------|----|----|------------------|------|-----------|
| 62 | 37 | 20 | 40 | 17 | 0.0179 | 0.16 | 0.01-0.87 |
| 58 | 33 | 24 | 40 | 17 | 0.0195 | 0.19 | 0.03-0.87 |
| 63 | 38 | 19 | 40 | 17 | 0.0322 | 0.18 | 0.01-0.96 |
| 64 | 39 | 18 | 40 | 17 | 0.0598 | 0.20 | 0.02-1.07 |
| 65 | 39 | 18 | 40 | 17 | 0.0598 | 0.20 | 0.02-1.07 |
| 66 | 40 | 17 | 40 | 17 | 0.0638 | 0.22 | 0.02-1.20 |
| 59 | 36 | 21 | 40 | 17 | 0.0725 | 0.26 | 0.04-1.17 |
| 60 | 36 | 21 | 40 | 17 | 0.0725 | 0.26 | 0.04-1.17 |
| 61 | 36 | 21 | 40 | 17 | 0.0725 | 0.26 | 0.04-1.17 |

Respuesta en los estudios

| Feldman et al. | | Auslander et al. | |
|----------------|-------|------------------|----|
| CR/PR | SD/PD | R | NR |
| 4 | 1 | 1 | 0 |

| Gide et al. | | | |
|-------------|----|----|----|
| CR | PR | SD | PD |
| 15 | 20 | 5 | 11 |

Tabla XVIII: Puntos de corte para la edad en pacientes con melanoma tratados con PD-1+CTLA-4, considerando la respuesta (RECIST). A la izquierda, se exponen las iteraciones de 59 a 66 años, la cantidad de pacientes menores y mayores a ese punto de corte, la cantidad de pacientes respondedores y no respondedores en total, el p-valor obtenido de la prueba de Fisher, el cociente de riesgos (HR) y su intervalo de confianza del 95% (IC 95%). En negrita se marcan los resultados estadísticamente significativos, es decir, p-valor < 0,05 e IC 95% sin tomar al 1,00. A la derecha, se muestran las respuestas reportadas en los tres estudios considerados para el análisis.

De las edades significativas (59-66 años) para el análisis de sobrevida libre de progresión, sólo tres fueron significativas en el análisis de la respuesta siendo éstas 58, 62 y 63 años, donde nuevamente 62 años fue el más significativo (Fig. 21).

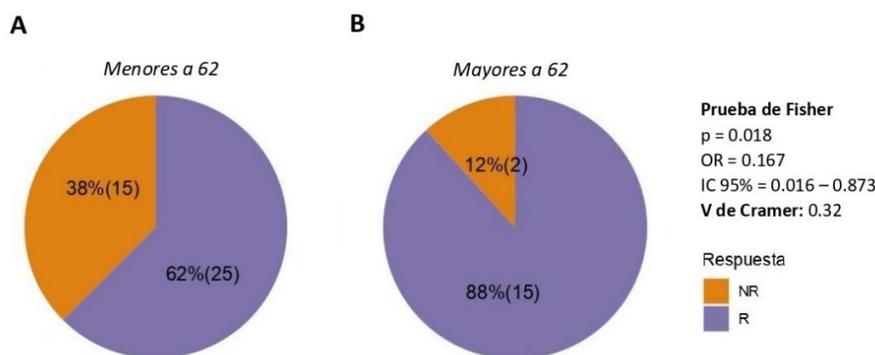


Figura 21: Gráficos de torta para pacientes con melanoma tratados con anti PD-1+CTLA-4, punto de corte 62 años. A. Gráfico de torta indica el porcentaje de pacientes **menores a 62 años** respondedores y no respondedores, entre paréntesis se encuentra el número de pacientes. B. Gráfico de torta indica el porcentaje de pacientes **mayores a 62 años** respondedores y no respondedores, entre paréntesis se encuentra el número de pacientes. Se indica p-valor de la

prueba de Fisher, cociente de probabilidades (OR), intervalo de confianza (IC 95%), V de Cramer para la fuerza de asociación. Referencia: naranja indica los pacientes no respondedores al combo, mientras que violeta indica los respondedores al tratamiento.

Los puntos de corte de 58 y 63 años años, si bien dieron un p-valor estadísticamente significativo y los IC 95% del cociente de probabilidades (OR por su nombre en inglés *odds ratio*) fueron válidos, no se tuvieron en cuenta para los análisis subsiguientes. Esto debido a que se eligió como punto de corte óptimo para pacientes tratados con la combinación anti PD-1 y anti CTLA-4, la edad de 62 años ya que tanto en el análisis de sobrevida libre de progresión como en el de respuesta fue el más significativo, estadísticamente. Cabe destacar que la tendencia se observa siempre en beneficio de la sobrevida libre de progresión ($HR > 1$) y la respuesta para los mayores a los puntos de corte mencionados.

5.3.2.1.1.1. Análisis de biomarcadores predictivos y pronóstico de la cohorte de descubrimiento de melanoma tratado con anti PD-1+CTLA-4 utilizando como punto de corte de edad 62 años

Para continuar con el análisis de sobrevida libre de progresión se utilizaron los datos, a partir de los cuales surgieron los resultados de la Tabla XVII, del estudio Gide *et al.* (Fig. 22), ya que era el único con datos de PFS y combinación de ICI. Se utilizaron los datos disponibles de ese grupo (menores = 33; mayores = 18), tanto pre-tratamiento como post-tratamiento, para el análisis de los distintos biomarcadores.

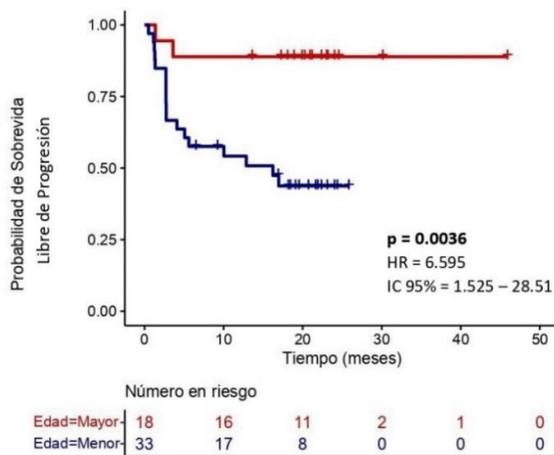


Figura 22: Curva de sobrevida libre de progresión (Kaplan-Meier) para melanoma, tratamiento PD-1+CTLA-4. Punto de corte 62 años. Se indica p-valor, cociente de riesgos (HR) e intervalo de confianza (IC 95%). Referencia: azul indica los pacientes menores al punto de corte, mientras que rojo indica los mayores.

A. Expresión diferencial de genes e infiltrado inmune pre y post-tratamiento en pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma.

En primer lugar, se utilizaron los datos transcriptómicos pre-tratamiento para realizar un análisis de expresión diferencial de genes entre las biopsias de pacientes menores y mayores a 62 años. Los resultados no fueron estadísticamente significativos, es decir que no se observaron diferencias a nivel de expresión de genes entre ambos grupos (datos no mostrados). A continuación, se analizó el infiltrado inmune utilizando la herramienta bioinformática MIXTURE y el índice citolítico (CYT por su nombre en inglés *cytolytic score*) tanto de las biopsias pre-tratamiento como post-tratamiento (Fig. 23). Cabe destacar que la cantidad de pacientes que tenían datos de expresión post-tratamiento era muy pequeño.

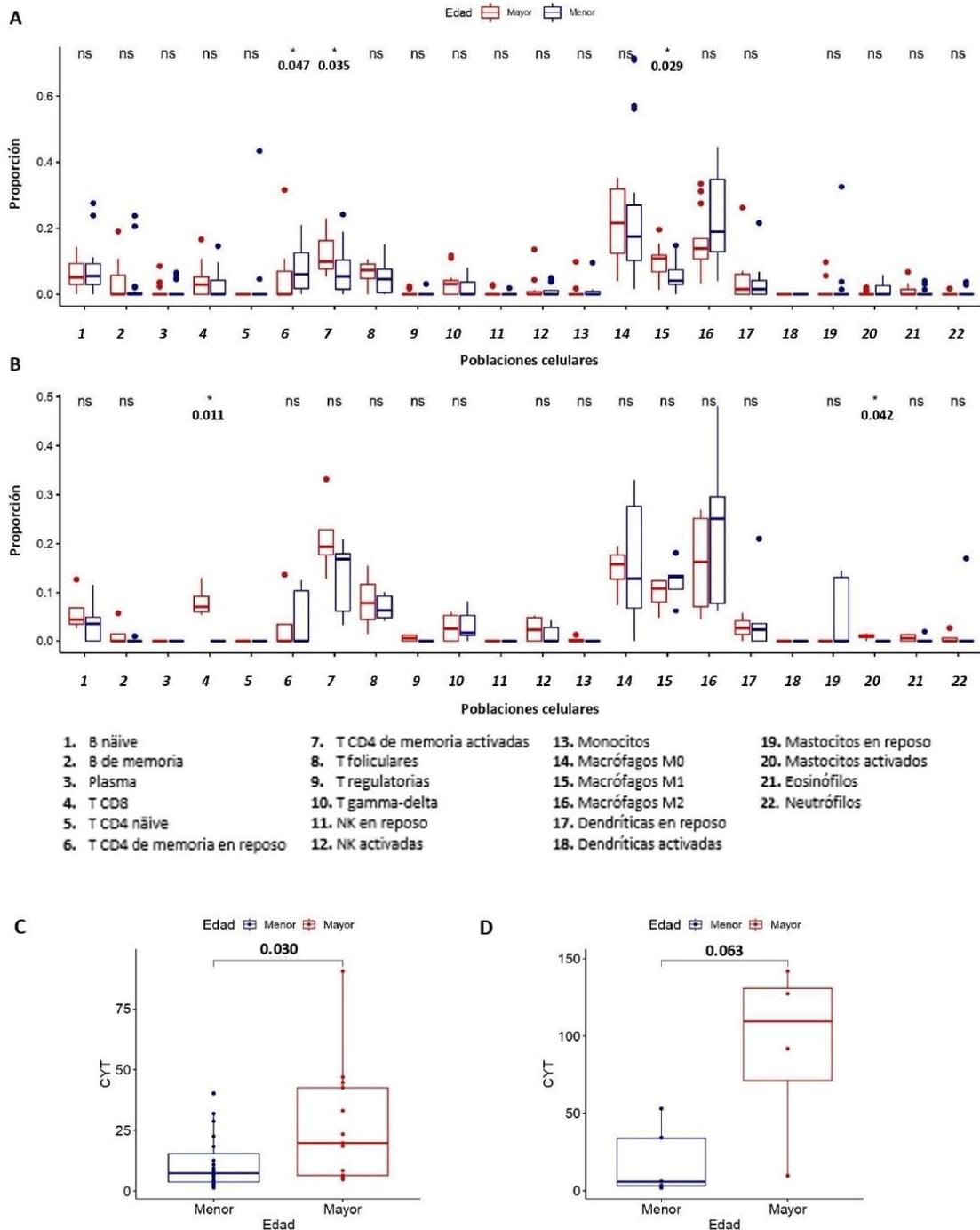


Figura 23: Gráficos de caja para cada población celular inmune analizada por MIXTURE e índice citolítico (CYT). A. Pre-tratamiento. Se comparan las proporciones de cada población celular inmune en pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma pre-combo (menores = 33; mayores = 18). **B. Post-tratamiento.** Se comparan las proporciones de cada

población celular inmune en pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma post-combo (menores = 5; mayores = 4). En el eje de ordenadas se indican las proporciones son relativas, no absolutas; los números en el eje de abscisas indican cada población celular específica, detallada en las referencias debajo; se muestran sólo los p-valores significativos de la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica; ns: p-valor no significativo. C., D. Gráficos de caja para el índice citolítico (CYT) en biopsias pre y post-tratamiento, respectivamente. Se muestran los p-valores obtenidos de la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica. Referencia: azul indica los pacientes menores al punto de corte, mientras que rojo indica los mayores.

En las biopsias pre-tratamiento, se observaron diferencias significativas en tres poblaciones celulares, células T CD4 de memoria en reposo, células T CD4 de memoria activadas y macrófagos M1. La primera población se encuentra significativamente incrementada en los menores a 62 años, mientras que las otras se ven incrementadas en los mayores a 62 años. Luego, en las biopsias post-combo, se obtuvieron diferencias en dos poblaciones inmunes, las células T CD8 y los mastocitos activados, ambas significativamente aumentadas en los mayores a 62 años. De todas formas, este último resultado se obtuvo con una cantidad muy pequeña de pacientes en cada grupo de interés. Respecto al índice citolítico, en las biopsias pre-tratamiento es significativamente superior en los mayores a 62 años que en los menores, en las muestras post-tratamiento no se obtuvo significancia estadística. Sin embargo, la tendencia es hacia a los mayores al punto de corte establecido.

B. Análisis funcionales de genes utilizando GSEA, DoRothEA y PROGENy en biopsias pre-tratamiento de pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma.

Además, con los datos de expresión se realizó un análisis funcional de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) (Fig. 24), y dos análisis de inferencia de actividad para obtener resultados sobre la actividad de los factores de transcripción y la actividad de 14 vías de señalización, a través de dos herramientas bioinformáticas DoRothEA y PROGENy (Fig. 24), respectivamente.

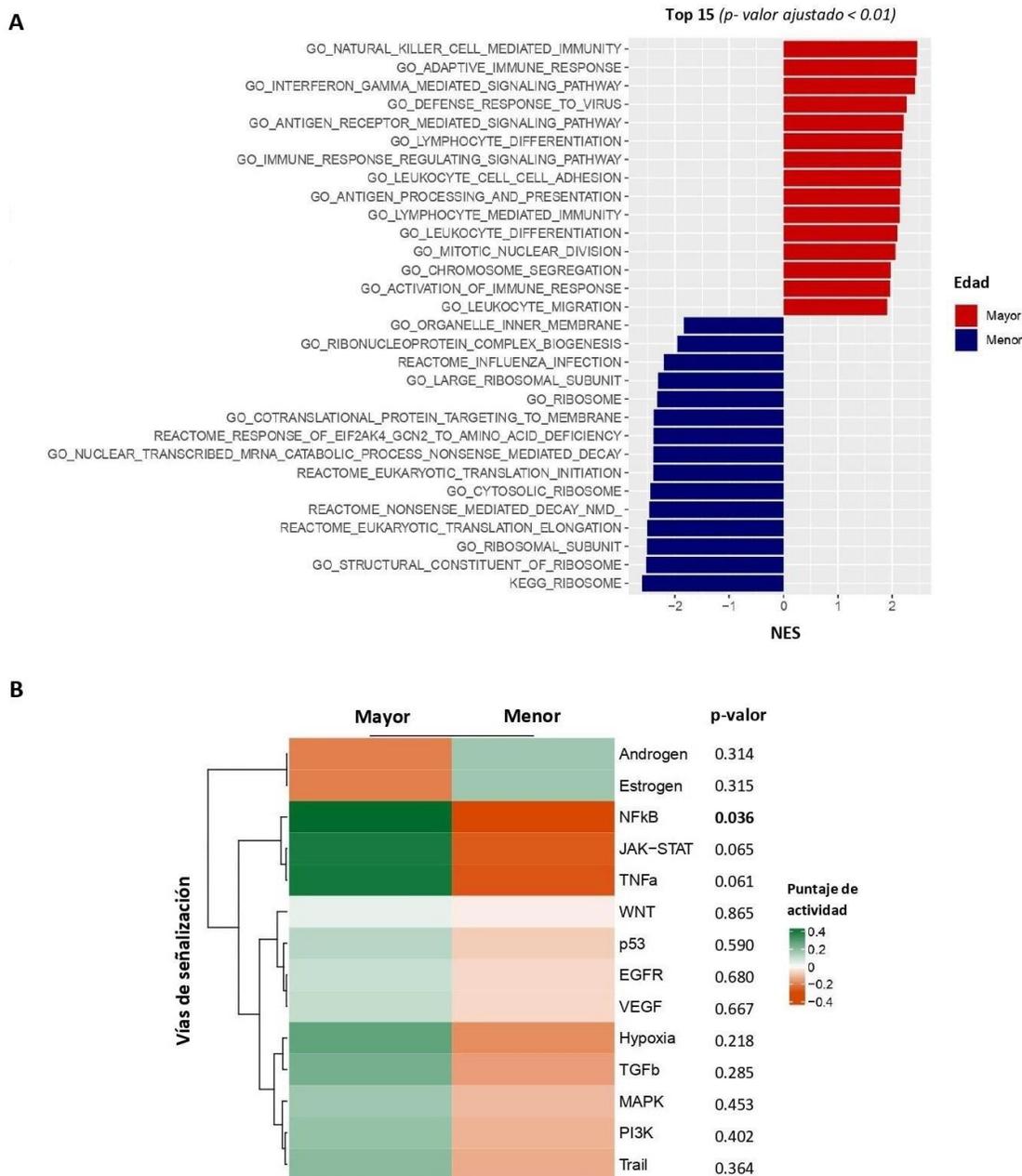


Figura 24: Análisis GSEA y PROGENy de biopsias pre-anti PD-1+CTLA-4 de la cohorte de descubrimiento. A. GSEA. En el eje de ordenadas se muestran los 15 términos, obtenidos de MsigDB, más significativos (*p*-valor ajustado < 0,01) para menores y mayores a 62 años, 30 términos en total; en el eje de abscisas se observa el puntaje de enriquecimiento normalizado (NES), NES > 1 indica que ese término significativo se encuentra incrementado en los mayores a 62 años, mientras que NES < 1 indica que ese término significativo se

encuentra incrementado en los menores a 62 años. Referencia: azul indica los pacientes menores al punto de corte, mientras que rojo indica los mayores. **B. PROGENy.** Se muestran las 14 vías de señalización provistas por el paquete utilizado, el p-valor de las comparaciones de la actividad de esas vías entre menores y mayores a 62 años. Referencia: naranja indica un puntaje de actividad bajo, mientras que verde indica un puntaje de actividad alto, cuanto más se difumina el color y se asemeja a blanco la diferencia es prácticamente nula. Menores = 33; mayores = 18.

En el análisis GSEA los treinta términos de las vías enriquecidas expuestos en la Figura 24, obtenidos tal cual de *MSigDB* (colecciones Hallmark, C2 REACTOME, C2 KEGG, C5, descritas en la **sección de Materiales y Métodos**), fueron estadísticamente significativos (p-valor ajustado < 0,01). En el caso de los mayores a 62 años, gran parte de los términos se relacionan con el sistema inmunológico, tal como “*GO natural killer cell mediated immunity*” (Inmunidad mediada por células NK), “*GO adaptive immune response*” (Respuesta del S.I. adaptativo), “*GO interferon gamma mediated signaling pathway*” (Señalización mediada por INF- γ), “*GO antigen receptor mediated signaling pathway*” (Señalización mediada por receptor de antígeno), “*GO lymphocyte differentiation*” (Diferenciación de linfocitos), “*GO lymphocyte mediated immunity*” (Inmunidad mediada por linfocitos), “*GO leukocyte migration*” (Migración de leucocitos), entre otros (Ashburner *et al.*, 2000; *Gene Ontology Consortium*, 2021). Respecto de los menores a 62 años, la mayoría de los términos podrían estar vinculados al proceso de traducción debido a que gran parte de los términos mencionan al ribosoma, su biogénesis, su actividad, otros describen la ubicación (por ejemplo “*Cotranslational protein targeting to membrane*”, proteína cotraduccional dirigida a la membrana) y metabolismo (como “*Eukaryotic translation elongation*”, traducción eucariota fase de elongación) de las proteínas; algunos mencionan el metabolismo del ARN (como “*Nonsense mediated decay: NMD*”, decaimiento sin sentido) (Sidiropoulos *et al.*, 2017; Fabregat *et al.*, 2017; Ashburner *et al.*, 2000; *Gene Ontology Consortium*, 2021).

En el análisis de actividad de vías de señalización (PROGENy) se observaron diferencias significativas en la actividad de una sola vía: NF κ B, la cual se encuentra incrementada en los pacientes mayores a 62 años con melanoma, y disminuida en los menores. El resto de los p-valores de las actividades de las vías fueron superiores al nivel de significancia requerido (p-valor > 0,05), sólo en las actividades de las vías JAK-STAT y TNF α (factor de

necrosis tumoral α) se observó una tendencia a estar incrementadas en los mayores al punto de corte. En el análisis de predicción de actividad de los factores de transcripción (DoRothEA) no se obtuvieron resultados estadísticamente significativos (resultados no mostrados).

5.3.2.1.1.2. Validación, a través de biomarcadores predictivos establecidos, del uso de 62 años como punto de corte predictivo de edad para recibir anti PD-1+CTLA-4 en melanoma.

Hasta aquí, en melanoma se observó una diferencia entre pacientes menores y mayores a 62 años de edad tratados con la combinación anti PD-1+CTLA-4 en la cohorte de descubrimiento del estudio Gide *et al.*, y estas diferencias a nivel de supervivencia libre de progresión fueron respaldadas por los resultados de los análisis transcriptómicos presentados. Por lo tanto, los análisis a continuación se realizaron con el fin de validar lo obtenido en los resultados anteriores, tomando diferentes cohortes de pacientes con melanoma de TCGA (estadio III y IV sin malignidad previa) y otros estudios reportados, los cuales no fueron tratados previamente con ninguna inmunoterapia (Snyder *et al.*, 2014; Van Allen *et al.*, 2015; Hugo *et al.*, 2016; National Cancer Institute and National Human Genome Research Institute, 2016; Auslander *et al.*, 2018; Sade-Feldman *et al.*, 2018; Gide *et al.*, 2019) o fueron tratados con la combinación anti PD-1 y anti CTLA-4 (Samstein *et al.*, 2019). Al tratarse de muestras pre-tratamiento, esto permite llevar a cabo un análisis previo a la administración de la droga con el objetivo de evaluar posibles biomarcadores que permitan predecir la respuesta a la misma.

A. Mutaciones somáticas y TMB pre y post-tratamiento en pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma.

A partir del estudio Samstein *et al.*, se analizó el único biomarcador disponible, siendo este la carga mutacional tumoral luego del tratamiento. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica para comparar la TMB de los pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma tratados con el combo y, no se observaron diferencias significativas (p-valor = 0,51). En este mismo estudio, se encontraban disponibles las mutaciones post-tratamiento, mientras que en TCGA las mutaciones pre-tratamiento (ver Tabla XIX). En el Centro Oncológico Memorial Sloan Kettering (MSK), los pacientes se someten a un perfil genómico utilizando un panel de 468 genes relacionados al cáncer autorizado por la FDA, llamado MSK-IMPACT

(Cheng *et al.*, 2015). Los datos de Samstein *et al.* fueron obtenidos a partir de ello, por ese motivo se utilizó este panel para el análisis mutacional.

A *Pre-tratamiento*

| Gen mutado | Grupo afectado | p-valor | p-valor ajustado |
|------------|----------------|-------------------|------------------|
| NF1 | Mayor | <0.0001 | 0.01487 |
| TP53 | Mayor | <0.0001 | 0.26344 |
| ARID5B | Mayor | <0.0001 | 0.26344 |
| CDK12 | Mayor | <0.0001 | 0.49193 |
| FGFR2 | Mayor | <0.0001 | 0.62299 |

B *Post-tratamiento (anti PD-1 + anti CTLA-4)*

| Gen mutado | Grupo afectado | p-valor | p-valor ajustado |
|--------------|----------------|----------------|------------------|
| BRCA2 | Mayor | 0.00034 | 0.01995 |
| BRCA1 | Mayor | 0.01358 | 0.26264 |
| TBX3 | Mayor | 0.01358 | 0.26264 |
| BRAF | Menor | 0.02047 | 0.29687 |
| PIK3CG | Mayor | 0.04081 | 0.47343 |

Tabla XIX: Mutaciones pre y post-tratamiento para pacientes con melanoma, punto de corte 62 años. *A. Pre-tratamiento, datos obtenidos de TCGA (menores = 110; mayores = 66). B. Post-tratamiento, datos obtenidos de Samstein et al. (menores = 64; mayores = 49). En ambos casos, se muestran algunos de los genes obtenidos del análisis, el grupo afectado (mutación del gen), el p-valor y el p-valor ajustado por el total de genes analizados. En negrita se marcan los resultados estadísticamente significativos, es decir, p-valor ajustado < 0,05.*

Al observar las mutaciones pre-tratamiento de estos pacientes, el único gen mutado con un p-valor ajustado significativo fue NF1 (codifica para la proteína neurofibromina 1), el cual se encuentra más mutado en los pacientes mayores a 62 años. Luego, considerando las mutaciones post-combo, el único gen mutado con p-valor ajustado significativo fue BRCA2 (por su nombre en inglés *breast cancer type 2 susceptibility protein*; pertenece a la familia de genes supresores de tumores, la proteína codificada se encuentra involucrada en la reparación del ADN), el cual se encuentra más mutado en los pacientes mayores al punto de corte establecido.

B. Infiltrado inmune pre-tratamiento en pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma.

Otra de las variables analizadas para validar los resultados obtenidos en la **sección 5.2.2.1.1.**, fue el infiltrado inmune utilizando MIXTURE con las biopsias pre-tratamiento de

la prueba *U* de Mann-Whitney no paramétrica; ns: *p*-valor no significativo. Referencia: azul indica los pacientes menores al punto de corte, mientras que rojo indica los mayores.

En las biopsias de los estudios reportados, se observaron diferencias significativas en tres poblaciones celulares, células T CD4 de memoria en reposo, macrófagos M1 y macrófagos M0, de las primeras dos se obtuvo una proporción superior en los mayores a 62 años, mientras que los macrófagos M0 se encuentran incrementados en los menores a 62 años. Respecto a las biopsias del proyecto TCGA, hay que tener en cuenta que se tomaron los pacientes con melanoma en estadio avanzado sin malignidad previa, pero existe una falta de información en algunos de los datos reportados en TCGA sobre los pacientes. Tal es el caso de la variable terapias, en algunos casos se dice que el paciente recibió tratamiento sin indicar cuál, pero en otros ni siquiera se reporta. La variabilidad y heterogeneidad dentro de los datos de esta base de datos es mayor a la de los estudios mencionados. En estos últimos se conoce de dónde proviene cada biopsia y las características clínicas del paciente con exactitud, es por ello que el análisis de TCGA sobre el infiltrado se realizó aparte. Por consiguiente, en el infiltrado inmune de TCGA-SKCM (por su nombre en inglés *Skin Cutaneous Melanoma*) se observaron diferencias significativas en dos poblaciones celulares, células T CD4 de memoria activadas y las células B de memoria, las cuales se encuentran incrementadas en los mayores a 62 años.

C. Expresión diferencial de genes y análisis funcional de genes utilizando GSEA, DoRotheA y PROGENy en biopsias de pacientes pre-tratamiento menores y mayores a 62 años con melanoma

De los cinco estudios mencionados, sólo el Gide *et al.* contaba con los datos crudos (*counts*) para realizar un análisis óptimo de expresión diferencial entre las biopsias de pacientes menores y mayores a 62 años, el resto de los estudios tenían los datos pre-normalizados. Si bien es posible realizar un análisis de expresión diferencial con datos normalizados en TPM o FPKM, no es lo recomendable para obtener resultados precisos ya que los métodos específicos para los análisis de expresión diferencial realizan su propia normalización. Dicho análisis, con los datos pre-PD-1 Gide *et al.*, no mostró resultados significativos. Sin embargo, se realizó el análisis GSEA (Fig. 26), y dos análisis de inferencia de actividad de FT y vías de señalización, como se realizó en la cohorte de descubrimiento, a través de DoRotheA y PROGENy, respectivamente. Tanto los resultados obtenidos de DoRotheA como PROGENy no fueron

estadísticamente significativos (datos no mostrados) mientras que los del análisis GSEA sí lo fueron.

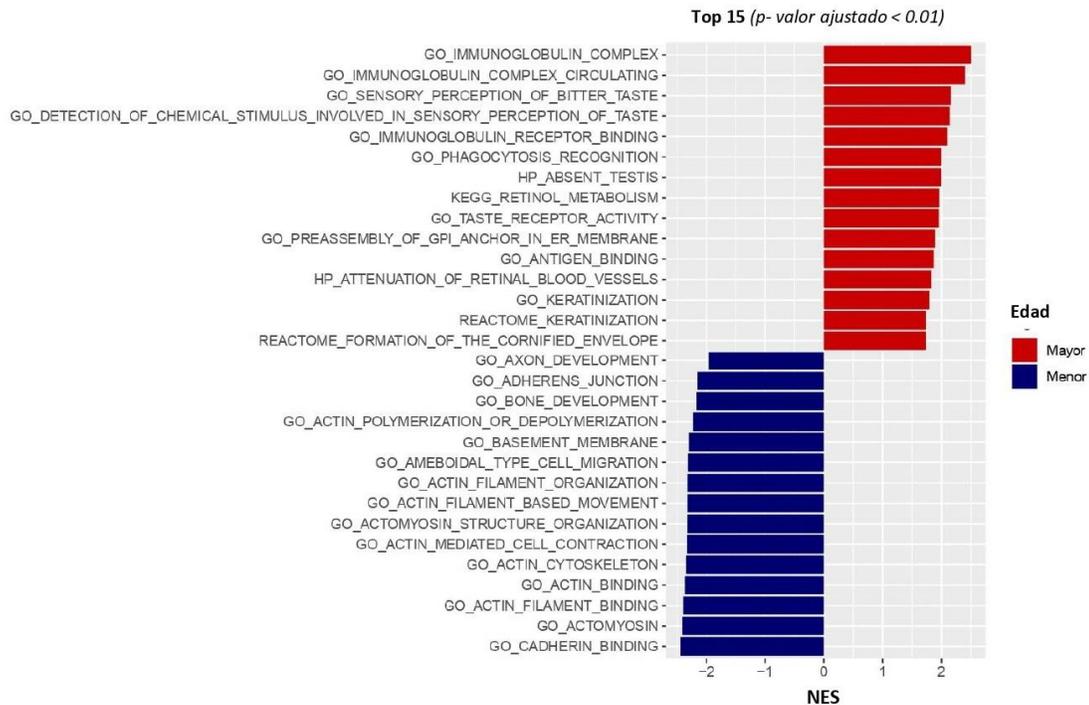


Figura 26: Análisis GSEA de biopsias pre-tratamiento de la cohorte de validación Gide et al (pre-anti PD-1). En el eje de ordenadas se muestran los 15 términos, obtenidos de MsigDB, más significativos (p -valor ajustado $< 0,01$) para menores y mayores a 62 años, 30 términos en total; en el eje de abscisas se observa el puntaje de enriquecimiento normalizado (NES), $NES > 1$ indica que ese término significativo se encuentra incrementado en los mayores a 62 años, mientras que $NES < 1$ indica que ese término significativo se encuentra incrementado en los menores a 62 años. Referencia: azul indica los pacientes menores al punto de corte, mientras que rojo indica los mayores. Menores = 19; mayores = 22.

Para el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes se consideraron los mismos parámetros que en el GSEA de la cohorte de descubrimiento. En el caso de los mayores a 62 años, algunos de los términos se relacionan con el sistema inmune, tal como "GO immunoglobulin complex circulating" (Complejo de inmunoglobulina circulante), "GO immunoglobulin receptor binding" (Unión al receptor de inmunoglobulina), "GO phagocytosis recognition" (Reconocimiento de fagocitosis), "GO antigen binding" (Unión de antígenos), el resto se vinculan con las percepciones sensoriales como el gusto, y también con la

queratinización ("*GO keratinization*", "*REACTOME keratinization*") (Sidiropoulos *et al.*, 2017; Fabregat *et al.*, 2017; Ashburner *et al.*, 2000; *Gene Ontology Consortium*, 2021).

Respecto de los menores a 62 años, la mayoría de los términos podrían estar vinculados a procesos de adhesión celular ya que mencionan moléculas involucradas en el proceso, al citoesqueleto, al igual que la lámina basal ("*GO adherens junctions*", "*GO actin polymerization or depolymerization*", "*GO basement membrane*", "*GO actin filament organization*", "*GO actin filament based movement*", "*GO actin cytoskeleton*", "*GO actin binding*", "*GO cadherin binding*"). Al nombrar las actinas en reiterados términos se podría decir que las uniones involucradas serían de anclaje célula-célula (forman "cinturones") o célula-MEC (matriz extracelular, forman "contactos focales") dependiendo del ligando. Además, como se menciona la unión de cadherinas, se podría asumir que la unión sería célula-célula ya que en este tipo de uniones se tiene como sostén intracelular a los filamentos de actina, como proteína transmembrana de adhesión a las cadherinas y como ligando extracelular también, formando así interacciones homofilicas. Se puede corresponder esto último con el proceso metastásico debido a que las cadherinas juegan un rol muy importante en el desarrollo de la metástasis, al igual que otras moléculas de adhesión que cambian su perfil. En el caso de las cadherinas, los melanocitos dejan de expresar E-cadherina para expresar N-cadherina lo que genera que se pierda la adhesión a las células vecinas incentivando la intravasación de los melanocitos. Una vez que se encuentran en circulación, se dirigen a nichos distantes. Acompañando el planteo anterior, la N-cadherina es una cadherina clásica de tipo I ampliamente expresada en el sistema nervioso (Brusés, 2011), lo cual se puede relacionar con el término GO (*Gene Ontology*) "*Axon development*" que involucra el desarrollo de axones, y por eso podría vincular con el proceso metastásico descrito.

D. Análisis de carga de neoantígenos, TMB y LDH en pacientes pre-tratamiento menores y mayores a 62 años con melanoma

Posteriormente, se analizaron tres biomarcadores disponibles de biopsias de pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma, previo al tratamiento. Los biomarcadores fueron nivel de LDH (Snyder *et al.*, 2014), carga de neoantígenos y TMB (Snyder *et al.*, 2014; Van Allen *et al.*, 2015; Hugo *et al.*, 2016) (Fig. 27).

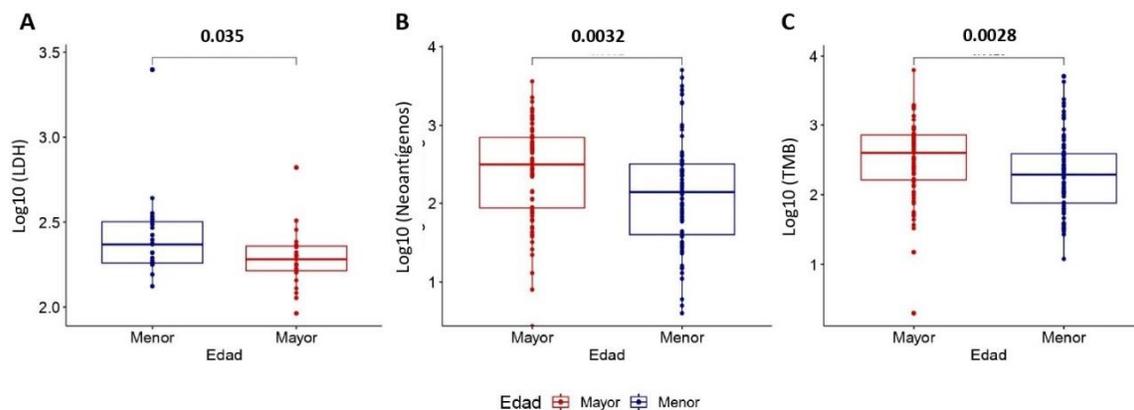


Figura 27: LDH, carga de neoantígenos y TMB de pacientes con melanoma sin inmunoterapia previa. El punto de corte para los tres casos es 62 años. **A.** Gráficos de caja para LDH (menores = 23; mayores = 23). **B.** Gráficos de caja para carga de neoantígenos (menores = 79; mayores = 73). **C.** Gráficos de caja para TMB (menores = 79; mayores = 73). Se indica p-valor de la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica. Log10(LDH): logaritmo en base 10 para representar los valores de LDH. Log10(Neoantígenos): logaritmo en base 10 para representar los valores de la carga de neoantígenos. Log10(TMB): logaritmo en base 10 para representar los valores de TMB. Referencia: azul indica los pacientes menores al punto de corte, mientras que rojo indica los mayores.

Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en el análisis de los tres biomarcadores. El nivel de LDH se encuentra incrementado en pacientes menores a 62 años, mientras que, tanto la carga de neoantígenos como la TMB, es superior en los pacientes mayores a 62 años. Cabe destacar que, aun quitando los *outliers* (menor = 2502 U/L; mayor = 664 U/L) del gráfico de caja de LDH, el p-valor es significativo (p-valor = 0,025).

5.3.2.1.1.3. Análisis del microambiente tumoral mediante scRNA-seq en biopsias de pacientes pre-tratamiento menores y mayores a 62 años con melanoma.

Los resultados obtenidos hasta aquí, a nivel transcriptómico, fueron en el *bulk*. Como se mencionó en la **sección 1.7.2.2.**, el uso de scRNA-seq hace más específico el análisis transcriptómico, considerando lo que ocurre a nivel de célula individual. Por lo tanto, se utilizaron dos estudios (Jerby-Arnon *et al.*, 2018; Sade-Feldman *et al.*, 2018) que tenían estos datos disponibles. Se analizaron ambos por separado debido a que cada uno de ellos tenían su propia clasificación para las células del microambiente tumoral.

Del Sade-Feldman *et al.* se tuvieron en cuenta los once grupos de poblaciones celulares inmunes del microambiente tumoral, al igual que los seis grupos diferentes de células T CD8. Los once grupos constan de dos subgrupos de células B (células B; células plasmáticas), dos subgrupos mieloides (monocitos y/o macrófagos; células dendríticas) y siete subgrupos enriquecidos para células T, NK y NKT (linfocitos; linfocitos citotóxicos; linfocitos exhaustos - ciclo celular (CC); T CD8 exhaustas; T CD8 exhaustas - *heat shock*; T regulatorias; T de memoria) (Fig. 28).

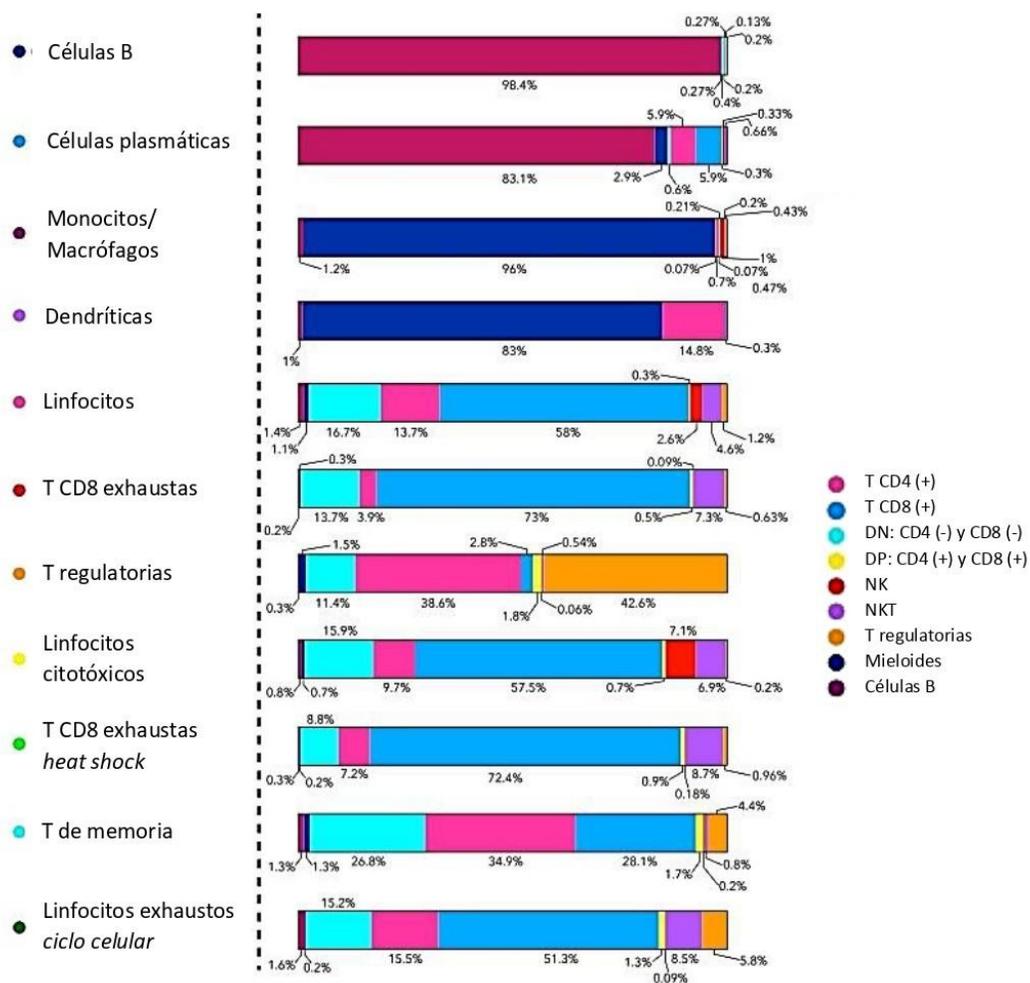


Figura 28: Composición celular de los 11 grupos del Feldman *et al.* Se muestra el porcentaje de células en cada grupo del estudio analizado, las cuales pueden ser T CD4 positivas (+), T CD8 positivas (+), doble positivas (DP): CD4 (+) y CD8 (+), doble negativas (DN): CD4 (-)

y CD8 (-), NK: *natural killers*, NKT: *invariant natural killer T cells*, mieloides o células B. **Adaptado de Sade-Feldman et al., 2018.**

A partir de las células CD8, los autores encontraron diferentes grupos. Según Sade-Feldman *et al.*, las células CD8 1 expresaron marcadores de agotamiento y ciclo celular, similar al grupo de linfocitos exhaustos (CC) de las poblaciones celulares inmunes. Las células CD8 2 expresaron muchos de los mismos marcadores de agotamiento junto con proteínas *heat-shock* (proteínas de choque térmico como HSPB1, HSPA1A y HSPA4) y receptores inhibitorios adicionales. Las células CD8 3 expresaron marcadores de agotamiento conocidos (HAVCR2, CD38, PDCD1 y PTPN6) pero carecían de genes *heat-shock* y del ciclo celular. El grupo CD8 4 (CCR7, IL7R, TCF7, TNF y S100A10) y CD8 6 (SELL, TCF7, LTB, IL7R, FLT3LG e IL16) fueron consistentes con un fenotipo de memoria y/o efector, mientras que las células CD8 5 tenían fenotipos de memoria y células activadas (IL6ST, CXCL13, IL7R y CTLA4).

Del estudio Jerby-Arnon *et al.* se consideraron los siete grupos de poblaciones celulares en el microambiente tumoral. Los grupos celulares identificados en este estudio fueron células T CD4 y T CD8, células B, células NK, macrófagos, fibroblastos asociados al cáncer (CAF) y células endoteliales. En primer lugar, se estudió la distribución de los grupos de células pertenecientes a los dos estudios tanto en menores como mayores a 62 años (Fig. 29), a partir de una reducción de dimensionalidad para la visualización de los datos mediante UMAP (por su nombre en inglés *Uniform Manifold Approximation and Projection*).

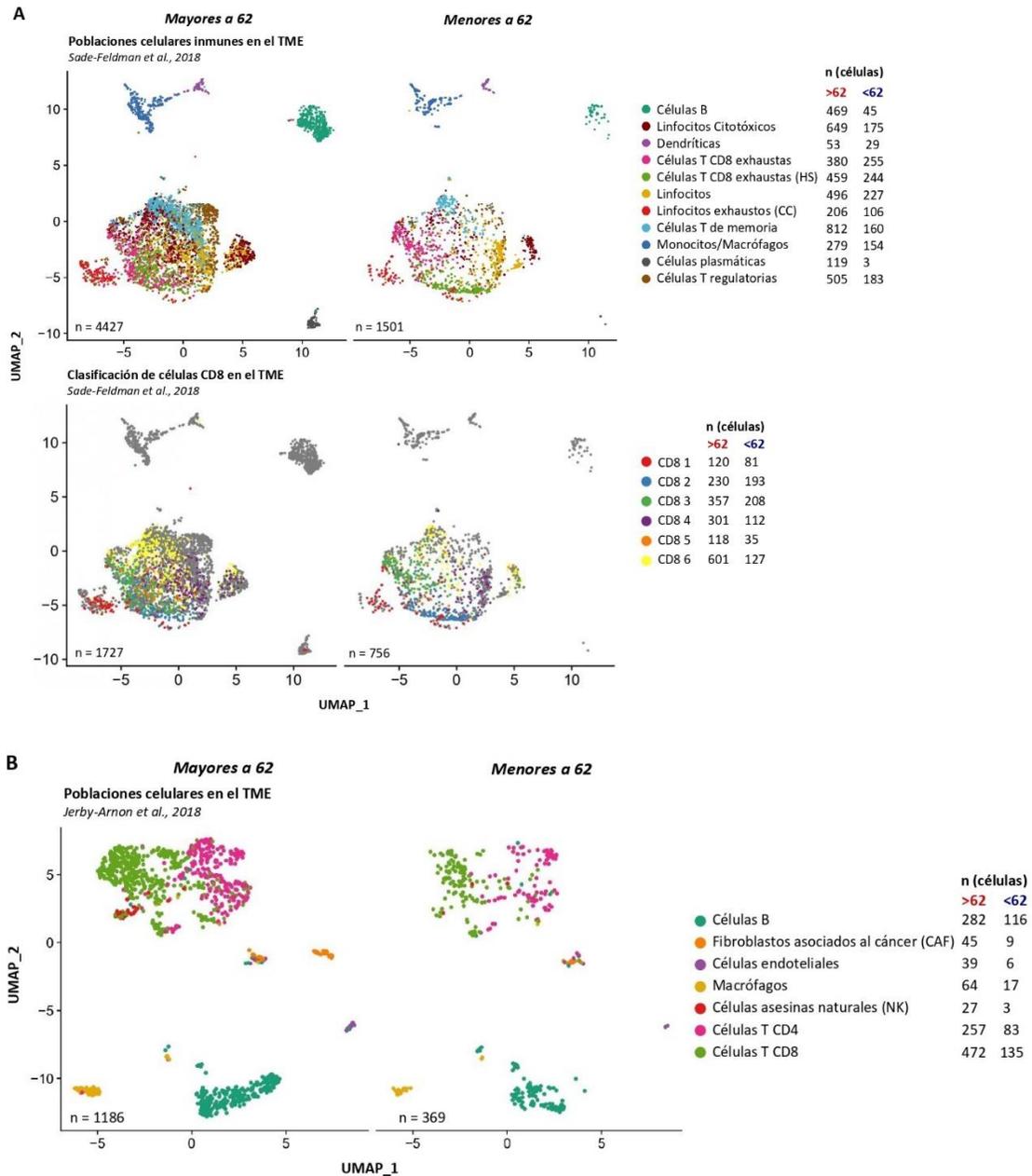


Figura 29: UMAP para menores y mayores a 62 años, por separado, de los once grupos de poblaciones celulares inmunes y seis grupos de células CD8 del Sade-Feldman *et al.*, y los siete grupos de poblaciones celulares en el TME del Jerby-Arnon *et al.* **A. Sade-Feldman *et al.*** Se muestra la distribución de las células inmunes y los grupos CD8 en los menores y mayores a 62 años, la cantidad de células en cada grupo etario, al igual que la cantidad de células en cada grupo. **B. Jerby-Arnon *et al.*** Se muestra la distribución de las células del TME

en los menores y mayores a 62 años, la cantidad de células en cada grupo etario, al igual que la cantidad de células en cada grupo.

Tanto para los once grupos de poblaciones celulares inmunes del TME y los seis grupos de las diferentes células T CD8 del Sade-Feldman *et al.*, como para los siete grupos de poblaciones celulares del TME del Jerby-Arnon *et al.* se estudiaron las proporciones de las diferentes poblaciones celulares entre menores y mayores a 62 años, utilizando la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica, detallado en la **sección Materiales y Métodos** (Fig. 30). Los resultados de este análisis con los datos del estudio Jerby-Arnon *et al.* no fueron estadísticamente significativos (datos no mostrados).

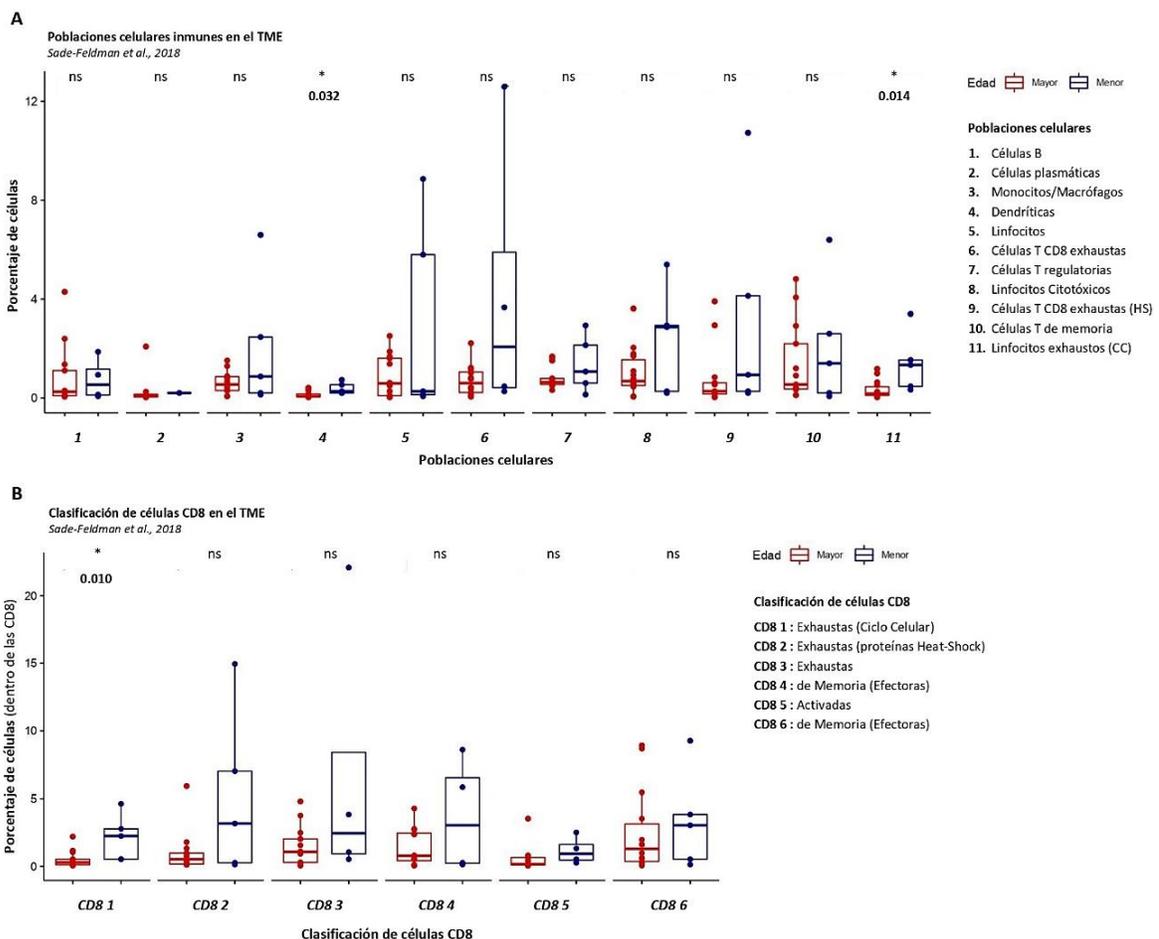


Figura 30: Gráficos de caja para los grupos del Sade-Feldman *et al.* **A. Poblaciones celulares inmunes en el TME.** En el eje de ordenadas se halla el porcentaje de células, y en el de abscisas los números que identifican a las poblaciones inmunes descritas en la referencia a

la derecha. **B. Clasificación de las CD8 dentro del TME.** En el eje de ordenadas se halla el porcentaje de células de cada grupo dentro de las células CD8 totales, y en el de abscisas la clasificación de las CD8. En ambos casos, se observan los porcentajes de células en pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma pre-tratamiento. En el eje de ordenadas se indican las proporciones relativas, no absolutas; se muestran sólo los p-valores significativos de la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica; ns: p-valor no significativo. Referencia: azul indica los pacientes menores al punto de corte, mientras que rojo indica los mayores.

En el caso del estudio Sade-Feldman *et al.* se obtuvieron diferencias significativas tanto en los grupos de las poblaciones celulares inmunes del TME como en los diferentes grupos de células T CD8. En el primer caso, se ven diferencias en las células dendríticas (grupo 4) y los linfocitos exhaustos que expresan genes relacionados al ciclo celular (grupo 11), ambos grupos de células se encuentran en mayor proporción en los menores a 62 años. En concordancia con esta observación, la única diferencia dentro de la clasificación de células T CD8 de Sade-Feldman *et al.*, se encuentra en el grupo CD8 1 relacionado con las células T CD8 exhaustas que expresan genes involucrados en el ciclo celular, similar al grupo 11 en composición, el cual se halla en mayor proporción en los menores a 62 años. Los p-valores para las clasificaciones de las células T CD8 restantes no fueron significativos, aunque se puede observar la tendencia de los menores a tener una mayor proporción de células T CD8.

A. Expresión diferencial de genes en cada grupo de células inmunes que componen el TME de biopsias de pacientes pre-tratamiento menores y mayores a 62 años con melanoma.

Una gran ventaja de la tecnología scRNA-seq es el hecho de poder realizar análisis de expresión diferencial de genes a nivel de célula única, por lo tanto, se hizo esto dentro de cada grupo de las poblaciones inmunes del TME de los dos estudios comparando menores y mayores a 62 años. Los parámetros y filtros utilizados, junto con la respectiva justificación, para este análisis se encuentran detallados en la **sección Materiales y Métodos**. En el caso de análisis de expresión diferencial de genes de los once grupos del Sade-Feldman *et al.*, se obtuvieron diferencias significativas en todos excepto en dos, células T regulatorias y linfocitos exhaustos que expresan genes involucrados en el ciclo celular (CC) (Fig. 31).

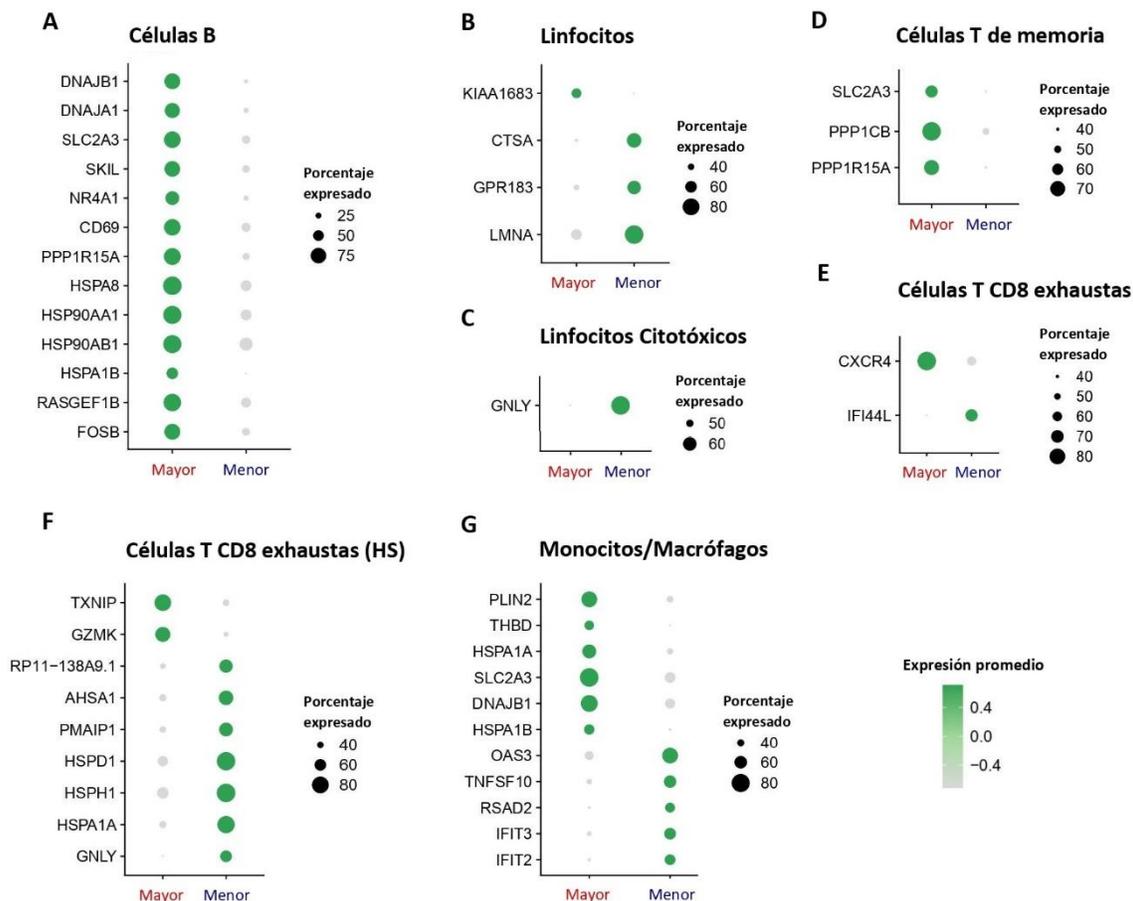


Figura 31: Gráficos de puntos representando la expresión diferencial dentro de cada población celular inmune del estudio Sade-Feldman *et al.* **A.** Células B. **B.** Linfocitos. **C.** Linfocitos citotóxicos. **D.** Células T de memoria. **E.** Células T CD8 exhaustas. **F.** Células T CD8 exhaustas (HS), heat-shock. **G.** Monocitos/Macrófagos. En todos los casos: en el eje de ordenadas de cada gráfico se encuentran los genes expresados diferencialmente; en el eje de abscisas se encuentra la referencia del grupo menor o mayor a 62 años; la expresión promedio de cada gen se encuentra representada por el gradiente de color gris a verde, lo que corresponde a menor expresión a mayor expresión, respectivamente; el porcentaje expresado representa el porcentaje de células que expresan ese gen, cuanto más grande es el punto, mayor es el porcentaje de células que lo expresa.

A partir de los resultados obtenidos se llevó a cabo la búsqueda del rol que cumplen los genes expresados diferencialmente en cada población celular específica. Si bien la información sobre estos genes en general existe y se encuentra disponible, nuestro interés se enfoca en el

papel que cumple cada gen en cada población celular inmune donde se encuentra expresado; en este sentido cabe destacar que para algunos de ellos no se encontró información de la función que cumplen en cada grupo en particular. Tal es el caso que en las células B no se encontró información sobre los genes SKIL, NR4A1, PPP1R15A, HSPA1B y SLC2A3 (ver Tabla XX).

| Gen | Descripción | Información | |
|----------|--|---|--|
| FOSB | <i>FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i> | Involucrados en la codificación de factores de transcripción de activación inmediata relacionados con la inflamación y respuestas a estrés (Tirosh <i>et al.</i> , 2016) | En las células B, se detectó una mayor expresión de JunB, JunD, FosB y Fra-1 después de la estimulación de las células B primarias a través del BCR y/o el receptor CD40 (Tilzey <i>et al.</i> , 1991; Huo y Rothstein, 1995, 1996). |
| CD69 | <i>CD69 molecule</i> | Marcador de células residentes de tejido y activación reciente (Gide <i>et al.</i> , 2019) | Marcador de células B naïve y células B de memoria de la matriz LM22 |
| HSPA8 | <i>Heat shock protein family A (Hsp70) member 8</i> | Las proteínas de choque térmico HSPA8 (también llamadas HSC70), HSPA4 (también llamadas HSP70) y HSP90AA1 (también llamadas HSP90) están involucradas tanto en la presentación de antígenos por las moléculas MHC de clase II como en la modulación de las respuestas de las células T (Nataf <i>et al.</i> , 2019) | Hay dos isoformas de HSP90, HSP90α y HSP90β, codificadas por los genes HSP90AA1 y HSP90AB1, respectivamente. HSP90α y HSP90β son homólogas, con un 86% de identidad y un 94% de similitud a nivel de aminoácidos. De todas formas, la función de cada isoforma de HSP90 sigue siendo en gran parte desconocida (Li <i>et al.</i> , 2012) |
| HSP90AA1 | <i>Heat shock protein 90 alpha family class A member 1 (HSP90)</i> | | |
| HSP90AB1 | <i>Heat shock protein 90 alpha family class B member 1</i> | | |
| DNAJB1 | <i>DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B1</i> | | Los DNAJ son ampliamente aceptados como reguladores de la función HSP70, pero también tienen funciones como co-chaperonas para la máquina chaperona HSP90, y demás funciones biológicas que pueden ser independientes de cualquiera de estas chaperonas (Sterrenberg <i>et al.</i> , 2011) |
| DNAJA1 | <i>DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member A1</i> | Aunque las principales Hsp40 de tipo I citoplasmáticas, DnaJa1 y DnaJa2, se inducen tras la activación de las células B e interactúan con la AID (citidina desaminasa inducida por activación) in vitro, solo la sobreexpresión de DnaJa1 aumenta los niveles de AID y la actividad biológica en las líneas celulares. Por el contrario, la reducción de DnaJa1, pero no de DnaJa2, reduce los niveles de AID, la estabilidad y el cambio de isotipo. (Orthwein <i>et al.</i> , 2012) | |
| RASGEF1B | <i>RasGEF domain family member 1B</i> | Los factores de intercambio guanina-nucleótido (GEF), como lo es RASGEF1B, estimulan el intercambio intrínseco de GDP/GTP de Ras y promueven la formación de Ras-GTP activo, que a su vez controla diversas vías de señalización importantes para la regulación de la proliferación celular, supervivencia, diferenciación, tráfico vesicular, y expresión génica (Andrade <i>et al.</i> , 2010) | |

Tabla XX: Información de los genes expresados diferencialmente en las células B de los pacientes mayores a 62 años con melanoma. Se muestran los genes, sus nombres detallados y la función que posee cada uno en las células B.

En los linfocitos no se encontró información sobre los genes KIAA1683 y CTSA (ver Tabla XXI).

| Gen | Descripción | Información | |
|--------|---------------------------------------|---|--|
| LMNA | <i>Lamin A/C</i> | | Marcador de células residentes de tejido para células T CD8 (Foroutan <i>et al.</i> , 2021) |
| GPR183 | <i>G protein-coupled receptor 183</i> | Marcador reportado por los autores como parte de CD8 <i>Good</i> o buenas: de memoria o efectoras (Sade-Feldman <i>et al.</i> , 2018) | Se ha reportado, en un artículo preliminar, que GPR183 se asoció con infiltración inmune tumoral en BRCA, SKCM, LUSC y LGG (Yang <i>et al.</i> , 2020) |
| | | | Marcador de células residentes de tejido para células NK (Foroutan <i>et al.</i> , 2021) |

Tabla XXI: Información de los genes expresados diferencialmente en los linfocitos de los pacientes menores a 62 años con melanoma. *Se muestran los genes, sus nombres detallados y la función que posee cada uno en los linfocitos.*

En los linfocitos citotóxicos se encontró información sobre el único gen expresado diferencialmente (ver Tabla XXII).

| Gen | Descripción | Información | |
|------|-------------------|--|---|
| GNLY | <i>Granulysin</i> | Involucrado en funciones efectoras (Li <i>et al.</i> , 2019) | Asociado a citotoxicidad (Szabo <i>et al.</i> , 2019) |
| | | | Marcador de células T CD8 de la matriz LM22 |

Tabla XXII: Información de los genes expresados diferencialmente en los linfocitos citotóxicos de los pacientes menores a 62 años con melanoma. *Se muestra el gen, su nombre detallado y la función que posee en los linfocitos.*

En las células T de memoria no se encontró información sobre el gen PPP1CB (ver Tabla XXIII).

| Gen | Descripción | Información | |
|----------|---|--|--|
| SLC2A3 | <i>Solute carrier family 2 member 3</i> | Marcador de células residentes de tejido para células T CD4 (Foroutan <i>et al.</i> , 2021) | SLC2A3 también llamado GLUT3, se encuentra incrementado junto con otros transportadores de glucosa como GLUT1 y GLUT6, en las células T después de la activación (Beckermann <i>et al.</i> , 2020) |
| PPP1R15A | <i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A</i> | Marcador de células residentes de tejido para células T CD4 y NK (Foroutan <i>et al.</i> , 2021) | |

Tabla XXIII: Información de los genes expresados diferencialmente en las células T de memoria de los pacientes mayores a 62 años con melanoma. *Se muestran los genes, sus nombres detallados y la función que posee en las células T.*

La información de los genes expresados en las células T CD8 exhaustas se observa en la siguiente tabla (ver Tabla XXIV).

| MAYORES | | | |
|---------|---|---|---|
| Gen | Descripción | Información | |
| CXCR4 | <i>C-X-C motif chemokine receptor 4</i> | El tratamiento combinado con el nuevo antagonista de CXCR4 desarrollado, Pep R, más anti-PD-1, redujo el crecimiento tumoral en dos modelos murinos singénicos (D'Alterio <i>et al.</i> , 2019) | Expresado en células de memoria efectoras (van der Leun <i>et al.</i> , 2020) |
| MENORES | | | |
| Gen | Descripción | Información | |
| IFI44L | <i>Interferon induced protein 44 like</i> | Se ha reportado que los pacientes con melanoma con mayor expresión pre-tratamiento de genes inducibles por IFN- γ y mismo IFN- γ , en los TILs, poseen más probabilidades de responder a la terapia anti-PD-L1 (Axelrod <i>et al.</i> , 2018) | |

Tabla XXIV: Información de los genes expresados diferencialmente en las células T CD8 exhaustas de los pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma. Se muestran los genes, sus nombres detallados y la función que posee en las células T.

En las células T CD8 exhaustas relacionadas con marcadores de agotamiento junto con proteínas *heat-shock* no se encontró información sobre los genes HSPH1, RP11-138A9.1 y AHSA1 (ver Tabla XXV).

| MAYORES | | | | | |
|---------|--|--|---|---|---|
| Gen | Descripción | Información | | | |
| TXNIP | <i>Thioredoxin interacting protein</i> | Expresado en células de memoria efectoras (van der Leun <i>et al.</i> , 2020) | | | |
| GZMK | <i>Granzyme K</i> | | Asociado a citotoxicidad (Szabo <i>et al.</i> , 2019) | Expresado por células T CD8 efectoras (Li <i>et al.</i> , 2019) | Marcador de células T CD8 de la matriz LM22 |
| MENORES | | | | | |
| Gen | Descripción | Información | | | |
| HSPA1A | <i>Heat shock protein family A (Hsp70) member 1A</i> | Marcador del cluster CD8 2 clasificadas como exhaustas, expresan proteínas <i>heat-shock</i> (Sade-Feldman <i>et al.</i> , 2018) | | | |
| GNLY | <i>Granulysin</i> | Involucrado en funciones efectoras (Li <i>et al.</i> , 2019) | Asociado a citotoxicidad (Szabo <i>et al.</i> , 2019) | Marcador de células T CD8 de la matriz LM22 | |

Tabla XXV: Información de los genes expresados diferencialmente en las células T CD8 exhaustas (HS) de los pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma. Se muestran los genes, sus nombres detallados y la función que posee en las células T.

En el grupo de monocitos/macrófagos no se encontró información sobre el gen TNFSF10 (ver Tabla XXVI).

| MAYORES | | |
|---------|--|--|
| Gen | Descripción | Información |
| PLIN2 | <i>Perilipin 2</i> | Involucrado en la captación de lípidos. Regula el metabolismo de los lípidos intracelulares en los macrófagos. Los macrófagos de activación metabólica que expresan PLIN2 están implicados en el metabolismo de los lípidos que se ha asociado con los macrófagos M2 (Liu <i>et al.</i> , 2017) |
| HSPA1A | <i>Heat shock protein family A (Hsp70) member 1A</i> | Se ha reportado que los monocitos en proceso de maduración regulan diferencialmente la expresión de varios miembros de HSP y que distintos patrones de expresión de HSP caracterizan las etapas efectoras M1 y M2 de la vida de los macrófagos. HSPA1A/HSPA1B, DNAJB1 se encuentra incrementado en los macrófagos M1 (Fagone <i>et al.</i> , 2012) |
| HSPA1B | <i>Heat shock protein family A (Hsp70) member 1B</i> | |
| DNAJB1 | <i>DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B1</i> | |
| SLC2A3 | <i>Solute carrier family 2 member 3</i> | Expresado en monocitos sanguíneos. Disminuyen los niveles de expresión de este gen durante su maduración (Bush <i>et al.</i> , 2020) |
| THBD | <i>Thrombomodulin</i> | Expresado en monocitos (<i>GeneCards: The Human Gene Database</i>) |
| MENORES | | |
| Gen | Descripción | Información |
| RSAD2 | <i>Radical S-adenosyl methionine domain containing 2</i> | Marcador de macrófagos M1 de la matriz LM22 |
| IFIT3 | <i>Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3</i> | Citoquina pro-inflamatoria; genes estimulados por interferón |
| IFIT2 | <i>Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2</i> | |
| OAS3 | <i>2'-5'-oligoadenylate synthetase 3</i> | |

Tabla XXVI: Información de los genes expresados diferencialmente en monocitos/macrófagos de los pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma. Se muestran los genes, sus nombres detallados y la función que posee en los monocitos o macrófagos.

En el caso del análisis de expresión diferencial para los grupos del Jerby-Arnon *et al.*, se encontraron sólo diferencias significativas en las células T CD8 y CD4, y las células B, mientras que en los macrófagos no se obtuvieron diferencias. Respecto a las CAF, NK y endoteliales, no se realizó el análisis debido a la poca cantidad de células en los menores a 62 años, y la gran diferencia entre un grupo etario y otro (Fig. 32).

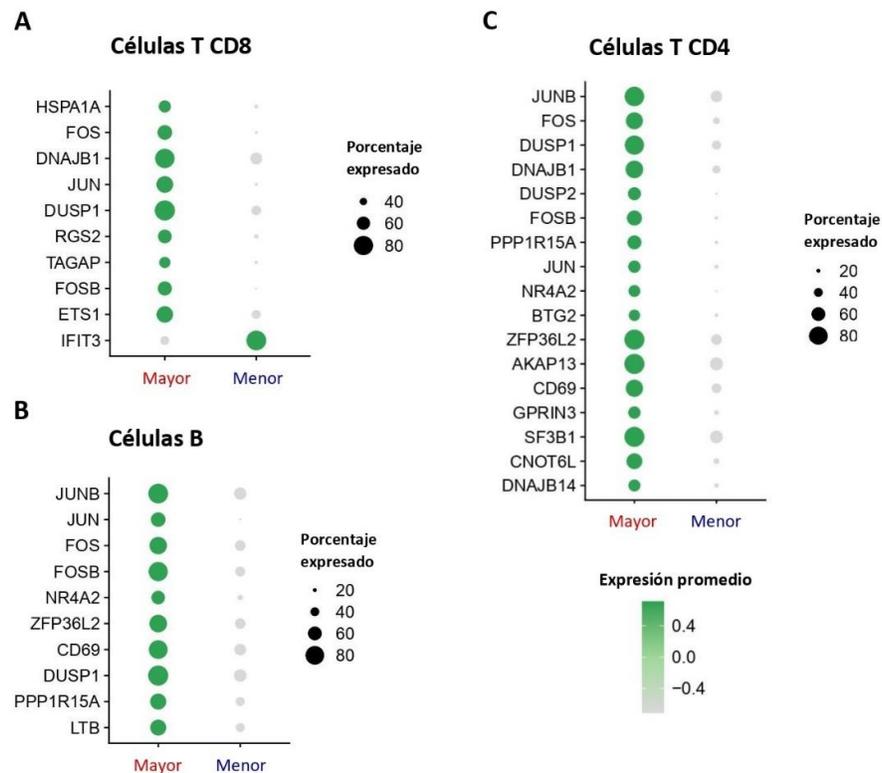


Figura 32: Gráficos de puntos representando la expresión diferencial dentro de cada población celular inmune del estudio Jerby-Arnon *et al.* A. Células T CD8. B. Células B. C. Células T CD4. En todos los casos: en el eje de ordenadas de cada gráfico se encuentran los genes expresados diferencialmente; en el eje de abscisas se encuentra la referencia del grupo menor o mayor a 62 años; la expresión promedio de cada gen se encuentra representada por el gradiente de color gris a verde, lo que corresponde a menor expresión a mayor expresión, respectivamente; el porcentaje expresado representa el porcentaje de células que expresan ese gen, cuanto más grande es el punto, mayor es el porcentaje de células que lo expresa.

Para esta cohorte se realizó exactamente la misma búsqueda que para los resultados obtenidos del Sade-Feldman *et al.* En el grupo de células T CD8 se encontró información sobre todos los genes expresados (ver Tabla XXVII).

| MAYORES | | | |
|---------|--|--|---|
| Gen | Descripción | Información | |
| JUN | <i>Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i> | Activación de células T (Atsaves <i>et al.</i> , 2019) | Involucrados en la codificación de factores de transcripción de activación inmediata relacionados con la inflamación y respuestas a estrés (Tirosch <i>et al.</i> , 2016) |
| FOS | <i>Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i> | Regula el incremento de la expresión de PD-1 en células T infiltrantes del tumor durante la progresión tumoral, ello asociado con alta TMB; FOS se une a la región promotora de PD-1 lo que facilita su expresión (Atsaves <i>et al.</i> , 2019) | |
| FOSB | <i>FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i> | | |
| HSPA1A | <i>Heat shock protein family A (Hsp70) member 1A</i> | Marcador del cluster CD8 2 clasificadas como exhaustas, expresan proteínas <i>heat-shock</i> (Sade-Feldman <i>et al.</i> , 2018) | |
| RGS2 | <i>Regulator of G protein signaling 2</i> | Implicado en la migración de linfocitos (Gebhardt <i>et al.</i> , 2018) | |
| TAGAP | <i>T cell activation RhoGTPase activating protein</i> | Codifica para una proteína activadora de GTPasa específica para RhoA que se expresa exclusivamente en células T activadas (Tamehiro <i>et al.</i> , 2017) | |
| DUSP1 | <i>Dual specificity phosphatase 1</i> | Marcador de células residentes de tejido para células NK (Foroutan <i>et al.</i> , 2021) | |
| DNAJB1 | <i>DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B1</i> | | |
| ETS1 | <i>ETS proto-oncogene 1, transcription factor</i> | Se requiere para la supervivencia y activación de células T murinas (Muthusamy <i>et al.</i> , 1995) | |
| MENORES | | | |
| Gen | Descripción | Información | |
| IFIT3 | <i>Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3</i> | Citoquina pro-inflamatoria; genes estimulados por interferón | |

Tabla XXVII: Información de los genes expresados diferencialmente en las células T CD8 de los pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma. Se muestran los genes, sus nombres detallados y la función que posee en las células T.

En las células T CD4 no se encontró información sobre los genes AKAP13, GPRIN3, SF3B1, CNOT6L y DNAJB14 (ver Tabla XXVIII).

| Gen | Descripción | Información | | |
|--------------|---|--|--|--|
| JUN | <i>JUN proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i> | Activación de células T (Atsaves <i>et al.</i> , 2019) | Involucrados en la codificación de factores de transcripción de activación inmediata relacionados con la inflamación y respuestas a estrés (Tirosh <i>et al.</i> , 2016) | Marcador de células residentes de tejido para células T CD4 y NK (Foroutan <i>et al.</i> , 2021) |
| JUNB | <i>JUNB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i> | Promueve la expresión de moléculas de células T regulatorias como ICOS y CTLA-4 (Atsaves <i>et al.</i> , 2019) | | |
| FOS | <i>FOS proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i> | Regula el incremento de la expresión de PD-1 en células T infiltrantes del tumor durante la progresión tumoral, ello asociado con alta TMB; FOS se une a la región promotora de PD-1 lo que facilita su expresión (Atsaves <i>et al.</i> , 2019) | | |
| FOSB | <i>FOSB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i> | Marcador de células T foliculares de la matriz LM22 | | |
| NR4A2 | <i>Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2</i> | | | |
| CD69 | <i>CD69 molecule</i> | Marcador de células residentes de tejido y activación reciente (Gide <i>et al.</i> , 2019) | Marcador de células T foliculares y células T CD4 de memoria en reposo de la matriz LM22 | |
| BTG2 | <i>BTG anti-proliferation factor 2</i> | | | |
| ZFP36L2 | <i>ZFP36 ring finger protein like 2</i> | Marcador de células T CD4 de memoria en reposo de la matriz LM22 | | |
| PPP1R15A | <i>Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A</i> | Marcador de células residentes de tejido para células T CD4 y NK (Foroutan <i>et al.</i> , 2021) | | |
| DUSP1 | <i>Dual specificity phosphatase 1</i> | Marcador de células residentes de tejido para células NK (Foroutan <i>et al.</i> , 2021) | | |
| DNAJB1 | <i>DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B1</i> | | | |
| DUSP2 (PAC1) | <i>Dual specificity phosphatase 2</i> | Actúa como un punto de control inmune en la inmunidad antitumoral de células T. PAC1 se encuentra incrementado en linfocitos infiltrantes de tumores exhaustos y se asocia con un mal pronóstico de los pacientes con cáncer. Las células T efectoras con altos niveles de PAC1 pierden su capacidad proliferativa y efectora, y se convierten en células T exhaustas. (Dan Lu <i>et al.</i> , 2020) | Marcador de células T γδ de la matriz LM22 | |
| FAM46C | <i>Family with sequence similarity 46 member C</i> | Marcador de células T γδ (Tosolini <i>et al.</i> , 2017) | | |

Tabla XXVIII: Información de los genes expresados diferencialmente en las células T CD4 de los pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma. Se muestran los genes, sus nombres detallados y la función que posee en las células T.

En las células B no se encontró información sobre los genes DUSP1 y PPP1R15A (ver Tabla XXIX).

| Gen | Descripción | Información | |
|---------|---|---|---|
| JUNB | <i>JunB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i> | | En las células B, se detectó una mayor expresión de JunB, JunD, FosB y Fra-1 después de la estimulación de las células B primarias a través del BCR y/o el receptor CD40 (Tilzey <i>et al.</i> , 1991; Huo y Rothstein, 1995, 1996). |
| JUN | <i>Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i> | | Se ha reportado que la estimulación de las células B aumentó los niveles de los productos de JUN y FOS en las mismas, tanto de ratón como humanas. La estimulación de células B naïve a través de TLR7 y CD40 induce la producción sinérgica de IL-6. Esto requiere la activación de la vía JNK, lo que resulta en una mayor fosforilación del sustrato JNK (JUN), y una mayor actividad de los complejos AP-1 que contienen los productos de JUN y FOS. (Vanden Bush y Bishop, 2008) |
| FOS | <i>Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i> | Uno de los roles de FOS consta en regular positivamente la expresión de Blimp-1, esencial para promover la diferenciación de células B en células plasmáticas. (Ohkubo <i>et al.</i> , 2005) | |
| FOSB | <i>FosB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i> | | En las células B, se detectó una mayor expresión de JunB, JunD, FosB y Fra-1 después de la estimulación de las células B primarias a través del BCR y/o el receptor CD40 (Tilzey <i>et al.</i> , 1991; Huo y Rothstein, 1995, 1996). |
| NR4A2 | <i>Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2</i> | | |
| ZFP36L2 | <i>ZFP36 ring finger protein like 2</i> | En el desarrollo de linfocitos B, las proteínas de unión a ARN (RBP), ZFP36L1 y ZFP36L2, son críticas para mantener la quiescencia antes de la expresión del receptor de células B precursoras (pre-BCR) y para restablecer la quiescencia después de la expansión inducida por pre-BCR (Galloway <i>et al.</i> , 2016). La señalización a través del pre-BRC favorece una intensa proliferación y diferenciación hacia el estado de células pre-B pequeñas. En estado quiescente, estas células llevan a cabo el reordenamiento V-J de la cadena ligera, lo que promueve la producción de un BCR funcional completo con una especificidad única y expresado en forma de IgM en la superficie de las células B inmaduras. | |
| CD69 | <i>CD69 molecule</i> | Marcador de células residentes de tejido y activación reciente (Gide <i>et al.</i> , 2019) | Marcador de células B naïve y células B de memoria de la matriz LM22 |
| LTB | <i>Lymphotoxin beta</i> | Es un inductor del sistema de respuesta inflamatoria y participa en el desarrollo normal del tejido linfoide (GeneCards: <i>The Human Gene Database</i>) | Marcador de células B naïve y células B de memoria de la matriz LM22 |

Involucrados en la codificación de factores de transcripción de activación inmediata relacionados con la inflamación y respuestas a estrés (Tirosh *et al.*, 2016)

Tabla XXIX: Información de los genes expresados diferencialmente en las células B de los pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma. Se muestran los genes, sus nombres detallados y la función que posee en las células B.

5.3.2.1.1.4. Comparación de la sobrevida libre de progresión entre inhibidores de punto de control inmunológico en pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma

En principio, a partir del análisis de sobrevida libre de progresión del estudio Gide *et al.*, se planteó que los pacientes mayores a 62 años se encuentran beneficiados con el tratamiento anti PD-1 combinado con anti CTLA-4 respecto de los menores a 62 años. Los análisis posteriores se realizaron para explicar la diferencia observada y validar lo que se vio en esa cohorte de descubrimiento, utilizando diferentes estudios con biopsias pre-tratamiento como cohorte de validación. Por lo tanto, se plantea la pregunta de si, en pacientes menores y mayores a 62 años por separado, hay o no diferencias en la sobrevida libre de progresión de pacientes tratados con la combinación anti PD-1+CTLA-4 respecto de los tratados con las monoterapias anti PD-1 y anti CTLA-4 (Fig. 33).

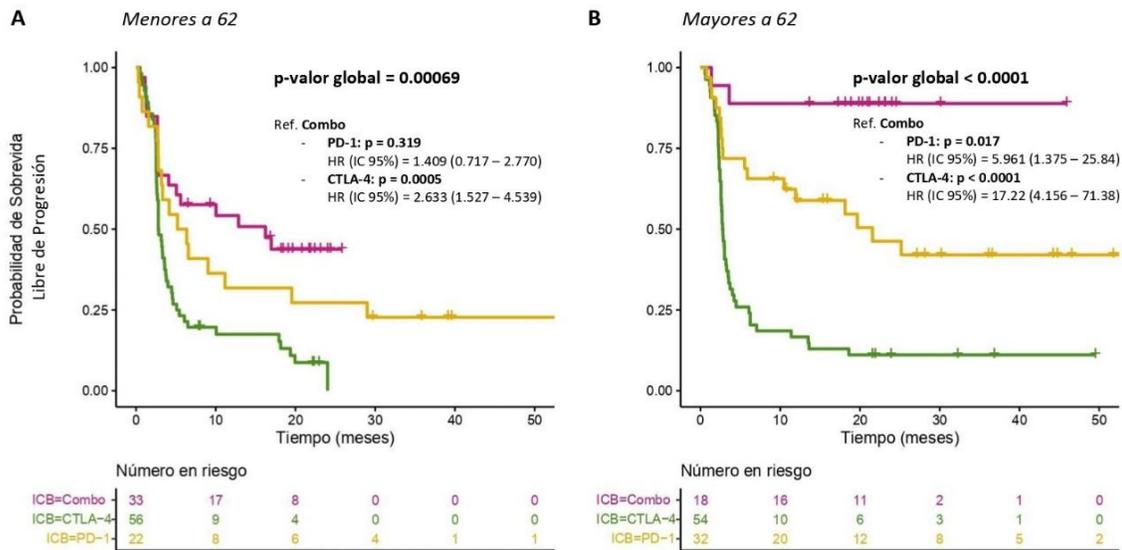


Figura 33: Curvas de supervida libre de progresión (Kaplan-Meier) para menores y mayores a 62 años tratados con inmunoterapias. A. Pertenece a la curva de supervida libre de progresión de pacientes con menores a 62 años con melanoma. B. Pertenece a la curva de supervida libre de progresión de pacientes con mayores a 62 años con melanoma. Se indica p-valor global, al igual que el p-valor obtenido de la comparación entre anti PD-1 y Combo, y anti CTLA-4 y Combo, el cociente de riesgos (HR) e intervalo de confianza (IC 95%). Referencia: rosa indica los pacientes tratados con la combinación anti PD-1+CTLA-4, verde indica los pacientes tratados con anti CTLA-4, y amarillo indica los pacientes tratados con anti PD-1.

Ambas curvas de supervida, para los dos grupos de edad, fueron significativas. Sin embargo, al realizar las comparaciones para cada monoterapia respecto del combo, en los menores a 62 años no hay diferencias entre anti PD-1 o el combo anti PD-1+CTLA-4, pero observando la curva que pertenece a anti CTLA-4 sí hay diferencias significativas respecto del tratamiento con el combo. Por otro lado, teniendo en cuenta la curva de supervida de los mayores a 62 años, las diferencias son significativas tanto para la combinación de ICI respecto del tratamiento anti PD-1 como para anti CTLA-4, siendo la combinación de ambos el tratamiento óptimo y adecuado en términos de PFS para esos pacientes según los resultados de la Kaplan-Meier.

5.3.2.2. Evaluación de tabaquismo como variable clínica de respuesta a inhibidores de punto de control inmunológico en NSCLC

Para realizar el análisis de sobrevida libre de progresión y el estado de fumador de los pacientes se utilizaron los mismos criterios mencionados en análisis previos, donde se distingue entre tipo tumoral y terapia. Los únicos estudios que contaban con esta información fueron Hellmann *et al.* y Rizvi *et al.*, ambos con datos de pacientes que padecían cáncer de pulmón de células no-pequeñas, en el primero los pacientes fueron tratados con la combinación anti PD-1 y anti CTLA-4 (n = 75) mientras que en el segundo con monoterapia anti PD-1 (n = 34). Ambos estudios informan la historia de tabaquismo del paciente como: ex-fumador, fumador o no fumador. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos, siendo los p-valores globales de las Kaplan-Meier 0,41 y 0,60 del Hellmann *et al.* y Rizvi *et al.*, respectivamente (datos no mostrados).

6. Discusión

6.1. Resistencia a terapias dirigidas y niveles de Galectina-1 en líneas celulares de melanoma humanas y murinas

Se confirmó la resistencia de las líneas celulares de melanoma a las terapias dirigidas contra la vía de MAPK, en medio de cultivo con Dabrafenib (inhibidor de BRAF) y Trametinib (inhibidor de MEK). Efectivamente las líneas celulares eran resistentes debido a que se observó una banda para ERK fosforilado (pp-ERK) en el revelado del *Western-blot* interpretando que la droga no inhibe la vía MAPK. Respecto a los resultados de la RT-qPCR para cuantificar los niveles de ARN mensajero de Galectina-1, en las únicas muestras que se obtuvieron resultados (A375 y dos réplicas biológicas RG13.2) se puede observar el aumento de la expresión de Galectina-1 en las células resistentes a la droga. De todas formas, no se logró la correcta puesta a punto de la técnica ni se obtuvieron réplicas suficientes para obtener una conclusión en parte debido a las condiciones que se vivieron durante todo el 2020 y en la actualidad.

6.2. Interpretación e importancia de los reportes en ensayos clínicos

Los primeros análisis del presente trabajo se basaron en la recolección de datos provenientes de distintos ensayos clínicos de pacientes con cáncer tratados con diferentes inhibidores de punto de control inmunológico. El objetivo consistía en evaluar la eficacia de estas terapias en los pacientes estratificando por variables clínicas, tal como la edad, la historia de tabaquismo o el sitio metastásico de los pacientes. Se seleccionaron esas variables debido a que eran las que se reportaban mayoritariamente por los autores. El sexo no se ha tenido en cuenta debido a que se publicaron reiteradas veces meta-análisis con esta variable (Botticelli *et al.*, 2017; Conforti *et al.*, 2018; Pinto *et al.*, 2018; Wallis *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2020; Ye *et al.*, 2020), con resultados contradictorios e inconclusos.

Como se mencionó reiteradas veces en el caso de la edad, es importante destacar que se parte de la comparación entre inmunoterapia y control de pacientes menores a 65 años, y la comparación entre inmunoterapia y control de pacientes mayores a 65 años, representados como cocientes de riesgo (HR) reportados por los autores. A partir de allí, se obtiene el resultado de los gráficos de árbol expuestos en la **sección 5.2.** Esto mismo ocurre con los sitios metastásicos, donde la estratificación es si el paciente tiene o no metástasis en el órgano considerado, al igual que en la historia de tabaquismo del paciente, donde la clasificación de los grupos suele ser fumador, ex-fumador o no fumador. Por lo tanto, no se compara la

sobrevida global o libre de progresión de cada paciente tratado con inhibidores de puntos de control inmunológico dentro de un grupo u otro de forma directa. Otro aspecto a destacar es la heterogeneidad que existe entre los grupos control ya que al momento de interpretar los resultados no se parte de un mismo control sino de varios, tal como placebo, terapias dirigidas, quimioterapias, radioterapias o mismo otro ICI.

Por tanto, los resultados obtenidos en este análisis no fueron confiables ni concluyentes. En primer lugar, debido a los HR e IC 95% obtenidos que no se observaron diferencias estadísticas en la mayoría de los casos; y luego, debido a las dificultades y desventajas mencionadas en párrafos anteriores tanto al momento de recolectar los datos como al momento de interpretar los resultados obtenidos. Por los motivos citados, se realizaron los análisis subsiguientes donde se utilizan datos de pacientes a nivel individual.

6.3. ¿Son los 65 años de edad un punto de corte óptimo para estratificar a los pacientes?

En la **sección 1.6.1.1.1.** hemos descrito por qué se implementó hace más de un siglo esta clasificación para la edad, lo cual estuvo relacionado a una cuestión política, social y económica al igual que a la esperanza de vida de aquel entonces. Gracias a los avances de la ciencia y la medicina la esperanza de vida en la actualidad es más prolongada que los 65 años de edad. Por lo tanto, el uso de este punto de corte para estratificar, incluir o excluir personas para que reciban tratamientos, hoy en día, es una cuestión cultural que proviene de años atrás que quizás hace falta modificar.

Con el fin de comprobar si existe relación entre este punto de corte, utilizado generalmente en los ensayos clínicos, y la supervivencia global y libre de progresión de los pacientes con distintos tipos de cáncer tratados con diferentes ICI, se realizaron los análisis presentados en la **sección 5.3.** No hubo resultados estadísticamente significativos en ningún tipo tumoral, aun discriminando por terapia administrada. Sólo en dos tipos tumorales (HNSCC y CRC) se observó diferencia en la supervivencia global de pacientes tratados con anti PD-1/PD-L1, pero los biomarcadores analizados no respaldaron los resultados obtenidos. Por ende, se descartó el punto de corte de 65 años como posible biomarcador predictivo de alguna inmunoterapia en particular.

6.4. La sobrevida global en mCRC se encuentra beneficiada en los mayores a 61 años de edad tratados con anti PD-1/PD-L1

Según los resultados obtenidos para la cohorte de descubrimiento (Samstein *et al.*, 2019) en la **sección 5.3.1.1.2.**, 61 años de edad podría actuar como un posible biomarcador de respuesta clasificando a los pacientes en menores y mayores a este punto de corte, sosteniendo que los mayores a 61 años se ven beneficiados en la sobrevida global al ser tratados con agentes anti PD-1/PD-L1. En primer lugar, ello viene respaldado por el biomarcador TMB post-tratamiento dentro de la misma cohorte, donde los mayores a 61 años tienen más carga mutacional tumoral. En segundo lugar, en la cohorte de validación (Yaeger *et al.*, 2018), la TMB también es significativamente superior en los pacientes mayores al punto de corte. Para la mayoría de los tumores sólidos, incluido el cáncer colorrectal (ver **sección 1.5.4.1.2.**), la TMB juega un rol muy importante como biomarcador predictivo. En este sentido, cuanto más alta es la carga mutacional tumoral, mayor es la probabilidad de que ese paciente responda al inhibidor de punto de control inmunológico ya que cuenta con mayor carga de neoantígenos, el tumor se encuentra más infiltrado y presenta una potente respuesta inmune anti tumoral.

Respecto al estado de MSI (Giannakis *et al.*, 2016; Yaeger *et al.*, 2018; Vasaikar *et al.*, 2019), se observó que los pacientes mayores a 61 años suelen tener un estado de microsatélite más inestable (MSI-H) que los menores a ese punto de corte, la diferencia fue significativa pero la fuerza de asociación fue pequeña. Esta fuerza de asociación pequeña podría deberse a la escasa cantidad de pacientes con MSI-H en el análisis, lo cual puede estar ligado a que aproximadamente el 15% de los casos esporádicos de CRC tienen fenotipos de MSI, el resto presenta inestabilidad cromosómica (CIN), y de los casos hereditarios del 1% al 3% presentan MSI. En línea con lo anterior, los tumores en estadio IV con inestabilidad de microsatélite alta constituyen sólo del 2% al 4% de todos los CRC metastásicos. Además, así como esta terapia es eficaz para los subtipos de CRC que cumplen con dichos biomarcadores (TMB y MSI-H), también lo es para los tumores CRC llamados dMMR-MSI-H, no así en tumores pMMR-MSI-L. Por consiguiente, sabiendo que el estado de MSI se asocia a la reparación del ADN (deficiente o eficiente), cabe mencionar que los tumores caracterizados por dMMR en casos esporádicos se asocian con la edad avanzada (ver **Introducción**).

Como se mencionó en la **Introducción**, se ha demostrado que una TMB y una MSI-H previa al tratamiento con ICI se correlaciona con una respuesta beneficiosa para los pacientes

con CRC. Por lo tanto, estas terapias son eficaces para los subtipos de CRC que cumplen con dichos biomarcadores, ya que la carga de mutaciones es casi veinte veces mayor en los tumores colorrectales MSI-H que en los MSI-L, ello como resultado de la generación de neoepítopes en los MSI-H. Además, es importante destacar que los tumores con MSI-H suelen encontrarse muy infiltrados por células inmunes, entre ellas los macrófagos. Se ha reportado que los tumores MSI-H se encuentran directamente asociados a células T colaboradoras y macrófagos M1 (Narayanan *et al.*, 2019); estos últimos conocidos por su rol inmunoestimulante al contrario de los macrófagos M2, con un rol inmunosupresor. En línea con lo anterior, al analizar el infiltrado inmune de las biopsias pre-tratamiento de TCGA se observaron diferencias en una sola población, macrófagos M1, los cuales se encuentran en mayor proporción en los pacientes mayores a 61 años. Respecto a la clasificación CMS, los pacientes mayores a 61 años con mCRC podrían estar cerca de un fenotipo CMS1 (MSI-inmune) caracterizado por hipermutaciones, inestabilidad de microsátélites y una fuerte activación inmune. Además, los tumores CMS1 que evaden al sistema inmune se caracterizan por una alta expresión de PD-1 (PDCD1), CTLA-4 y PD-L1, siendo buenos candidatos para las terapias basadas en ICI.

Otro resultado en discusión son las mutaciones pre-tratamiento en la cohorte de validación (Yaeger *et al.*, 2018), se obtuvo que EPHA5 se encuentra más mutado en los pacientes mayores a 61 años. No se han encontrado evidencias acerca del rol de este gen mutado en cáncer colorrectal, pero se ha informado en dos estudios que las mutaciones de EPHA5 se asociaron con un aumento de TMB, carga de neoantígenos, niveles de firmas de expresión génica relacionadas con el sistema inmunitario y TILs en adenocarcinoma de pulmón (LUAD-TCGA). Los pacientes con LUAD con mutaciones de EPHA5 en la cohorte de inmunoterapia lograron una PFS más prolongada que los pacientes con EPHA5-WT. Las vías de respuesta inmunitaria se encontraban entre las principales vías enriquecidas en muestras con mutaciones de EPHA5 (Huang *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020).

6.5. La sobrevida global es mayor en melanoma estadio III tratado con monoterapia de ICI pero no con la combinación de éstos

En la comparación entre la sobrevida global en pacientes con melanoma metastásico en pulmón, hígado o ganglios linfáticos tratados con anti PD-1/PD-L1, los pacientes con melanoma que tenían metástasis en los ganglios se encontraron beneficiados, como era de esperarse debido al estadio de la enfermedad. Lo mismo ocurrió con los pacientes tratados con

anti CTLA-4, excepto que la comparación con metástasis en hígado no fue posible debido a la escasa cantidad de pacientes (Samstein *et al.*, 2019). Sin embargo, estas diferencias significativas no se encontraron en los pacientes tratados con la combinación anti PD-1/PD-L1+CTLA-4. Cabe destacar que para los tratados con anti PD-1/PD-L1, el sitio metastásico de peor supervivencia global fue el hígado. La presencia de metástasis y microambiente inmunológico, en ese sitio metastásico, puede influir en la respuesta a los ICI. En diferentes estudios se ha reportado que la metástasis en hígado podría ser un factor de mal pronóstico para pacientes tratados con inhibidores de punto de control inmunológico. A su vez, se ha demostrado recientemente que la prevalencia de PD-L1 y TILs varía según el sitio metastásico. En particular, el hígado se caracteriza por tener un microambiente inmunológico desértico mientras que el pulmón y los ganglios por tener mayores niveles de PD-L1 y TILs, es decir que el microambiente metastásico hepático parece ser "más frío" que el tumor primario o que otro sitio metastásico como pulmón o ganglio linfático. En melanoma, las metástasis hepáticas se han asociado con respuestas inferiores anti PD-1 y con una infiltración pobre de células T CD8 (Axelrod *et al.*, 2018; Bilen *et al.*, 2019; Botticelli *et al.*, 2020).

No se observaron diferencias significativas al analizar la TMB post-tratamiento en ninguna de las comparaciones posibles. Sin embargo, en ambas cohortes, tratados con anti PD-1/PD-L1 y anti CTLA-4, se observaron diferencias en las mutaciones del tumor primario después del tratamiento de los pacientes con metástasis en pulmón y ganglios linfáticos, pero no en hígado (Samstein *et al.*, 2019). Los genes principalmente mutados en los pacientes con metástasis en pulmón, fueron: KMT2A, EPHA7, EP300, MDC1, PGR, CARD11, TET2 y TP53. Los genes KMT2A, EP300 y TET2, en su forma *wild-type*, codifican reguladores epigenéticos. KMT2A actúa como histona metiltransferasa, EP300 como histona acetiltransferasa, y TET2 como ADN demetilasa. Existe evidencia genómica de que los reguladores epigenéticos, incluidas las enzimas modificadoras de histonas/cromatina, al igual que las enzimas y vías de desmetilación del ADN, pueden estar involucrados en el desarrollo y/o progresión del melanoma (Lee *et al.*, 2015; Rollins, Kim y Tsao, 2016). Se han desarrollado agentes farmacológicos que inhiben los mecanismos epigenéticos y reprograman patrones específicos de metilación del ADN o modificaciones de histonas post-traduccionales en células tumorales. El potencial terapéutico de la combinación de terapias epigenéticas con inmunoterapia se publicó por primera vez en informes demostrando que las firmas de genes

relacionados con la inmunidad o inflamación aumentaban tras la inhibición de los mecanismos epigenéticos, y en algunos casos revirtiendo la resistencia adquirida a ICI (Licht y Bennett, 2021). Estos estudios y otros sugieren que los inhibidores epigenéticos pueden aumentar la eficacia de la inmunoterapia al mejorar la antigenicidad y la presentación de neoantígenos, reprogramar el TME para contrarrestar los mecanismos inmunosupresores y revertir el exhaustamiento de las células T citotóxicas. El campo de la epigenética se encuentra en auge y a medida que se expanda el conocimiento de cómo los mecanismos epigenéticos gobiernan la presentación de antígenos tumorales y la función de las células inmunes, las estrategias que aprovechen estos mecanismos serán importantes para diseñar terapias racionales que refuercen la respuesta a las inmunoterapias. Es sustancial la identificación y validación de biomarcadores para determinar qué pacientes obtendrán el mayor beneficio de la epigenética y la inmunoterapia combinadas (Olinio *et al.*, 2020; Licht y Bennett, 2021). Cabe señalar que no se encontró información específica y detallada sobre las mutaciones que podrían ocasionar los ICI luego de su administración en genes reguladores epigenéticos.

Por otra parte, se demostró que la delección de TET2 en modelos murinos de melanoma y células tumorales de colon redujo la expresión de quimioquinas y TILs, lo que permitió a los tumores evadir la inmunidad antitumoral y ser resistentes frente a la terapia anti PD-L1. Por el contrario, la expresión de TET-WT aumentó las quimioquinas y los TILs. Xu *et al.* sugieren la actividad de TET como un biomarcador para predecir la eficacia y la respuesta del paciente a la terapia anti PD-1/PD-L1 y la estimulación de la actividad de TET como inmunoterapia adyuvante de tumores sólidos (Xu *et al.*, 2019).

La importancia de TP53 se ha establecido en muchos estudios, pero ahora está claro que el estado de p53 en la célula tumoral también tiene un impacto profundo en la respuesta inmune. La pérdida o mutación de p53 en los tumores puede afectar el reclutamiento y la actividad de las células mieloides y células T, lo que permite la evasión inmunitaria y promueve la progresión del cáncer. Históricamente, las mutaciones en TP53 se asocian con un pronóstico desfavorable en pacientes con melanoma. Varios estudios han demostrado que los pacientes con mutaciones en TP53 tienen una supervivencia esperada más corta (Blagih *et al.*, 2020). Respecto al gen MDC1, en su forma WT, codifica para una proteína *scaffold* involucrada en los primeros pasos de la DDR (por su nombre en inglés *DNA damage response*, respuesta a daño del ADN en español). Existen oportunidades para posibles intervenciones terapéuticas en

tumores con bajos niveles de MDC1 o MDC1 mutados. Se ha demostrado que estas células genéticamente inestables son más susceptibles a los agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN, la radiación y los inhibidores de PARP, debido a la falta de reparación adecuada de la rotura de la doble hebra del ADN. Se ha propuesto utilizar los niveles de MDC1 como biomarcador para los pacientes que pueden beneficiarse de estas terapias convencionales (Ruff *et al.*, 2020), pero no hay casos reportados para los ICI.

Respecto a los pacientes tratados con anti CTLA-4, el único gen mutado con un p-valor ajustado significativo fue NRAS, encontrándose más mutado en los pacientes con melanoma metastásico en pulmón. NRAS es el segundo impulsor oncogénico más común en melanoma. Los tumores que portan mutaciones NRAS son muy agresivos y se asocian con una menor supervivencia del paciente. En un estudio, se ha demostrado que los pacientes con melanoma mutante NRAS tienen tasas de respuesta similares a la terapia con ICI (anti PD-1, anti CTLA-4 o la combinación) en comparación con los pacientes de NRAS-WT. No obstante, la mediana de supervivencia global de los pacientes con melanoma NRAS-mut fue significativamente menor, con 21 meses en comparación con 33 meses, en los pacientes con melanoma NRAS *wild-type*. La terapia con iMEK antes o después de la terapia con ICI mostró una tendencia hacia un beneficio en la supervivencia de los pacientes con melanoma NRAS-mut. La inhibición adicional de MEK en estos pacientes podría mejorar el beneficio clínico (Kirchberger *et al.*, 2018).

6.6. La supervivencia libre de progresión en melanoma metastásico se encuentra beneficiada en los mayores a 62 años tratados con la combinación de ICI

Se observó en la **sección 5.2.2.1.1.** que 62 años podría actuar como un posible biomarcador predictivo de respuesta clasificando a los pacientes con melanoma en menores y mayores a este punto de corte, sosteniendo que los mayores a 62 años se ven beneficiados en la supervivencia libre de progresión al ser tratados con la combinación anti PD-1+CTLA-4 (Gide *et al.*, 2019). Ello no sólo se vio en la PFS sino también en la respuesta (RECIST) de los pacientes (Gide *et al.*, 2019; Sade-Feldman *et al.*, 2018; Auslander *et al.*, 2018), donde los respondedores (respuesta parcial o completa) predominan en el grupo de mayores a 62 años respecto de los menores al punto de corte establecido.

6.6.1. El rol del infiltrado inmune y vías de señalización enriquecidas previo al tratamiento en pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma metastásico

6.6.1.1. Los pacientes con melanoma mayores a 62 años presentan un infiltrado inmune enriquecido en células candidatas para recibir la terapia anti PD-1+CTLA-4

El análisis del infiltrado inmune se realizó a través de RNA-seq y scRNA-seq. En las biopsias pre-tratamiento, considerando las cohortes de descubrimiento (RNA-seq) (Gide *et al.*, 2019 pre-PD-1+CTLA-4) y validación (RNA-seq y scRNA-seq) (TCGA; Snyder *et al.*, 2014; Van Allen *et al.*, 2015; Hugo *et al.*, 2016; Auslander *et al.*, 2018; Sade-Feldman *et al.*, 2018; Gide *et al.*, 2019 pre-PD-1), se vio que las poblaciones celulares T CD4 de memoria activadas, macrófagos M1 y células B de memoria se encuentran significativamente incrementadas en los mayores a 62 años. Las primeras dos se observaron en las cohortes tanto de descubrimiento como de validación mientras que la última sólo en la de validación. Respecto a los menores de 62 años, se vio que tienen una mayor proporción de macrófagos M0, células dendríticas (grupo 4) y linfocitos exhaustos que expresan genes relacionados al ciclo celular (grupo 11). A su vez, en la clasificación de células T CD8 de Sade-Feldman *et al.* se obtuvieron diferencias en el grupo CD8 1 relacionado con las células T CD8 exhaustas que también expresan genes involucrados en el ciclo celular, similar al grupo 11. Los demás p-valores de cada grupo de células T CD8 (CD8 2-6) no fueron significativos, aunque se observa un sesgo de mayor porcentaje de células CD8 hacia los menores de 62 años.

Subrahmanyam *et al.* han estudiado, mediante espectrometría de masas (CyTOF, *Cytometry by Time of Flight*), el rol de las células inmunes en sangre periférica de pacientes con melanoma previo a ser tratados. Allí informaron que los respondedores a la monoterapia anti CTLA-4 tienen altos niveles basales de células T de memoria CD4 y CD8, lo que indica que estos subtipos de células de memoria juegan un papel importante en el bloqueo anti CTLA-4 y podrían actuar como potenciales biomarcadores predictivos (Subrahmanyam *et al.*, 2018). Además, dos grupos de investigación encontraron que los altos niveles pre-tratamiento de las células T CD4 de memoria y las células Th9 (por su nombre en inglés *T-helper 9*) productoras de IL-9, se correlacionaron con las respuestas clínicas de los pacientes con melanoma tratados con anti PD-1 (Shen *et al.*, 2019). Los ICI modulan a las células T, al inhibir CTLA-4 aumenta el número de células T efectoras CD4 y disminuye el número de células T reguladoras, y al inhibir PD-1 aumentan las células T CD8 activadas (Willsmore *et al.*, 2021; Lei *et al.*, 2021).

Se cree que la inhibición de PD-1/PD-L1 funciona a través de la reactivación de las células T efectoras en el TME y es consistente con la observación clínica de que los tumores con "respuesta inmune exhausta", es decir con TILs ineficaces, responden mejor a la terapia anti PD-1 (Liu *et al.*, 2019). Múltiples estudios han demostrado que la respuesta a la inhibición de PD-1 en el melanoma se puede predecir mediante una alta proporción de células T en el tumor. Estas células tienden a expresar más PD-1 y CD8, y presentar una mayor clonalidad del receptor de células T (Chen *et al.*, 2016; Daud *et al.*, 2016; Tumeh *et al.*, 2014).

Wei *et al.* utilizaron espectrometría de masas para caracterizar de manera integral los mecanismos de acción de los ICI en modelos de melanoma humano y tumores singénicos murinos transplantables. Las comparaciones en los modelos de tumores murinos indican que, tanto anti PD-1 como anti CTLA-4 solo se dirigen a un subconjunto de TILs, lo que induce la expansión de células T CD8 exhaustas (en tumores exhaustos). Por otro lado, anti CTLA-4, pero no así anti PD-1, modula el compartimento efector de CD4, induciendo específicamente la expansión de un subtipo efector de CD4 llamado Th1 (por su nombre en inglés *T-helper 1*). Ellos proponen que la expansión de células efectoras CD4 de tipo Th1 por anti CTLA-4 mejora las respuestas antitumorales al mejorar la infiltración de células CD8, la actividad citolítica de las mismas y la formación de células T de memoria. Juntos, estos análisis preclínicos y clínicos indican que las respuestas inmunitarias antitumorales inducidas por el bloqueo de CTLA-4 y PD-1 son impulsadas por distintos mecanismos celulares (Wei *et al.*, 2017), al igual que se describió en la **sección 1.4.5.1.**, y que no sólo es importante el hecho de que haya un alto porcentaje de células T CD8 en el tumor sino también de células T CD4; más aún si la terapia seleccionada involucra anti CTLA-4.

Respecto a las células B, los fenotipos de estas células enriquecidas en tumores y en circulación de los pacientes antes del tratamiento pueden predecir la respuesta clínica a la terapia con ICI. Las características incluyen la presencia de células B de memoria (para monoterapias o la combinación de estas) y células plasmáticas (para monoterapias), mientras que la presencia de células B regulatorias crea un ambiente desfavorable (Willsmore *et al.*, 2021).

Focalizando en los macrófagos, según las condiciones del TME los monocitos en sangre se reclutan allí y se convierten en macrófagos asociados a tumores (TAM). Antes de la polarización, los macrófagos existen primero como macrófagos M0 (*uncommitted*, no

comprometidos o estado *naïve*); los estímulos de citoquinas determinan en gran medida la dirección subsiguiente de polarización. Los macrófagos se desarrollan en dos grupos principales con diferentes funciones en la defensa y vigilancia inmunológica llamados macrófagos con fenotipo M1 y fenotipo M2, los cuales pueden transformarse uno en otro con los cambios en el microentorno, por eso su polarización es plástica. Se encuentran en estudio varios tipos de tratamientos contra los TAM, como la inhibición de los macrófagos M2 incentivando la transición de estos a macrófagos M1, mejorando la fagocitosis de los tumores y reforzando el papel de los macrófagos en la prevención del crecimiento y metástasis tumorales (Zhou *et al.*, 2020; Cess y Finley, 2020). Los M1 están involucrados en la promoción de la inmunidad antitumoral y los M2 tienen propiedades pro-tumorigénicas. PD-1 puede expresarse en la membrana de los TAM, los macrófagos de tipo M2 expresan más PD-1 que los de tipo M1. Si los niveles de M2 son mayores que los M1, se ha reportado que el bloqueo de CSF-1R combinado con anti PD-1 o CTLA-4, y luego combinado con gemcitabina, optimiza el efecto del tratamiento (Wang y Wu, 2020). Es importante destacar que se ha informado que la mayoría de los pacientes muestran resistencia a los ICI y la evidencia indicó a la acumulación, inducida por quimiotaxis, de TAM tipo M2 como una de las principales causas de limitación de los inhibidores de puntos de control (Bu *et al.*, 2016). Respecto a las células dendríticas (*dendritic cells*, DC), se ha descrito que las respuestas eficaces clínicas se relacionan con una alta expresión pre-tratamiento de PD-L1 en células dendríticas en pacientes con melanoma tratados con una combinación de anti PD-1+CTLA-4 (Peranzoni *et al.*, 2020). Sin embargo, los subtipos de células dendríticas son muy diversos (Wculek *et al.*, 2020), aún más que los macrófagos, es por ello que existe la dificultad de afirmar que, el hecho de que las DC se encuentren aumentadas en los mayores a 62 años, sea beneficioso previo al tratamiento.

Por otro lado, en las biopsias post-tratamiento disponibles, se vieron diferencias en dos poblaciones inmunes, las células T CD8 y los mastocitos activados, ambas aumentadas en los mayores a 62 años. El hecho de que las células T CD8 se encuentren incrementadas luego del tratamiento da a entender que estas células citotóxicas se encuentran activas generando una respuesta anti-tumoral, respondiendo de esta manera a la terapia. Sin embargo, como se mencionó en los **Resultados** la cantidad de pacientes para ese análisis fue muy pequeño (menores = 5; mayores = 4). Respecto al CYT o índice citolítico, en las biopsias pre-tratamiento fue significativamente superior en los mayores a 62 años que en los menores. La expresión de

granzima A (GZMA) y perforina (PRF1) se asocia con la presencia de infiltrado inmune citotóxico activado y expresión de genes de puntos de control inmune. Un análisis de expresión génica confirmó que la expresión de GZMA y PRF1 en muestras de melanoma se encuentra enriquecida en los respondedores a anti CTLA-4 (Van Allen *et al.*, 2015).

En resumen, los resultados obtenidos se respaldan con la evidencia citada interpretando que los mayores a 62 años tienen un infiltrado inmune enriquecido en células candidatas para recibir la terapia combinada, principalmente las T CD4 que no se encuentran representadas mayoritariamente en los menores a 62 años. Además, se puede relacionar con el resultado obtenido en la **sección 5.2.2.1.1.3.** donde se analizó si existían o no diferencias en la PFS de pacientes tratados con la combinación anti PD-1+CTLA-4 respecto de los tratados con las monoterapias anti PD-1 y anti CTLA-4, y se vio que la diferencia en los mayores a 62 años era significativa entre los tres, siendo la terapia combinada el tratamiento óptimo. Sin embargo, en los menores a 62 años no hubo tal diferencia entre el combo de ICI y anti PD-1. Por lo tanto, el tratamiento para ese grupo de pacientes podría ser la monoterapia anti PD-1, lo cual correlaciona con el porcentaje significativo células T CD8 exhaustas.

6.6.1.2. Los genes expresados en cada población celular inmune explicarían la respuesta a anti PD-1 y anti PD-1+CTLA-4 de pacientes con melanoma menores y mayores a 62 años, respectivamente

Como se mencionó en la **sección 5.3.2.1.1.3.** no se encontró información de todos los genes expresados (Sade-Feldman *et al.*, 2018; Jerby-Arnon *et al.*, 2018) en cada población celular específica sino de algunos. En la expresión diferencial de células B, se obtuvieron genes expresados diferencialmente sólo en los mayores a 62 años involucrados en la codificación de factores de transcripción relacionados con la inflamación y respuestas a estrés (JUN, JUNB, FOS, FOSB, NR4A2, ZFP36L2, CD69), en la estimulación y activación de células B (JUN, JUNB, FOS, FOSB, DNAJA1), en la presentación de antígenos mediante MHC-II y en la modulación de respuesta de las células T (HSPA8, HSP90AA1, HSP90AB1), marcadores de células B *näive* y B de memoria (CD69, LTB).

Respecto a los genes expresados en monocitos y/o macrófagos, en los mayores se encontraron genes relacionados a monocitos (SLC2A3, THBD) que podrían transformarse en TAM-M0 y luego adquirir un fenotipo específico (dependiendo de las moléculas del TME), y

TAM-M1 (HSPA1A, HSPA1B, DNAJB1); un sólo gen de los obtenidos en este caso se relacionó con los TAM-M2 (PLIN2). Sin embargo, ese mismo gen (PLIN2) se encuentra relacionado con el metabolismo de los lípidos (ver Tabla XXVI), ello se relaciona a que un enfoque emergente para comprender la respuesta a los ICI se basa en las características del metabolismo inmunológico (ver **Introducción**). Se ha reportado que los tumores sensibles a ICI tienen mayor fosforilación oxidativa y metabolismo de lípidos en comparación con los tumores resistentes a ICI. Los estudios moleculares demostraron que el aumento del metabolismo de los lípidos aumenta la presentación de antígenos (Harel et al., 2019). En los menores a 62 años, los genes que se obtuvieron podrían estar relacionados con los TAM-M1 (RSAD2, IFIT3, IFIT2, OAS3), ya que uno de ellos es efectivamente un biomarcador de M1 (RSAD2) y tres de ellos (IFIT3, IFIT2, OAS3) son citoquinas pro-inflamatorias y genes estimulados por interferón lo que provoca una polarización hacia el fenotipo M1 (Yao *et al.*, 2019).

En las células T CD4, se vieron genes expresados diferencialmente en los mayores a 62 años con múltiples características, como marcadores de células T foliculares (CD69, FOXP3), de células T CD4 de memoria en reposo (CD69, ZFP36L2), de células T- $\gamma\delta$ (DUSP2, FAM46C), de células residentes de tejido (JUN, JUNB, FOS, FOXP3, NR4A2, CD69, BTG2, PPP1R15A), y genes involucrados en la codificación de factores de transcripción relacionados con la inflamación y respuestas a estrés (JUN, JUNB, FOS, FOXP3). Además, relacionado a las inmunoterapias, uno de los genes mencionados (FOS) regula el incremento de la expresión de PD-1 en TILs durante la progresión tumoral donde se une a la región promotora de PD-1 lo que facilita su expresión (ello asociado con alta TMB); otro de los genes expresados diferencialmente promueve la expresión de moléculas de células T regulatorias como ICOS y CTLA-4 (JUNB). En las células T de memoria de los mayores a 62 años, se obtuvieron marcadores de células residentes de tejido para células T CD4 (SLC2A3, PPP1R15A) y uno de ellos se ha reportado que se encuentra presente en las células T después de la activación (SLC2A3).

Respecto a los genes expresados en células T CD8, en los mayores se vieron genes involucrados en la codificación de factores de transcripción relacionados con la inflamación y respuestas a estrés, y a su vez actuando como marcadores de células residentes de tejido para células T CD8 (JUN, FOS, FOXP3); se encontraron genes con características y funciones

variadas como marcador de células exhaustas (HSPA1A), involucrados en la migración de linfocitos (RGS2) y en la activación de células T (TAGAP, ETS1). En relación a los ICI, como ocurrió en las células T CD4, se encontró el mismo gen expresado diferencialmente en mayores de 62 años (FOS) que regula el incremento de la expresión de PD-1 en TILs durante la progresión tumoral. Respecto a los menores de 62 años, el único gen expresado diferencialmente fue IFIT3, citoquina pro-inflamatoria, gen estimulado por interferón. Se ha reportado que los pacientes con melanoma con mayor expresión pre-tratamiento de genes inducibles por IFN- γ en los TILs, poseen mayores probabilidades de responder a la terapia anti PD-L1.

En el grupo de células T CD8 exhaustas, se observaron genes diferencialmente expresados tanto en mayores como en menores a 62 años. En el primer grupo se encontraron genes que se suelen expresar en las células CD8 y células de memoria efectoras (TXNIP, GZMK, CXCR4), y el gen CXCR4 el cual se ha reportado que el tratamiento combinado con el nuevo antagonista de este gen (Pep R) más anti PD-1 redujo el crecimiento tumoral en dos modelos murinos singénicos de CRC y melanoma. Respecto al grupo de los menores, de los genes expresados diferencialmente, uno se relaciona con exhaustamiento (HSPA1A), otro involucrado en funciones efectoras y citotoxicidad (GNLY), y el gen IFI44L inducido por interferón lo cual se relaciona con lo mencionado en las células T CD8 y su probabilidad de responder a la terapia anti PD-L1.

Respecto al grupo de linfocitos, se obtuvieron diferencias en los genes expresados en los menores a 62 años con diversas cualidades, tal como involucrados en funciones efectoras, de memoria y citotoxicidad (GNLY, LMNA, GPR183), uno de ellos (GPR183; ver Tabla XXI) ha sido asociado, en un artículo preliminar, con infiltración inmune tumoral en melanoma y otros tipos tumorales.

El hecho de realizar la expresión diferencial dentro de cada grupo celular inmune permite comprender en más detalle el rol que cumple cada célula inmune dentro del TME, estudiar la heterogeneidad que existe, incluso encontrar posibles dianas terapéuticas, es decir análisis que mediante la tecnología RNA-seq no serían posibles. Continuando con la línea de pensamiento de la sección anterior, en este análisis proveniente de otra cohorte de validación, también se observa que el rol de las células T CD4 se encuentra muy presente en los mayores a 62 años, otra población a destacar en este grupo de pacientes son las células B, como ocurrió

en el *bulk*. Los genes expresados en las células B corresponden a un fenotipo de células B activas, y no regulatorias, lo cual es favorable al momento de recibir los ICI (Willsmore *et al.*, 2021). Respecto a los macrófagos ninguno de los dos grupos mostró una tendencia al fenotipo M2, lo cual se ve favorecido al recibir ICI. Otro aspecto a señalar, son las células T CD8 exhaustas, las cuales parecen estar más relacionadas con el grupo de los menores a 62 años. Es importante mencionar que, si bien la cantidad de células fue suficiente y los criterios para el análisis de expresión diferencial fueron estrictos (ver **Materiales y Métodos**), hubiese sido notable realizar el mismo con un número superior de células, ergo más pacientes, para llevar a cabo la expresión diferencial en los grupos que no se pudo debido a la escasa cantidad de células.

6.6.1.3. La actividad de la vía NF- κ B se encuentra incrementada en los pacientes mayores a 62 años con melanoma

Tanto en el análisis funcional de GSEA de la cohorte de descubrimiento (Gide *et al.*, 2019 pre-PD-1+CTLA-4) como la de validación (Gide *et al.*, 2019 pre-PD-1) en los mayores de 62 años, se vieron enriquecidos términos relacionados principalmente al sistema inmune, lo cual podría corresponder a un infiltrado inmune alto en estos pacientes. En el análisis de actividad de vías de señalización (PROGENy) se observaron sólo diferencias significativas en la cohorte de descubrimiento (Gide *et al.*, 2019 pre-PD-1+CTLA-4), en la actividad de la vía NF- κ B, incrementada en los mayores a 62 años; el resto fueron resultados no significativos, aunque en las actividades de las vías JAK-STAT y TNF- α se observó una tendencia a estar incrementadas en los mayores también.

El factor nuclear κ B (NF- κ B) es uno de los factores de transcripción más importantes que vinculan la inflamación con el cáncer. El NF- κ B se activa en las células tumorales al igual que en el TME. El papel de NF- κ B en la respuesta inmunitaria antitumoral es ambivalente y depende del tipo de células inmunitarias que se infiltran en el tumor y del TME en general; puede ser activado por citoquinas producidas por células inmunes que se infiltran en el tumor. A su vez, NF- κ B induce la producción de quimioquinas y citoquinas que atraen células inmunes e inflamatorias adicionales, lo que da como resultado una retroalimentación positiva para mantener la inflamación asociada al tumor. Sin embargo, NF- κ B tiene un papel clave en el desarrollo y función de las células T reguladoras, lo que explica por qué la expresión de NF- κ B puede asociarse con la inhibición de las respuestas inmunitarias antitumorales, si la mayoría de

las células que infiltran el tumor son células reguladoras. La vía de señalización de NF- κ B también está involucrada en la regulación de la expresión de puntos de control inmunológico en células tumorales, ya que NF- κ B puede inducir la expresión de PD-L1. Dado que el promotor de PD-L1 abarca numerosos sitios de unión potenciales de NF- κ B, se sugirió una participación de NF- κ B en la regulación del gen de PD-L1, y se ha demostrado que lo regula de manera transcripcional y post-traducciona a través de diferentes mecanismos que dependen de las moléculas que regulan la activación de NF- κ B; los mecanismos pueden ser la expresión del gen PD-L1 directa o aumentar su expresión mejorando la estabilidad de PD-L1. La presencia de citoquinas inflamatorias, como IFN- γ , IL-17 o TNF- α , al igual que oncogenes o genes supresores tumorales pueden activar la vía dependiente de NF- κ B que conduce a la expresión de PD-L1 (Betzler *et al.*, 2020).

Aunque ciertos IFNs (IFN- α , IFN- β , IFN- γ) pueden activar la vía NF- κ B y provocar la expresión de PD-L1, se ha descrito que los interferones inducen principalmente la expresión de PD-L1 a través de la vía JAK/STAT (Betzler *et al.*, 2020). En un estudio, se identificó a JAK1 como el mediador principal de la señalización JAK/STAT asociada con la expresión inducida por IFN- γ de moléculas presentadoras de antígeno MHC-I y MHC-II, así como PD-L1 (Luo *et al.*, 2018). Gowrishankar y colegas demostraron que la expresión inducible por IFN- γ de PD-L1 depende de NF- κ B en células de melanoma humano. Otro grupo de investigadores informaron que el bloqueo profiláctico de TNF- α previo al inicio de la inhibición combinada de PD-1 y CTLA-4 puede prevenir efectos adversos autoinmunes y, además, mejorar la eficacia del tratamiento antitumoral en modelos de ratón (Betzler *et al.*, 2020). PD-L1 se ha validado clínicamente en tres grandes estudios de fase III como un biomarcador predictivo para los pacientes que pueden beneficiarse de la monoterapia anti PD-1/PD-L1. Tanto IFN- γ , MHC-I como MHC-II son predictivos del beneficio clínico de pembrolizumab (Luo *et al.*, 2018). Además, se ha propuesto a NF- κ B y STAT1 como las dos vías principales involucradas en la polarización de macrófagos M1 (Yao *et al.*, 2019).

Es importante resaltar que este análisis habría sido más enriquecedor si se realizaba con las demás cohortes de validación utilizadas en el análisis del infiltrado inmune, pero como se explicó **sección 5.2.2.1.1.2.C.** sólo la cohorte de Gide *et al.* pre-PD-1 contaba con las *counts* para hacer un análisis óptimo y válido.

6.6.2. El rol de los biomarcadores predictivos y pronósticos intrínsecos del tumor en pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma estadio IV

6.6.2.1. NF1-mut previo y BRCA2-mut posterior a anti PD-1+CTLA-4 se encuentran presentes en los pacientes con melanoma mayores a 62 años

Utilizando el panel de genes MSK-IMPACT se obtuvieron diferencias significativas en el análisis de mutaciones antes (TCGA) y después (Samstein *et al.*, 2019) del tratamiento con combinación anti PD-1/PD-L1 y anti CTLA-4. En las biopsias pre-tratamiento se vio que los mayores a 62 años tienen más mutado el gen NF1 que los menores. Se ha reportado que el subtipo de melanoma mutado en NF1 tiene una carga mutacional más alta y una firma de mutación UV más marcada. Además, se encontró que una mayor proporción de los tumores mutantes NF1 provenían de pacientes con edad más avanzada al momento del diagnóstico. En ese mismo estudio, destacaron que encontraron un mayor riesgo de muerte por melanoma y una supervivencia global deficiente en el subtipo NF1, y que este resultado desfavorable observado en el subtipo NF1 destaca la necesidad de una mejor caracterización de este grupo (Cirenajwis *et al.*, 2017). Si bien es un marcador de pronóstico adverso, una mutación de NF1 puede ser un biomarcador de predicción de tratamiento favorable, en virtud de su asociación con una mayor carga mutacional que también actúa como biomarcador predictivo de respuesta a ICI (Le *et al.*, 2015; Rizvi *et al.*, 2015; Van Allen *et al.*, 2015). En línea con lo anterior, los subtipos NF1 tienen mayor TMB que los subtipos BRAF, NRAS y WT, y más mutaciones en TP53 (LoRusso *et al.*, 2020). Los melanomas BRAF-mut se asocian típicamente con la exposición solar intermitente, mientras que los melanomas NRAS-mut o NF1-mut se asocian con la exposición solar crónica (Rose *et al.*, 2021).

Respecto a las mutaciones observadas post-tratamiento, se obtuvieron diferencias significativas en BRCA2 encontrándose más mutado en los pacientes mayores a 62 años. Hugo *et al.* hallaron que BRCA2 sufrió mutación significativamente más frecuente en los tumores de melanoma que respondieron a anti PD-1 (Hugo *et al.*, 2016).

6.6.2.2. La carga mutacional tumoral (TMB) y la carga de neoantígenos se encuentra incrementada en los pacientes mayores a 62 años con melanoma previo al tratamiento

En el análisis de la TMB pre-tratamiento de la cohorte de validación (Snyder *et al.*, 2014; Van Allen *et al.*, 2015; Hugo *et al.*, 2016) se observó una carga mutacional tumoral significativamente superior en los mayores a 62 años. Al igual que la TMB, la carga de neoantígenos (Snyder *et al.*, 2014; Van Allen *et al.*, 2015; Hugo *et al.*, 2016) en los pacientes mayores a 62 años previo al tratamiento fue significativamente más elevada que en los menores al punto de corte. La hipótesis de que la TMB influiría en la respuesta tumoral a los ICI surge directamente del concepto de neoantígenos derivados de mutaciones que pueden ser reconocidos por las células inmunitarias. Durante el desarrollo del cáncer, las mutaciones genéticas pueden, si se expresan y procesan, dar como resultado la formación de nuevas secuencias de péptidos que se pueden presentar a través de MHC-I a las células T, que luego pueden provocar una respuesta inmune citotóxica. Cuanto mayor sea el número de mutaciones somáticas no sinónimas, mayor será la probabilidad de generar neoantígenos que puedan ser reconocidos por el sistema inmunológico y, por lo tanto, mayor probabilidad de atacar al tumor cuando se lo trate con ICI. Los primeros estudios que apoyaron esta hipótesis fueron los de Snyder *et al.* y Rizvi *et al.*, donde mostraron que un mayor número de mutaciones no sinónimas se asociaron con más respuesta y una mayor supervivencia libre de progresión en pacientes con melanoma tratados con anti CTLA-4 al igual que NSCLC tratado con anti PD-1, respectivamente. Luego, esta hipótesis ha sido apoyada por otros autores en el contexto del melanoma, el cáncer de pulmón y de vejiga (Lee *et al.*, 2020). Respecto a la combinación de ICI, en un estudio de NSCLC tratado con anti PD-1+CTLA-4, propusieron a la TMB como biomarcador predictivo de respuesta de ese tratamiento (Hellmann *et al.*, 2019). Actualmente, la TMB es un biomarcador agnóstico de la histología tumoral para el tratamiento con Pembrolizumab de tumor sólidos (adultos o pediátricos) irresecable o metastásicos que han progresado al tratamiento previo o que no tienen otra alternativa terapéutica (U.S. Food and Drug Administration, 2020).

6.6.3. Los niveles de la enzima LDH previo al tratamiento son superiores en los pacientes con melanoma menores a 62 años que en los mayores a este punto de corte

Al analizar los niveles de LDH de los pacientes previo a ser tratados (Snyder *et al.*, 2014), nos encontramos con que el nivel de esta enzima catalizadora en los menores a 62 años es significativamente elevado respecto de los mayores al punto de corte. En un meta-análisis se ha demostrado que el melanoma tratado con inhibidores de puntos de control inmunológico o iBRAF e iMEK, el nivel de LDH elevado al inicio del tratamiento representa un factor de pronóstico malo. Sin embargo, los pacientes con bajos niveles de LDH y tratados con estos fármacos obtienen beneficios significativos en términos de supervivencia global y supervivencia libre de progresión (Petrelli *et al.*, 2019).

6.7. La importancia de los efectos adversos en los pacientes luego del tratamiento con inhibidores de punto de control inmunológico

No se encontraron datos individuales de los efectos adversos de pacientes tratados con la combinación de terapias, pero esta desventaja por parte de los ICI merece lugar a discusión debido a que se ha demostrado que los efectos adversos que provoca la combinación de ICI es más elevada que la monoterapia, de modo que se realizó la búsqueda en literatura de evidencias respecto a esta cuestión y su influencia en los pacientes con edades avanzadas. En los pacientes tratados con anti PD-1, los efectos adversos relacionados al sistema inmunológico (*immune related adverse events*, irAE) más comunes son fatiga, erupciones cutáneas y picazón que se presentan en el 20-35% de los pacientes. Las toxicidades de alto grado más comunes son diarrea, elevación de la alanina aminotransferasa (ALT) o aspartato aminotransferasa (AST); afortunadamente, estos irAE de grado 3-4 son raros en pacientes que reciben monoterapia anti PD-1 (<2%). Para los pacientes que reciben anti CTLA-4, los efectos adversos más comunes son similares con un mayor riesgo de diarrea (aproximadamente del 30% al 40%). También se observan endocrinopatías en hasta el 10% de los pacientes tratados con anti CTLA-4, que incluyen hipofisitis (inflamación pituitaria), hipotiroidismo e insuficiencia suprarrenal. La neumonitis es un irAE poco frecuente (<10%), pero potencialmente mortal, que se observa en pacientes tratados con anti CTLA-4 y anti PD-1. Sin embargo, a pesar de las tasas de toxicidad de grado 3-4, los efectos adversos que conducen a la muerte relacionada con el tratamiento son extremadamente raros ($\leq 2\%$) (Friedman y Wolchok, 2017).

La incidencia de irAE en los adultos mayores no parece ser sustancialmente diferente a la de los adultos más jóvenes. En CheckMate 069 (Hodi *et al.*, 2016), se notificaron reacciones adversas de alto grado tanto en los menores de 65 años (54%) como en los mayores de 65 años (52%) (Friedman y Wolchok, 2017). En el grupo de monoterapia anti PD-1, el 15% de los pacientes mayores de 65 años experimentaron efectos adversos de alto grado en comparación con el 26% de los pacientes menores de 65 años. En Checkmate 067 (Larkin *et al.*, 2019) ocurrió lo mismo, no hubo diferencias entre los grupos de edad y los irAEs. Kapoor *et al.* presentaron los resultados de un estudio que evaluó a 108 pacientes con melanoma avanzado que recibieron anti PD-1, anti CTLA-4 o ambos. Los autores demostraron una tolerancia segura de la inmunoterapia tanto en pacientes mayores a 65 años como en aquellos menores a 65 años, pero con un aumento de dermatitis relacionada con el sistema inmunológico en el primer grupo (61,4% frente a 24,1%). No se han observado diferencias estadísticamente significativas en otros irAE entre los dos grupos (Iacono *et al.*, 2021). El órgano más afectado por los irAE en inmunoterapia combinada es la piel, seguida del tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio y los órganos endocrinos. La mayoría de estos irAE ocurren dentro de los 3 a 6 meses posteriores al inicio del tratamiento con ICI. Dado que la mayoría son leves y reversibles, si se detectan a tiempo se pueden tratar adecuadamente; los biomarcadores para predecir la aparición de efectos adversos son esenciales (Nakamura, 2019).

Se debe considerar seriamente el tratamiento con inhibidores de puntos de control inmunológico para todos los pacientes mayores con melanoma avanzado, incluidos aquellos que son muy ancianos (80 años o más). En la reunión anual de la ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) en 2016 se mostró la supervivencia a largo plazo de los pacientes muy ancianos con melanoma avanzado tratados con ipilimumab, y el 20% de los pacientes sobrevivieron al menos 3 años. Cabe señalar que los datos de supervivencia global aún son tempranos cuando se intenta comparar la monoterapia con la combinación de ICI, ya que la implementación de esta última es muy reciente. Es fundamental destacar que, si un paciente no tiene fácil acceso a la atención médica, es posible que la terapia combinada no sea una opción adecuada. Si bien la terapia combinada se ha utilizado en personas de 80 años o más, debe reservarse para aquellos pacientes con un excelente estado funcional, comorbilidades médicas mínimas y excelente apoyo social (Friedman y Wolchok, 2017).

7. Conclusiones

En los últimos años ha ocurrido un avance sustancial en el ámbito de la salud a través de las ciencias ómicas, que permiten estudiar un gran número de moléculas implicadas en el funcionamiento de un organismo, utilizando como herramienta fundamental a la bioinformática. La mayor parte de este proyecto final se centró en este campo de estudio, la bioinformática, la cual es indispensable para estudiar, entender, interpretar y analizar lo que se conoce como la *big data*. Esta ciencia utiliza computación avanzada, estadística, matemática y diferentes plataformas tecnológicas para almacenar, administrar, analizar y comprender los datos con el fin de buscar y obtener una interpretación biológica válida y coherente. El hecho de contar con bases de datos públicas que contengan biopsias e información individual de cada paciente es un beneficio enorme al momento de responder preguntas y validar hipótesis. Además, permite explorar grandes volúmenes de datos que serían imposibles de crear en un laboratorio por motivos técnicos y económicos.

El concepto de *big data* o el manejo de grandes volúmenes de datos en el ámbito de las ciencias de la salud nos lleva a otro concepto ligado, el meta-análisis. Las cuestiones médicas importantes, como lo es el cáncer, se estudian más de una vez y por diferentes equipos de investigación en distintos lugares del mundo. En muchos casos, los resultados de estos múltiples estudios pequeños sobre un tema específico son diversos y contradictorios, lo que dificulta la toma de decisiones clínicas. La necesidad de tomar decisiones seguras en la práctica clínica impulsó el desarrollo hacia lo que se conoce como "medicina basada en la evidencia" (Haidich, 2010). La medicina basada en evidencias puede definirse como el enfoque sistemático, cuantitativo y preferentemente experimental para obtener y utilizar información médica dirigido a optimizar la toma de decisiones por parte de los médicos. Por tanto, el meta-análisis, un procedimiento estadístico que integra los resultados de varios estudios independientes, juega un papel central en la medicina basada en la evidencia al igual que en la medicina de precisión. Ambas surgieron con la intención de brindar mejores respuestas a espacios de incertidumbre referido a problemas clínicos, a través de las ciencias ómicas, como la genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, glicómica, entre otras. Tanto la medicina basada en la evidencia como la medicina de precisión incrementan la capacidad de ofrecer el tratamiento más adecuado para obtener el mejor resultado posible en términos de supervivencia,

respuesta, efectos adversos y costo-efectividad para cada paciente específico en función de sus características singulares.

Los ensayos clínicos individuales generalmente no tienen el poder estadístico suficiente para explorar si las variables clínicas de los participantes, como la edad, el sexo, el sitio metastásico o el estado de fumador, determinan la respuesta de un paciente al tratamiento. Un meta-análisis de múltiples ensayos clínicos, preferentemente si se dispone de datos de pacientes individuales, proporciona mayor poder para investigar las interacciones entre las características de los participantes, también llamadas covariables, y los efectos del tratamiento. Existen tres enfoques que se pueden aplicar para realizar un meta-análisis. Fisher *et al.* utilizan tres términos descriptivos para que sean memorables y para evitar ambigüedad: enfoque *daft* (que significa absurdo) se refiere a la estimación de la interacción entre ensayos por sí sola sin considerar las covariables, sólo considera los brazos de tratamiento. Por otra parte, el enfoque *deluded* (que significa engañoso) se refiere a una estimación de las interacciones entre ensayos y dentro de los ensayos combinados, es decir los datos del ensayo se dividen por las covariables de los participantes, los efectos del tratamiento se combinan dentro de estos subgrupos y luego se comparan entre subgrupos. El enfoque *deft* (que demuestra habilidad o astucia, mejor conocido como enfoque hábil) se refiere a la estimación de la interacción dentro del ensayo únicamente como se explicó en la **sección de Materiales y Métodos**, debido a que este enfoque se utilizó para los análisis del presente trabajo. Como sugieren sus apodos, los enfoques *daft* y *deluded* poseen un riesgo de sesgo o *bias*, cuyo alcance generalmente se desconoce, mientras que los enfoques *deft* no (Fisher *et al.*, 2017).

Lo que ha evolucionado a grandes pasos los últimos años no sólo fue la bioinformática aplicada a las ciencias de la salud, sino también el descubrimiento de nuevas terapias, diferentes a las convencionales, para el tratamiento del cáncer. Las terapias basadas en la inhibición de puntos de control inmunológico fueron un avance sustancial para el tratamiento contra el cáncer en los últimos años. Hasta el momento, los ICI aprobados por la FDA se dirigen principalmente a los puntos de control CTLA-4, PD-1 y PD-L1. A pesar de sus impresionantes beneficios terapéuticos a largo plazo, su eficacia se limita a un pequeño conjunto de pacientes que padecen cáncer. Otra desventaja de los ICI es que pueden llegar a inducir efectos adversos relacionados con el sistema inmunitario (irAE por su nombre en inglés *immune related adverse events*) inadvertidos, y pueden ser costosos para su uso a largo plazo. Para superar estas limitaciones,

existen actualmente dos estrategias fundamentales: la identificación de biomarcadores predictivos de la respuesta clínica a estos agentes y el uso de los ICI en combinación con otros agentes terapéuticos, como pueden ser las terapias epigenéticas, entre otras. Los biomarcadores permiten a los oncólogos practicar un enfoque de medicina personalizada o medicina de precisión en búsqueda del tratamiento óptimo para cada paciente.

Lo mencionado en párrafos anteriores destaca la importancia e implicancia del manejo de grandes volúmenes de datos biomédicos en el área de la salud, los cuales no serían posibles de analizar sin la bioinformática. Estos enfoques multi-ómicos prometen mejorar el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento personalizado. Hemos utilizado todas las herramientas estadísticas e informáticas citadas en el presente trabajo con el objetivo de buscar y encontrar biomarcadores de alcance clínico predictivos de la respuesta a inhibidores de puntos de control inmunológico en distintos tipos de cáncer, utilizando diferentes bases de datos públicas que tenían información de interés.

Nos encontramos a lo largo del proyecto con que las respuestas varían no sólo, como es evidente, por tipo tumoral sino también por el agente inmunoterapéutico utilizado. En el caso del cáncer colorrectal avanzado, vimos que los pacientes mayores a 61 años de edad tienen una sobrevida global más prolongada que los menores a esa edad tratados con inhibidores de PD-1/PD-L1 (Fig. 36).

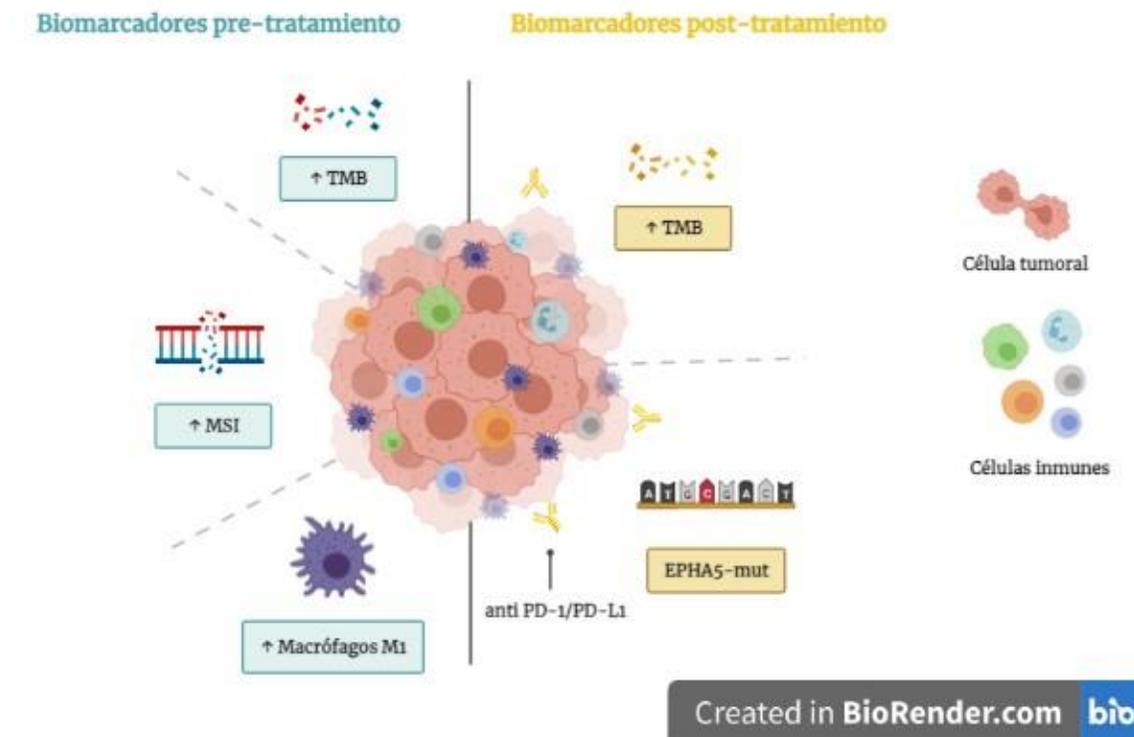


Figura 36: Esquema representativo de los resultados obtenidos para pacientes con CRC que reciben la monoterapia anti PD-1/PD-L1. Representa el microambiente tumoral de los pacientes mayores a 61 años con mCRC. TMB: carga mutacional tumoral; MSI: inestabilidad de microsatélite; EPHA5-mut: EPH receptor A5 mutado.

En el caso de los pacientes con melanoma en estadio avanzado son los mayores a 62 años los que se encuentran beneficiados respecto de la supervivencia libre de progresión al ser tratados con la combinación anti PD-1+CTLA-4, es decir que responden mucho mejor a esta terapia, mientras que los menores a 62 años podrían ser candidatos para la monoterapia anti PD-1/PD-L1 (Fig. 37). En ambos casos, cáncer colorrectal y melanoma, la diferencia observada en la supervivencia de los pacientes se respaldó con biomarcadores tanto predictivos como pronóstico, es decir posterior a la terapia, ya propuestos y establecidos por diferentes autores como se observan en las Figuras 36 y 37.

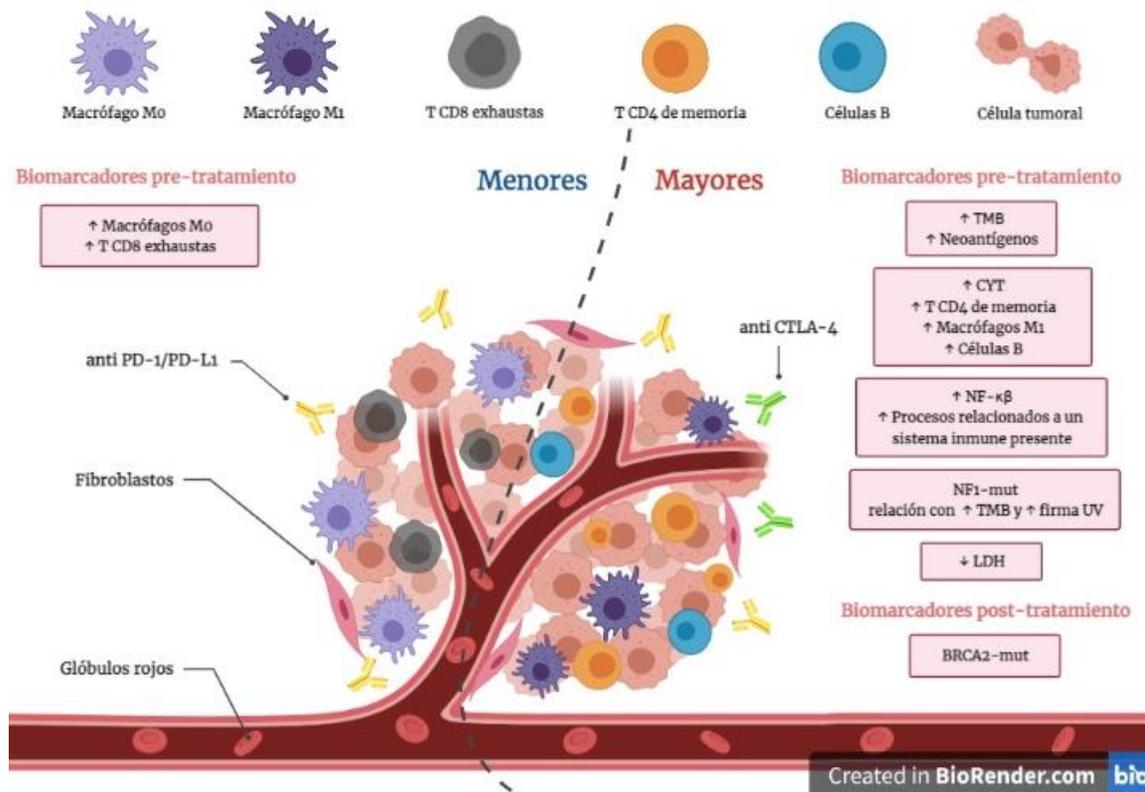


Figura 37: Esquema representativo de los resultados obtenidos para pacientes con melanoma avanzado que reciben inhibidores de puntos de control inmunológico. Representa el microambiente tumoral de los pacientes menores y mayores a 62 años con melanoma. TMB: carga mutacional tumoral; CYT: índice citolítico; NFκβ: nuclear factor κβ; NF1-mut: Neurofibromin 1 mutado; LDH: lactato deshidrogenasa; firma UV: firma ultravioleta; BRCA2-mut: breast cancer type 2 susceptibility protein mutado.

Por otro lado, hemos encontrado diferencias significativas en genes mutados con mayor frecuencia luego de las monoterapias, anti CTLA-4 o anti PD-1/PD-L1, en los pacientes con melanoma metastásico en pulmón. Surgiendo el resultado anterior del beneficio observado, y esperado, en la supervivencia global de los pacientes con melanoma metastásico en ganglios linfáticos (estadio III) respecto de los pacientes con metástasis pulmonar o hepática (estadios IV), siendo esos últimos los de peor supervivencia (Fig. 38).

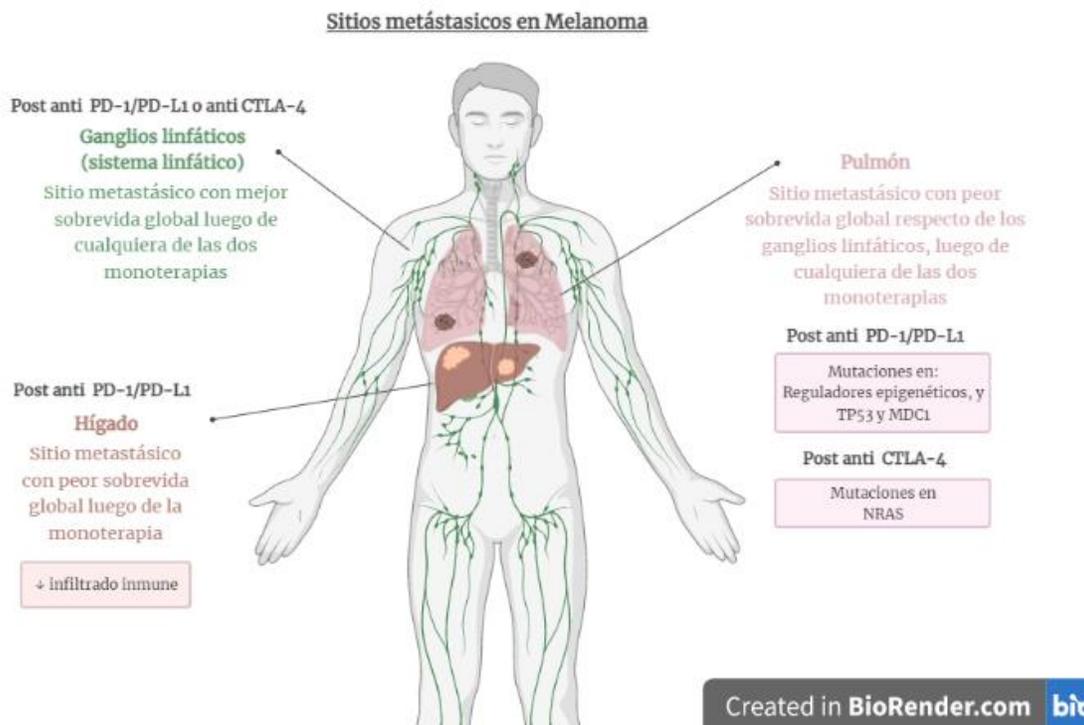


Figura 38: Esquema representativos de los resultados obtenidos para pacientes con melanoma metastásico que reciben anti PD-1 o anti CTLA-4. Los sitios metastásicos no se dan todos en el mismo paciente, sino que son excluyentes. Se detallan las modificaciones que sufre el ADN luego de cualquiera de las dos monoterapias utilizadas en pacientes con melanoma metastásico en pulmón. Las biopsias fueron obtenidas del tumor primario en todos los casos. MDC1: mediator of DNA damage checkpoint 1; TP53: tumor protein p53; NRAS: NRAS proto-oncogene, GTPase.

Es importante distinguir que, aunque los análisis bioinformáticos son indispensables para la búsqueda de biomarcadores predictivos y aplicar la medicina de precisión, los resultados obtenidos en esta área deben validarse tanto *in vitro* como *in vivo* para comprobar lo observado *in silico*.

Finalmente, nuestro objetivo general para el presente trabajo, basado en la expansión del conocimiento acerca de la respuesta a inmunoterapia en pacientes con cáncer identificando variables clínicas capaces de predecir el éxito de estos tratamientos en combinación con biomarcadores establecidos que lo respalden, se ha cumplido concluyendo que existen variables, como el sitio metastásico en melanoma o la edad en cáncer colorrectal y melanoma

metastásicos, que pueden actuar como biomarcadores predictivos de terapias basadas en inhibidores de puntos de control inmunológico. Esto siempre y cuando los biomarcadores predictivos ya establecidos lo acompañen. Además, en el caso de la edad, se demostró que el punto de corte comúnmente utilizado, 65 años, para estratificar a los pacientes de cualquier tipo de cáncer debería erradicarse como punto de corte de edad, ya sea con el fin de brindar una terapia a pacientes o incluirlos/excluirlos de un ensayo clínico, debido a que no posee evidencia significativa que demuestre lo contrario. Por tanto, considerando todo lo citado en párrafos anteriores, los resultados obtenidos tienen una gran importancia en la medicina personalizada y la medicina basada en evidencias debido a que contribuye al fin de estas dos áreas. Ambas se complementan en busca del beneficio de los pacientes reduciendo los márgenes de incertidumbre y errores al momento de otorgar una terapia determinada al paciente, en este caso, con cáncer.

8. Perspectivas Futuras

Como se mencionó en la sección anterior, los resultados encontrados *in silico* deben ser validados en modelos biológicos para el tipo de cáncer de interés, tanto *in vivo* e *in vitro* en el laboratorio. En el caso de los resultados obtenidos respecto a la edad, tanto en melanoma como en cáncer colorrectal, se podrían utilizar modelos murinos PDX (por su nombre en inglés *Patient-Derived Xenograft models*), donde los ratones inmunodeprimidos pueden humanizarse con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o células madre hematopoyéticas (HSC) para luego trasplantar las células tumorales del humano menor o mayor al punto de corte de edad de interés, o modelos singénicos de ratón (*Syngeneic Tumor models*), los cuales se logran trasplantando líneas celulares tumorales de ratón en animales inmunocompetentes en un corto período de tiempo (Chulpanova *et al.*, 2020). Para el último caso se deberán tener en cuenta los meses de vida del ratón. Según *The Jackson Laboratory*, los ratones de 3 a 6 meses de edad equivalen a los 20 a 30 años de edad en humanos, los de 10 a 14 meses de edad equivalen a 38 a 47 años de edad humana y, por último, la edad murina de 18 a 24 meses equivale al rango de 56 a 69 años de edad en humanos. A partir del mes 28 de vida aproximadamente, la probabilidad de supervivencia de los ratones es menor al 50%. Por lo tanto, si se quisiera estudiar el rol de la edad en melanoma (62 años como punto de corte de edad) o cáncer colorrectal (61 años como punto de corte de edad) tratados con la combinación anti PD-1+CTLA-4 y la monoterapia anti PD-1, respectivamente, se deberían utilizar ratones menores y mayores al último rango mencionado (18-24 meses), ya que 61 años y 62 años (equivalente a ~ 20 meses) se encuentran dentro de este rango. Es importante destacar que el hecho de utilizar modelos murinos tan ancianos, sumado al cáncer que desarrolle y el tratamiento otorgado, la probabilidad de supervivencia del animal podría ser mucho menor, más aun conociendo que a partir de los 28 meses de vida, sana, la probabilidad de supervivencia de los murinos es menor al 50%.

Además de realizar las validaciones en laboratorio de mesada, estudiando la supervivencia de los modelos murinos, se deberían hacer los estudios y análisis correspondientes a los biomarcadores pre- y post-tratamiento de interés, ya establecidos, comparando los dos grupos propuestos, como puede ser el análisis del infiltrado inmune mediante citometría de flujo. Sería apropiado también estudiar los posibles efectos adversos que el tratamiento pueda llegar a inducir en los murinos.

Respecto a los sitios metastásicos en melanoma, no se ha sido posible realizar análisis transcriptómicos con las biopsias de pacientes con metástasis en hígado, ganglios linfáticos y pulmón. A través de análisis transcriptómicos se podrían haber evaluado el infiltrado inmune de los pacientes, pero no se encontraron datos disponibles, al igual que no se encontraron datos pre-tratamiento de pacientes con melanoma metastásico en los órganos mencionados. Por tanto, estos análisis podrían realizarse en un futuro, si es que los datos se encontraran al alcance. En nuestro trabajo, hemos obtenido resultados post anti PD-1/PD-L1 y anti CTLA-4 comparando las mutaciones presentes en ambos casos, siempre dentro del tumor primario, no en la metástasis. Las mutaciones presentes en melanoma metastásico de pulmón luego del tratamiento con anti PD-1/PD-L1 se vieron relacionadas mayoritariamente a reguladores epigenéticos, ergo sabiendo que el campo de estudio de la epigenética se encuentra en auge y que la evidencia sugiere que los inhibidores epigenéticos pueden aumentar la eficacia de la inmunoterapia, podría estudiarse el rol de los genes mutados hallados relacionado a melanoma metastásico en pulmón. Además, respecto de las mutaciones presentes en melanoma metastásico en pulmón luego del tratamiento con anti CTLA-4, hemos encontrado que NRAS se encuentra mutado en este caso, y acorde a lo leído en literatura la terapia con iMEK antes o después de la terapia con ICI podría ser beneficiosa para los pacientes con melanoma NRAS-mut. Este hallazgo de la diferencia en la sobrevida global de los pacientes con melanoma en diferentes sitios metastásicos específicos quizás es más dificultoso si se lo quisiera estudiar en modelos biológicos, como por ejemplo en murinos.

El presente proyecto, además de aportar evidencia para el campo de la inmunoncología a través de todos los análisis realizados, deja un claro mensaje para decisiones a futuro, que no se deben excluir de los ensayos clínicos ni decidir no brindarle la opción de ciertas terapias a pacientes en edades muy avanzadas ni tampoco desconsiderar las variables clínicas de los pacientes al momento de tratarlos. Hemos encontrado que existen covariables de los pacientes que pueden explicar la respuesta a los inhibidores de puntos de control inmunológico, pero el análisis podría haber sido aun más exhaustivo si se contara con más datos de pacientes con diferentes tipos de cáncer, su sobrevida, las líneas de tratamiento, edad, sexo, y demás, es decir, variables que son de fácil alcance en el ámbito clínico. Nos encontramos en una era donde las ciencias ómicas en conjunto se encuentran en constante crecimiento con el fin de aportar respuestas a espacios de incertidumbre en el ámbito médico, y para que continúe

ese crecimiento se debería contar con más cantidades de datos publicados, como información de los pacientes, datos crudos genómicos, transcriptómicos, proteómicos, entre otros, con el fin de contribuir a la medicina de precisión y la medicina basada en la evidencia.

Personalmente, la experiencia de realizar mi tesina de Licenciatura en Biotecnología basada principalmente en el campo de la bioinformática me ha impulsado a continuar mis estudios para finalizar la Licenciatura en Bioinformática en la Universidad Argentina de la Empresa (UADE).

9. Bibliografía

Abbasi, Jennifer (2019) “Older Patients (Still) Left Out of Cancer Clinical Trials.” *JAMA*, 10.1001/jama.2019.17016. 24, doi:10.1001/jama.2019.17016

Akbani, R. *et al.* (2015) “Genomic Classification of Cutaneous Melanoma”, *Cell*, 161(7), pp. 1681–1696. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.044.

Albino, A P *et al.* (1989) “Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype.” *Oncogene* vol. 4,11,1363-74.

Alwine, J C *et al.*, (1977) “Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 74,12, 5350-4. doi:10.1073/pnas.74.12.5350

Amelio, I. *et al.*, (2020). “Liquid biopsies and canceromics”. *Cell death discovery*, 6(1), 131. doi: 10.1038/s41420-020-00373-0

Anagnostou, Valsamo *et al.*, (2017) “Immuno-oncology Trial Endpoints: Capturing Clinically Meaningful Activity.” *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* vol. 23,17, 4959-4969. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-3065

Andrade, W A *et al.*, (2010). “Early endosome localization and activity of RasGEF1b, a toll-like receptor-inducible Ras guanine-nucleotide exchange factor.” *Genes and immunity* vol. 11,6. 447-57. doi:10.1038/gene.2009.107

Antonia, Scott J *et al.*, (2018). “Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC.” *The New England journal of medicine* vol. 379,24. 2342-2350. doi:10.1056/NEJMoa1809697

Ascierto, P. A. *et al.* (2014) “Sequential Treatment with Ipilimumab and BRAF Inhibitors in Patients With Metastatic Melanoma: Data From the Italian Cohort of the Ipilimumab Expanded Access Program”, *Cancer Invest. Melanoma, Cancer Immunotherapy, and Innovative Therapy Unit, Istituto Nazionale Tumori Fondazione ‘G. Pascale’, Naples, Italy*,1. doi: 10.3109/07357907.2014.885984.

- Ashburner, M *et al.*, (2000) “Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium.” *Nature genetics* vol. 25,1: 25-9. doi:10.1038/75556
- Atsaves, Vasileios *et al.*, (2019). “AP-1 Transcription Factors as Regulators of Immune Responses in Cancer.” *Cancers* vol. 11,7 1037. doi:10.3390/cancers11071037
- Auslander, Noam *et al.*, (2018). “Robust prediction of response to immune checkpoint blockade therapy in metastatic melanoma.” *Nature medicine* vol. 24,10. 1545-1549. doi:10.1038/s41591-018-0157-9
- Axelrod, Margaret L *et al.*, (2018). “Emerging biomarkers for cancer immunotherapy in melanoma.” *Seminars in cancer biology* vol. 52,Pt 2. 207-215. doi:10.1016/j.semcancer.2017.09.004
- Ayers, Mark *et al.*, (2017) “IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade.” *The Journal of clinical investigation* vol. 127,8, 2930-2940. doi:10.1172/JCI91190
- Backlund, Michael G *et al.*, (2005). “15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer.” *The Journal of biological chemistry* vol. 280,5. 3217-23. doi:10.1074/jbc.M411221200
- Bajorin, Dean, (2004). “The phase III candidate: can we improve the science of selection?.” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 22,2, 211-3. doi:10.1200/JCO.2004.10.988
- Barber, Thomas D *et al.*, (2008) “Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 105,9. 3443-8. doi:10.1073/pnas.0712384105
- Barlesi, Fabrice *et al.*, (2018). “Avelumab versus docetaxel in patients with platinum-treated advanced non-small-cell lung cancer (JAVELIN Lung 200): an open-label, randomised, phase 3 study.” *The Lancet. Oncology* vol. 19,11. 1468-1479. doi:10.1016/S1470-2045(18)30673-9
- Bauer, Jürgen *et al.*, (2011) “BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site.” *Pigment cell & melanoma research* vol. 24,2, 345-51. doi:10.1111/j.1755-148X.2011.00837.x

- Beckermann, Kathryn E *et al.*, (2020). “CD28 costimulation drives tumor-infiltrating T cell glycolysis to promote inflammation.” *JCI insight* vol. 5,16 e138729. doi:10.1172/jci.insight.138729
- Bellmunt, Joaquim *et al.*, (2017). “Pembrolizumab as Second-Line Therapy for Advanced Urothelial Carcinoma.” *The New England journal of medicine* vol. 376,11. 1015-1026. doi:10.1056/NEJMoa1613683
- Betzler, Annika C *et al.* (2020) “NF-κB and Its Role in Checkpoint Control.” *International journal of molecular sciences* vol. 21,11 3949. doi:10.3390/ijms21113949
- Bilen, Mehmet Asim *et al.* (2019) “Sites of metastasis and association with clinical outcome in advanced stage cancer patients treated with immunotherapy.” *BMC cancer* vol. 19,1 857. doi:10.1186/s12885-019-6073-7
- Blagih, Julianna *et al.* (2020). “p53, cancer and the immune response.” *Journal of cell science* vol. 133,5 jcs237453. doi:10.1242/jcs.237453
- Bos, J L *et al.*, (1987). “Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers.” *Nature* vol. 327,6120. 293-7. doi:10.1038/327293a0
- Botticelli, Andrea *et al.* (2020). “The Agnostic Role of Site of Metastasis in Predicting Outcomes in Cancer Patients Treated with Immunotherapy.” *Vaccines* vol. 8,2 203. doi:10.3390/vaccines8020203
- Botticelli, Andrea *et al.*, (2017). “The sexist behaviour of immune checkpoint inhibitors in cancer therapy?.” *Oncotarget* vol. 8,59 99336-99346. doi:10.18632/oncotarget.22242
- Boutros, Celine *et al.*, (2016) “Safety profiles of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies alone and in combination.” *Nature reviews. Clinical oncology* vol. 13,8, 473-86. doi:10.1038/nrclinonc.2016.58
- Braig, M. and Schmitt, C. A. (2006) “Oncogene-induced senescence: Putting the brakes on tumor development”, *Cancer Research*, pp. 2881–2884. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4006.
- Braun, David A *et al.*, (2020). “Interplay of somatic alterations and immune infiltration modulates response to PD-1 blockade in advanced clear cell renal cell carcinoma.” *Nature medicine* vol. 26,6. 909-918. doi:10.1038/s41591-020-0839-y

- Bronner, C E *et al.*, (1994). “Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer.” *Nature* vol. 368,6468. 258-61. doi:10.1038/368258a0
- Brooks, P. C. *et al.* (1996) “Localization of matrixmetallo proteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha v \beta 3$ ”, *Cell*, 85(5), pp. 683–693. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81235-0.
- Brunet, A. (1999) “Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry”, *The EMBO Journal*, 18(3), pp. 664–674. doi: 10.1093/emboj/18.3.664.
- Brusés, Juan L., (2011). “N-cadherin regulates primary motor axon growth and branching during zebrafish embryonic development.” *The Journal of comparative neurology* vol. 519,9. 1797-815. doi:10.1002/cne.22602
- Bu, Xia *et al.* (2016) “Learning from PD-1 Resistance: New Combination Strategies.” *Trends in molecular medicine* vol. 22,6. 448-451. doi:10.1016/j.molmed.2016.04.008
- Bush, Stephen J *et al.*, (2020). “Species-Specificity of Transcriptional Regulation and the Response to Lipopolysaccharide in Mammalian Macrophages.” *Frontiers in cell and developmental biology* vol. 8 661. 21. doi:10.3389/fcell.2020.00661
- Cantley, L. C. and Neel, B. G. (1999) “New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(8), pp. 4240–4245. doi: 10.1073/pnas.96.8.4240.
- Carbone, David P *et al.*, (2017). “First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer.” *The New England journal of medicine* vol. 376,25. 2415-2426. doi:10.1056/NEJMoa1613493
- Cerami, Ethan *et al.*, (2012). “The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data.” *Cancer discovery* vol. 2,5. 401-4. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0095
- Cess, Colin G and Finley, Stacey D (2020) “Multi-scale modeling of macrophage-T cell interactions within the tumor microenvironment.” *PLoS computational biology* vol. 16,12 e1008519. doi:10.1371/journal.pcbi.1008519

- Champiat, Stéphane *et al.*, (2018) “Hyperprogressive disease: recognizing a novel pattern to improve patient management.” *Nature reviews. Clinical oncology* vol. 15,12, 748-762. doi:10.1038/s41571-018-0111-2
- Chen, Daniel S, and Mellman, Ira, (2017). “Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point.” *Nature* vol. 541,7637, 321-330. doi:10.1038/nature21349
- Chen, Pei-Ling *et al.*, (2016) “Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade.” *Cancer discovery* vol. 6,8, 827-37. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1545
- Chen, Robert *et al.*, (2017) “Phase II Study of the Efficacy and Safety of Pembrolizumab for Relapsed/Refractory Classic Hodgkin Lymphoma.” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 35,19, 2125-2132. doi:10.1200/JCO.2016.72.1316
- Chen, Wei-Dong *et al.*, (2005). “Detection in fecal DNA of colon cancer-specific methylation of the nonexpressed vimentin gene.” *Journal of the National Cancer Institute* vol. 97,15. 1124-32. doi:10.1093/jnci/dji204
- Chen, Zhiming *et al.* (2020). “EPHA5 mutations predict survival after immunotherapy in lung adenocarcinoma.” *Aging* vol. 13,1. 598-618. doi:10.18632/aging.202169
- Cheng, Donovan T *et al.*, (2015). “Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology.” *The Journal of molecular diagnostics : JMD* vol. 17,3. 251-64. doi:10.1016/j.jmoldx.2014.12.006
- Chowell, Diego *et al.* (2018) “Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 359,6375, 582-587. doi:10.1126/science.aao4572
- Chulpanova, Daria S *et al.* (2020). “Mouse Tumor Models for Advanced Cancer Immunotherapy.” *International journal of molecular sciences* vol. 21,11 4118. doi:10.3390/ijms21114118

- Cieślík, Marcin, and Arul M Chinnaiyan, (2017). “Cancer transcriptome profiling at the juncture of clinical translation.” *Nature reviews. Genetics* vol. 19,2, 93-109. doi:10.1038/nrg.2017.96
- Cirenajwis, Helena *et al.*, (2017) “NF1-mutated melanoma tumors harbor distinct clinical and biological characteristics.” *Molecular oncology* vol. 11,4, 438-451. doi:10.1002/1878-0261.12050
- Cohen, Ezra E W *et al.*, (2019). “Pembrolizumab versus methotrexate, docetaxel, or cetuximab for recurrent or metastatic head-and-neck squamous cell carcinoma (KEYNOTE-040): a randomised, open-label, phase 3 study.” *Lancet* (London, England) vol. 393,10167. 156-167. doi:10.1016/S0140-6736(18)31999-8
- Conforti, Fabio *et al.*, (2018). “Cancer immunotherapy efficacy and patients' sex: a systematic review and meta-analysis.” *The Lancet. Oncology* vol. 19,6. 737-746. doi:10.1016/S1470-2045(18)30261-4
- Cunningham, David *et al.*, (2004). “Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer.” *The New England journal of medicine* vol. 351,4. 337-45. doi:10.1056/NEJMoa033025
- Curtin, John A *et al.*, (2005) “Distinct sets of genetic alterations in melanoma.” *The New England journal of medicine* vol. 353,20, 2135-47. doi:10.1056/NEJMoa050092
- D'Alterio, Crescenzo *et al.*, (2019). “Targeting CXCR4 potentiates anti-PD-1 efficacy modifying the tumor microenvironment and inhibiting neoplastic PD-1.” *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* vol. 38,1 432. doi:10.1186/s13046-019-1420-8
- Dan Lu *et al.*, (2020). “The phosphatase PAC1 acts as a T cell suppressor and attenuates host antitumor immunity.” *Nature immunology* vol. 21,3. 287-297. doi:10.1038/s41590-019-0577-9
- Daud, Adil I *et al.*, (2016) “Tumor immune profiling predicts response to anti-PD-1 therapy in human melanoma.” *The Journal of clinical investigation* vol. 126,9, 3447-52. doi:10.1172/JCI87324
- Davies, H. *et al.* (2002) “Mutations of the BRAF gene in human cancer”, *Nature*. Nature Publishing Group, 417(6892), pp. 949–954. doi: 10.1038/nature00766.

- Davis, Elizabeth J *et al.*, (2019) “Clinical Correlates of Response to Anti-PD-1-based Therapy in Patients With Metastatic Melanoma.” *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* vol. 42,6, 221-227. doi:10.1097/CJI.0000000000000258
- de Miguel, Maria, and Calvo, Emiliano, (2020) “Clinical Challenges of Immune Checkpoint Inhibitors.” *Cancer cell* vol. 38,3, 326-333. doi:10.1016/j.ccell.2020.07.004
- DeVita VT Jr *et al.*, (2008). "DeVita, Hellman, and Rosenberg's cancer: principles & practice of oncology. Vol. 1." *Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.*
- Domingues, Beatriz *et al.*, (2018) “Melanoma treatment in review.” *ImmunoTargets and therapy* vol. 7 35-49. 7, doi:10.2147/ITT.S134842
- Dunn, G. P. *et al.* (2002) “Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape”, *Nature Immunology*, pp. 991–998. doi: 10.1038/ni1102-991.
- Ellerhorst, Julie A *et al.*, (2011) “Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma.” *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* vol. 17,2, 229-35. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2276
- Eng, Cathy *et al.*, (2019). “Atezolizumab with or without cobimetinib versus regorafenib in previously treated metastatic colorectal cancer (IMblaze370): a multicentre, open-label, phase 3, randomised, controlled trial.” *The Lancet. Oncology* vol. 20,6. 849-861. doi:10.1016/S1470-2045(19)30027-0
- Eppert, K *et al.*, (1996). “MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma.” *Cell* vol. 86,4. 543-52. doi:10.1016/s0092-8674(00)80128-2
- Fabregat, Antonio *et al.*, (2017). “Reactome pathway analysis: a high-performance in-memory approach.” *BMC bioinformatics* vol. 18,1 142. doi:10.1186/s12859-017-1559-2
- Fagone, Paolo *et al.*, (2012). “Modulation of heat shock proteins during macrophage differentiation.” *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* vol. 61,10. 1131-9. doi:10.1007/s00011-012-0506-y
- Falchook, G. S. *et al.* (2012) “Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial”, *Lancet*. Department of Investigational Cancer Therapeutics, University of Texas MD Anderson Cancer Center,

Houston, TX 77030, USA. gfalchoo@mdanderson.org, 379(9829), pp. 1893–1901. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60398-5.

Falzone, L., Salomone, S., and Libra, M. (2018). “Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium”. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1300. doi: 10.3389/fphar.2018.01300

Fehrenbacher, Louis *et al.*, (2018). “Updated Efficacy Analysis Including Secondary Population Results for OAK: A Randomized Phase III Study of Atezolizumab versus Docetaxel in Patients with Previously Treated Advanced Non-Small Cell Lung Cancer.” *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* vol. 13,8. 1156-1170. doi:10.1016/j.jtho.2018.04.039

Felding-Habermann, B. *et al.* (2002) “Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells”, *Clinical & experimental metastasis*, 19(5), pp. 427–436.

Ferlay, J. *et al.* (2013) “Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012”, *European Journal of Cancer*. Elsevier, 49(6), pp. 1374–1403. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027.

Fernández, Elmer A *et al.*, (2020) “Unveiling the immune infiltrate modulation in cancer and response to immunotherapy by MIXTURE-an enhanced deconvolution method.” *Briefings in bioinformatics*, bbaa317, doi:10.1093/bib/bbaa317

Ferrucci, P F *et al.*, (2016) “Baseline neutrophils and derived neutrophil-to-lymphocyte ratio: prognostic relevance in metastatic melanoma patients receiving ipilimumab.” *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* vol. 27,4, 732-8. doi:10.1093/annonc/mdw016

Finn, Richard S *et al.*, (2020). “Pembrolizumab As Second-Line Therapy in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma in KEYNOTE-240: A Randomized, Double-Blind, Phase III Trial.” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 38,3. 193-202. doi:10.1200/JCO.19.01307

- Finotello, Francesca and Trajanoski, Zlatko (2018) “Quantifying tumor-infiltrating immune cells from transcriptomics data.” *Cancer immunology, immunotherapy: CII* vol. 67,7: 1031-1040. doi:10.1007/s00262-018-2150-z
- Fishel, R *et al.*, (1993). “The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer.” *Cell* vol. 75,5. 1027-38. doi:10.1016/0092-8674(93)90546-3
- Fisher, D. J. *et al.* (2017). “Meta-analytical methods to identify who benefits most from treatments: daft, deluded, or deft approach?.” *BMJ (Clinical research ed.)*, 356, j573. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.j573>
- Flaherty, K. T. *et al.* (2010) “Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma”, *N Engl J Med.*. Abramson Cancer Center of the University of Pennsylvania, Philadelphia, USA. kflaherty@partners.org, 363(9), pp. 809–819. doi: 10.1056/NEJMoa1002011.
- Flaherty, K. T. *et al.* (2012) “Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations”, *N Engl J Med.* Massachusetts General Hospital Cancer Center, Boston, USA., 367(18), pp. 1694–1703. doi: 10.1056/NEJMoa1210093.
- Flores, J. F. *et al.* (1996) “Loss of the p16(INK4a) and p15(INK4b) genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma”, *Cancer Research*, 56(21), pp. 5023–5032.
- Foroutan, Momeneh *et al.*, (2021). "The ratio of exhausted to resident infiltrating lymphocytes is prognostic for colorectal cancer patient outcome". *bioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/2020.12.19.423379>
- Frederick, Dennie T *et al.*, (2013) “BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma.” *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* vol. 19,5, 1225-31. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1630
- Freeman, G. J. *et al.* (2000) “Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation”, *The Journal of Experimental Medicine*, 192(7), pp. 1027–1034. doi: 10.1084/jem.192.7.1027.

- Friedman, Claire F, and Wolchok, Jedd D. (2017) “Checkpoint inhibition and melanoma: Considerations in treating the older adult.” *Journal of geriatric oncology* vol. 8,4. 237-241. doi:10.1016/j.jgo.2017.04.003
- Gabrilovich, Dmitry I *et al.*, (2012) “Coordinated regulation of myeloid cells by tumours.” *Nature reviews. Immunology* vol. 12,4 253-68. doi:10.1038/nri3175
- Galloway, Alison *et al.*, (2016). “RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 promote cell quiescence.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 352,6284. 453-9. doi:10.1126/science.aad5978
- Galon, Jérôme *et al.*, (2006). “Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 313,5795. 1960-4. doi:10.1126/science.1129139
- Gandhi, Leena *et al.*, (2018). “Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer.” *The New England journal of medicine* vol. 378,22. 2078-2092. doi:10.1056/NEJMoa1801005
- Gandini, Sara *et al.* (2008). “Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis.” *International journal of cancer* vol. 122,1. 155-64. doi:10.1002/ijc.23033
- Ganesh, Karuna *et al.*, (2019). “Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential.” *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* vol. 16,6. 361-375. doi:10.1038/s41575-019-0126-x
- Gao, Jianjiong *et al.*, (2013). “Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal.” *Science signaling* vol. 6,269 p11. doi:10.1126/scisignal.2004088
- Garcia-Alonso, Luz *et al.*, (2019) “Benchmark and integration of resources for the estimation of human transcription factor activities.” *Genome research* vol. 29,8, 1363-1375. doi:10.1101/gr.240663.118
- Garon, Edward B *et al.*, (2019) “Five-Year Overall Survival for Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Treated With Pembrolizumab: Results From the Phase I KEYNOTE-001 Study.” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 37,28, 2518-2527. doi:10.1200/JCO.19.00934

- Garraway, L. A. *et al.* (2005) “Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma”, *Nature*. Nature Publishing Group, 436(7047), pp. 117–122. doi: 10.1038/nature03664.
- Gebhardt, Thomas *et al.*, (2018). “Tissue-resident memory T cells in tissue homeostasis, persistent infection, and cancer surveillance.” *Immunological reviews* vol. 283,1. 54-76. doi:10.1111/imr.12650
- Gene Ontology Consortium., (2021). “The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine.” *Nucleic acids research* vol. 49,D1. D325-D334. doi:10.1093/nar/gkaa1113
- Giannakis, Marios *et al.*, (2016). “Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma.” *Cell reports* vol. 15,4. 857-865. doi:10.1016/j.celrep.2016.03.075
- Gide, Tuba N *et al.*, (2019). “Distinct Immune Cell Populations Define Response to Anti-PD-1 Monotherapy and Anti-PD-1/Anti-CTLA-4 Combined Therapy.” *Cancer cell* vol. 35,2. 238-255.e6. doi:10.1016/j.ccell.2019.01.003
- Gilchrest, B. A. *et al.* (1999) “The Pathogenesis of Melanoma Induced by Ultraviolet Radiation”, *New England Journal of Medicine*. Edited by F. H. Epstein. Massachusetts Medical Society , 340(17), pp. 1341–1348. doi: 10.1056/NEJM199904293401707.
- Girotti, M. R. *et al.* (2013) “Inhibiting EGF receptor or SRC family kinase signalling overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma”, *Cancer Discov.* Signal Transduction Team, The Institute of Cancer Research, Royal Marsden Hospital, London, UK., 3(2), pp. 158–167. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0386.
- Gopalakrishnan, V *et al.*, (2018) “Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 359,6371, 97-103. doi:10.1126/science.aan4236
- Goss, K H, and Groden, J (2000). “Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor.” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 18,9. 1967-79. doi:10.1200/JCO.2000.18.9.1967
- Grady, W M *et al.*, (1999). “Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers.” *Cancer research* vol. 59,2. 320-4.

- Grady, William M, and Markowitz, Sanford D (2002). “Genetic and epigenetic alterations in colon cancer.” *Annual review of genomics and human genetics* vol. 3. 101-28. doi:10.1146/annurev.genom.3.022502.103043
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C. and Marais, R. (2007) “Melanoma biology and new targeted therapy”, *Nature*. 2007/02/23. The Institute of Cancer Research, Signal Transduction Team, Cancer Research UK Centre of Cell and Molecular Biology, 237 Fulham Road, London SW3 6JB, UK., 445(7130), pp. 851–857. doi: nature05661 [pii] 10.1038/nature05661.
- Greene, M. H. *et al.* (1984) “A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma”, *Human Pathology*, 15(12), pp. 1147–1165. doi: 10.1016/S0046-8177(84)80310-X.
- Gu, Zuguang *et al.*, (2016) “Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data.” *Bioinformatics (Oxford, England)* vol. 32,18: 2847-9. doi:10.1093/bioinformatics/btw313
- Guinney, Justin *et al.*, (2015). “The consensus molecular subtypes of colorectal cancer.” *Nature medicine* vol. 21,11. 1350-6. doi:10.1038/nm.3967
- Hagggar, Fatima A, and Boushey, Robin P (2009). “Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors.” *Clinics in colon and rectal surgery* vol. 22,4. 191-7. doi:10.1055/s-0029-1242458
- Haidich, A B. (2010) "Metanálisis en la investigación médica". *Hippokratia* vol. 14, Supl. 1. 29-37.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) “Hallmarks of cancer: The next generation”, *Cell*, pp. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hanselmann, Rainer G, and Welte, Cornelius (2016) “Origin of Cancer: An Information, Energy, and Matter Disease.” *Frontiers in cell and developmental biology* vol. 4 121. doi:10.3389/fcell.2016.00121
- Harel, Michal *et al.*, (2019) “Proteomics of Melanoma Response to Immunotherapy Reveals Mitochondrial Dependence.” *Cell* vol. 179,1, 236-250.e18. doi:10.1016/j.cell.2019.08.012
- Hassanpour, S. H. and Dehghani, M. (2017). “Review of cancer from perspective of molecular”. *Journal of Cancer Research and Practice*, 4(4), 127–129. doi: 10.1016/j.jcrpr.2017.07.001.

Hauschild, A. *et al.* (2012) “Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial”, *Lancet*. University Hospital, Schleswig-Holstein, Department of Dermatology, Kiel, Germany. ahauschild@dermatology.unikiel.de, 380(9839), pp. 358–365. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60868-X.

Hellmann, Matthew D *et al.*, (2018). “Genomic Features of Response to Combination Immunotherapy in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer.” *Cancer cell* vol. 33,5. 843-852.e4. doi:10.1016/j.ccell.2018.03.018

Hellmann, Matthew D *et al.*, (2019). “Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer.” *The New England journal of medicine* vol. 381,21. 2020-2031. doi:10.1056/NEJMoa1910231

Herbst, Roy S *et al.*, (2016). “Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial.” *Lancet* (London, England) vol. 387,10027. 1540-1550. doi:10.1016/S0140-6736(15)01281-7

Hodgkinson, C. A. *et al.* (1993) “Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein”, *Cell*. Cell Press, 74(2), pp. 395–404. doi: 10.1016/0092-8674(93)90429-T.

Hodi, F Stephen *et al.*, (2010). “Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.” *The New England journal of medicine* vol. 363,8. 711-23. doi:10.1056/NEJMoa1003466

Hodi, F Stephen *et al.*, (2016). “Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial.” *The Lancet. Oncology* vol. 17,11. 1558-1568. doi:10.1016/S1470-2045(16)30366-7

Hodis, Eran *et al.*, (2012) “A landscape of driver mutations in melanoma.” *Cell* vol. 150,2, 251-63. doi:10.1016/j.cell.2012.06.024

Hofmann, U. B. *et al.* (2000) “Coexpression of integrin $\alpha(v)\beta3$ and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) coincides with MMP-2 activation: Correlation with melanoma progression”, *Journal of Investigative Dermatology*, 115(4), pp. 625–632. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00114.x.

- Horn, Leora *et al.*, (2018). “First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer.” *The New England journal of medicine* vol. 379,23. 2220-2229. doi:10.1056/NEJMoa1809064
- Hsu, M *et al.* (2000) “Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression.” *Journal of cell science* vol. 113 (Pt 9), 1535-42.
- Huang, Weimei *et al.* (2020). “EPHA5 mutation predicts the durable clinical benefit of immune checkpoint inhibitors in patients with lung adenocarcinoma.” *Cancer gene therapy*, 10.1038/s41417-020-0207-6. doi:10.1038/s41417-020-0207-6
- Hugo, Willy *et al.*, (2015) “Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance.” *Cell*. vol. 162,6, 1271-85. doi:10.1016/j.cell.2015.07.061
- Hugo, Willy *et al.*, (2016) “Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma.” *Cell*. vol. 165,1, 35-44. doi:10.1016/j.cell.2016.02.065
- Huo, L, and T L Rothstein. (1995). “Receptor-specific induction of individual AP-1 components in B lymphocytes.” *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) vol. 154,7. 3300-9.
- Huo, L, and T L Rothstein., (1996). “Isolation and characterization of murine fra-1: induction mediated by CD40 and surface Ig is protein kinase C dependent.” *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) vol. 157,9. 3812-8.
- Hurwitz, Herbert *et al.*, (2004). “Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer.” *The New England journal of medicine* vol. 350,23. 2335-42. doi:10.1056/NEJMoa032691
- Iacono, Donatella *et al.* (2021) “Immunotherapy for older patients with melanoma: From darkness to light?.” *Pigment cell & melanoma research* vol. 34,3. 550-563. doi:10.1111/pcmr.12917
- Ishida, Y. *et al.* (1992) “Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death”, *The EMBO journal*, 11(11), pp. 3887–95. doi: 10.1128/MCB.25.21.9543.

- Issa, Jean-Pierre J (2004). “CpG island methylator phenotype in cancer.” *Nature reviews. Cancer* vol. 4,12. 988-93. doi:10.1038/nrc1507
- Jang, S. and Atkins, M. B. (2014) “Treatment of BRAF-mutant melanoma: The role of vemurafenib and other therapies”, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 95(1), pp. 24–31. doi: 10.1038/clpt.2013.197.
- Jass, J R (2007). “Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features.” *Histopathology* vol. 50,1. 113-30. doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x
- Jerby-Arnon, Livnat *et al.*, (2018). “A Cancer Cell Program Promotes T Cell Exclusion and Resistance to Checkpoint Blockade.” *Cell* vol. 175,4. 984-997.e24. doi:10.1016/j.cell.2018.09.006
- Ji, H. H. *et al.*, (2019). “Adverse Event Profiles of Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Monoclonal Antibodies Alone or in Combination: Analysis of Spontaneous Reports Submitted to FAERS”. *Clinical drug investigation*, 39(3), 319–330. doi: 10.1007/s40261-018-0735-0
- Johannessen, C. M. *et al.* (2010) “COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation”, *Nature*. BroadInstitute of Harvard and Massachusetts Institute of Technology, 7 Cambridge Center, Cambridge, Massachusetts 02142, USA., 468(7326), pp. 968–972. doi: 10.1038/nature09627.
- Johnson, Douglas B *et al.*, (2016) “Melanoma-specific MHC-II expression represents a tumour-autonomous phenotype and predicts response to anti-PD-1/PD-L1 therapy.” *Nature communications* vol. 7 10582, doi:10.1038/ncomms10582
- Joseph, Richard W *et al.*, (2018) “Baseline Tumor Size Is an Independent Prognostic Factor for Overall Survival in Patients with Melanoma Treated with Pembrolizumab.” *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* vol. 24,20, 4960-4967. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-2386
- Jotte, Robert *et al.*, (2020). “Atezolizumab in Combination With Carboplatin and Nab-Paclitaxel in Advanced Squamous NSCLC (IMpower131): Results From a Randomized Phase III Trial.” *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* vol. 15,8. 1351-1360. doi:10.1016/j.jtho.2020.03.028

- Kamb, A. *et al.* (1994) “A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types”, *Science (New York, N.Y.)*, 264(5157), pp. 436–40. doi: 10.1126/science.8153634.
- Kanehisa, M, and Goto, S. (2000) “KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes.” *Nucleic acids research* vol. 28,1: 27-30. doi:10.1093/nar/28.1.27
- Kang, Yoon-Koo *et al.*, (2017). “Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial.” *Lancet (London, England)* vol. 390,10111. 2461-2471. doi:10.1016/S0140-6736(17)31827-5
- Kassambara A., Kosinski M. and Biecek P. (2021). "survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2'. R package version 0.4.9." <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>
- Kassambara, (2020). "ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. R package version 0.4.0." <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>
- Kastrinos, Fay, and Syngal, Sapna (2007). “Recently identified colon cancer predispositions: MYH and MSH6 mutations.” *Seminars in oncology* vol. 34,5. 418-24. doi:10.1053/j.seminoncol.2007.07.005
- Katagiri, Takaharu *et al.*, (2021) “Regulation of T cell differentiation by the AP-1 transcription factor JunB.” *Immunological medicine*, 1-12. doi:10.1080/25785826.2021.1872838
- Kato, Ken *et al.*, (2019). “Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced oesophageal squamous cell carcinoma refractory or intolerant to previous chemotherapy (ATTRACTION-3): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial.” *The Lancet. Oncology* vol. 20,1. 1506-1517. doi:10.1016/S1470-2045(19)30626-6
- Keir, M. E. *et al.* (2008) “PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity”, *Annual Review of Immunology*, 26(1), pp. 677–704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331.
- Kirchberger, Michael Constantin *et al.* (2018) “MEK inhibition may increase survival of NRAS-mutated melanoma patients treated with checkpoint blockade: Results of a retrospective multicentre analysis of 364 patients.” *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 10-16. doi:10.1016/j.ejca.2018.04.010

- Kitano, Shigehisa *et al.*, (2014) “Computational algorithm-driven evaluation of monocytic myeloid-derived suppressor cell frequency for prediction of clinical outcomes.” *Cancer immunology research* vol. 2,8, 812-21. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0013
- Kojima, Takashi *et al.*, (2020). “Randomized Phase III KEYNOTE-181 Study of Pembrolizumab Versus Chemotherapy in Advanced Esophageal Cancer.” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 38,35. 4138-4148. doi:10.1200/JCO.20.01888
- Kolde R. (2019). "pheatmap: Pretty Heatmaps. R package version 1.0.12." <https://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>
- Kondo, Yutaka, and Issa, Jean-Pierre J (2004). “Epigenetic changes in colorectal cancer.” *Cancer metastasis reviews* vol. 23,1-2. 29-39. doi:10.1023/a:1025806911782
- Koyama, Shohei *et al.*, (2016) “Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints.” *Nature communications* vol. 7 10501, doi:10.1038/ncomms10501
- Kuby, J., *et al* (2007). “Inmunología de Kuby (6th ed.)”. *McGraw-Hill Interamericana de España S.L.*
- Larkin, James *et al.*, (2015) “Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma.” *The New England journal of medicine* vol. 373,1, 23-34. doi:10.1056/NEJMoa1504030
- Larkin, James *et al.*, (2018). “Overall Survival in Patients With Advanced Melanoma Who Received Nivolumab Versus Investigator's Choice Chemotherapy in CheckMate 037: A Randomized, Controlled, Open-Label Phase III Trial.” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 36,4. 383-390. doi:10.1200/JCO.2016.71.8023
- Larkin, James *et al.*, (2019). “Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma.” *The New England journal of medicine* vol. 381,16. 1535-1546. doi:10.1056/NEJMoa1910836
- Latchman, Y. *et al.* (2001) “PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation”, *Nature Immunology*, 2(3), pp. 261–268. doi: 10.1038/85330.

- Le, Dung T *et al.*, (2015) “PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency.” *The New England journal of medicine* vol. 372,26, 2509-20. doi:10.1056/NEJMoa1500596
- Le, Dung T *et al.*, (2017). “Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 357,6349. 409-413. doi:10.1126/science.aan6733
- Leach, D. R., Krummel, M. F. and Allison, J. P. (1996) “Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade”, *Science*, 271(5256), pp. 1734–1736. doi: 10.1126/science.271.5256.1734.
- Leach, F S *et al.*, (1993). “Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer.” *Cell* vol. 75,6.1215-25. doi:10.1016/0092-8674(93)90330-s
- Leary, Rebecca J *et al.*, (2008). “Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 105,42. 16224-9. doi:10.1073/pnas.0808041105
- Lee, Jonathan J *et al.* (2015) “Targeted next-generation sequencing reveals high frequency of mutations in epigenetic regulators across treatment-naïve patient melanomas.” *Clinical epigenetics* vol. 7,1 59. doi:10.1186/s13148-015-0091-3
- Lee, Mark *et al.* (2020) “Tumor mutational burden as a predictive biomarker for checkpoint inhibitor immunotherapy.” *Human vaccines & immunotherapeutics* vol. 16,1. 112-115. doi:10.1080/21645515.2019.1631136
- Lei, Yanna *et al.* (2021) “Progress and Challenges of Predictive Biomarkers for Immune Checkpoint Blockade.” *Frontiers in oncology* vol. 11 617335. doi:10.3389/fonc.2021.617335
- Lengauer, C *et al.*, (1997) “Genetic instability in colorectal cancers.” *Nature* vol. 386,6625. 623-7. doi:10.1038/386623a0
- Levine, Joel S, and Ahnen, Dennis J. (2006) “Clinical practice. Adenomatous polyps of the colon.” *The New England journal of medicine* vol. 355,24. 2551-7. doi:10.1056/NEJMcp063038
- Li, Hanjie *et al.*, (2019). “Dysfunctional CD8 T Cells Form a Proliferative, Dynamically Regulated Compartment within Human Melanoma.” *Cell* vol. 176,4. 775-789.e18. doi:10.1016/j.cell.2018.11.043

- Li, J. *et al.* (1997) “PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer”, *Science (New York, N.Y.)*, 275(5308), pp. 1943–7. doi: 10.1126/science.275.5308.1943.
- Li, X. *et al.* (2001) “Integrin alpha v beta 3 mediates K1735 murine melanoma cell motility in vivo and in vitro”, *Journal of cell science*, 114(Pt 14), pp. 2665–2672.
- Li, Yingqian *et al.*, (2012). “HSP90 α deficiency does not affect immunoglobulin gene hypermutation and class switch but causes enhanced MHC class II antigen presentation.” *International immunology* vol. 24,12. 751-8. doi:10.1093/intimm/dxs076
- Liberzon, Arthur *et al.*, (2011) “Molecular signatures database (MSigDB) 3.0.” *Bioinformatics (Oxford, England)* vol. 27,12: 1739-40. doi:10.1093/bioinformatics/btr260
- Licht, Jonathan D, and Bennett, Richard L. (2021) “Leveraging epigenetics to enhance the efficacy of immunotherapy.” *Clinical epigenetics* vol. 13,1 115. doi:10.1186/s13148-021-01100-x
- Lin, A W *et al.* (1998) “Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling.” *Genes & development* vol. 12,19, 3008-19. doi:10.1101/gad.12.19.3008
- Liu, David *et al.* (2019) “Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade.” *American journal of clinical dermatology* vol. 20,1. 41-54. doi:10.1007/s40257-018-0389-y
- Liu, Di *et al.*, (2017). “Comprehensive Proteomics Analysis Reveals Metabolic Reprogramming of Tumor-Associated Macrophages Stimulated by the Tumor Microenvironment.” *Journal of proteome research* vol. 16,1. 288-297. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00604
- Lo, J. A. and Fisher, D. E. (2014) “The melanoma revolution: From UV carcinogenesis to a new era in therapeutics”, *Science*, pp. 945–949. doi: 10.1126/science.1253735.
- Long, G. V *et al.* (2012) “Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys BRAF-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial”, *Lancet Oncol.* Melanoma Institute Australia, Westmead Institute for Cancer Research, and

Westmead Hospital, TheUniversity of Sydney, Sydney, NSW, Australia. georgina.long@sydney.edu.au, 13(11), pp. 1087–1095. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70431-X.

LoRusso, Patricia M *et al.* (2020) “Targeted therapy and immunotherapy: Emerging biomarkers in metastatic melanoma.” *Pigment cell & melanoma research* vol. 33,3. 390-402. doi:10.1111/pcmr.12847

Luo, Na *et al.* (2018) “Melanoma response to anti-PD-L1 immunotherapy requires JAK1 signaling, but not JAK2.” *Oncoimmunology* vol. 7,6 e1438106. doi:10.1080/2162402X.2018.1438106

Lynch, Henry T *et al.*, (2008). “Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management.” *Familial cancer* vol. 7,1. 27-39. doi:10.1007/s10689-007-9165-5

Maciejko, L. *et al.*, (2017). “Cancer Immunotherapy and Personalized Medicine: Emerging Technologies and Biomarker-Based Approaches”. *Journal of molecular biomarkers & diagnosis*, 8(5), 350. doi: 10.4172/2155-9929.1000350

Maio, Michele *et al.*, (2017). “Tremelimumab as second-line or third-line treatment in relapsed malignant mesothelioma (DETERMINE): a multicentre, international, randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial.” *The Lancet. Oncology* vol. 18,9. 1261-1273. doi:10.1016/S1470-2045(17)30446-1

Mantovani, Alberto, (2010) “The growing diversity and spectrum of action of myeloid-derived suppressor cells.” *European journal of immunology* vol. 40,12, 3317-20. doi:10.1002/eji.201041170

Markowitz, S *et al.*, (1995). “Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 268,5215. 1336-8. doi:10.1126/science.7761852

Markowitz, Sanford D, and Bertagnolli, Monica M (2009). “Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer.” *The New England journal of medicine* vol. 361,25. 2449-60. doi:10.1056/NEJMra0804588

Marley, Andrew R, and Nan, Hongmei (2016). “Epidemiology of colorectal cancer.” *International journal of molecular epidemiology and genetics* vol. 7,3 105-114.

Martens, Alexander *et al.*, (2016) “Baseline Peripheral Blood Biomarkers Associated with Clinical Outcome of Advanced Melanoma Patients Treated with Ipilimumab.” *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* vol. 22,12, 2908-18. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2412

Matson, Vyara *et al.*, (2018) “The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 359,6371, 104-108. doi:10.1126/science.aao3290

Mayakonda, Anand *et al.*, (2018) “Maftools: efficient and comprehensive analysis of somatic variants in cancer.” *Genome research* vol. 28,11: 1747-1756. doi:10.1101/gr.239244.118

Melamed, Rachel D *et al.*, (2017) “Genomic Characterization of Dysplastic Nevi Unveils Implications for Diagnosis of Melanoma.” *The Journal of investigative dermatology* vol. 137,4, 905-909. doi:10.1016/j.jid.2016.11.017

Messina, J. L. *et al.* (2012) “12-Chemokine Gene Signature Identifies Lymph Node-like Structures in Melanoma: Potential for Patient Selection for Immunotherapy?”, *Scientific Reports*, 2(1), p. 765. doi: 10.1038/srep00765.

Miao, Diana *et al.*, (2018). “Genomic correlates of response to immune checkpoint blockade in microsatellite-stable solid tumors.” *Nature genetics* vol. 50,9. 1271-1281. doi:10.1038/s41588-018-0200-2

Michaloglou, C. *et al.* (2005) “BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevus”, *Nature*. Nature Publishing Group, 436(7051), pp. 720–724. doi: 10.1038/nature03890.

Miller, A. J. and Mihm, M. C. (2006) “Melanoma”, *New England Journal of Medicine*, 355(1), pp. 51–65. doi: 10.1056/NEJMra052166.

Mittal, D. *et al.* (2014) “New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape”, *Current Opinion in Immunology*, pp. 16–25. doi: 10.1016/j.coi.2014.01.004.

Miyaki, M *et al.*, (1997). “Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer.” *Nature genetics* vol. 17,3. 271-2. doi:10.1038/ng1197-271

- Mootha, Vamsi K *et al.*, (2003) “PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes.” *Nature genetics* vol. 34,3: 267-73. doi:10.1038/ng1180
- Mortazavi, Ali *et al.*, (2008) “Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq.” *Nature methods* vol. 5,7, 621-8. doi:10.1038/nmeth.1226
- Motzer, Robert J *et al.*, (2018). “Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma.” *The New England journal of medicine* vol. 378,14. 1277-1290. doi:10.1056/NEJMoa1712126
- Muthusamy, N *et al.*, (1995). “Defective activation and survival of T cells lacking the Ets-1 transcription factor.” *Nature* vol. 377,6550. 639-42. doi:10.1038/377639a0
- Myung, Seung-Jae *et al.*, (2006). “15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is an in vivo suppressor of colon tumorigenesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 103,32. 12098-102. doi:10.1073/pnas.0603235103
- Nakamura, Yoshiyuki. (2019) “Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitor-Mediated Tumor Response and Adverse Events.” *Frontiers in medicine* vol. 6 119. doi:10.3389/fmed.2019.00119
- Narayanan, Sumana *et al.* (2019) “Tumor Infiltrating Lymphocytes and Macrophages Improve Survival in Microsatellite Unstable Colorectal Cancer.” *Scientific reports* vol. 9,1 13455. doi:10.1038/s41598-019-49878-4
- Nataf, Serge *et al.*, (2019). “Common Neurodegeneration-Associated Proteins Are Physiologically Expressed by Human B Lymphocytes and Are Interconnected via the Inflammation/Autophagy-Related Proteins TRAF6 and SQSTM1.” *Frontiers in immunology* vol. 10 2704. doi:10.3389/fimmu.2019.02704
- National Cancer Institute and National Human Genome Research Institute (2016) *The Cancer Genome Atlas*. Available at: <https://cancergenome.nih.gov/>.
- National Cancer Institute, (2015). "Understanding Cancer". Disponible en: <https://www.cancer.gov/>

- National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, (2016) “Clinical Trials Registration and Results Information Submission. Final rule.” *Federal register* vol. 81,183, 64981-5157.
- Nazarian, R. *et al.* (2010) “Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation”, *Nature*. Division of Dermatology/Department of Medicine, UCLA’s Jonsson Comprehensive Cancer Center, 52-121 CHS, Los Angeles, California 90095-1750, USA., 468(7326), pp. 973–977. doi: 10.1038/nature09626.
- Nebhan, Caroline A, and Douglas B Johnson. (2020). “Predictive biomarkers of response to immune checkpoint inhibitors in melanoma.” *Expert review of anticancer therapy* vol. 20,2,137-145. doi:10.1080/14737140.2020.1724539
- Newman, Aaron M *et al.*, (2015) “Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles.” *Nature methods* vol. 12,5, 453-7. doi:10.1038/nmeth.3337
- Nguyen, Ha Thi, and Duong, Hong-Quan (2018). “The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy.” *Oncology letters* vol. 16,1. 9-18. doi:10.3892/ol.2018.8679
- Nissan, M. H. *et al.* (2014) “Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence”, *Cancer Research*, 74(8), pp. 2340–2350. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2625.
- Nobori, T. *et al.* (1994) “Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers”, *Nature*. Nature Publishing Group, 368(6473), pp. 753–756. doi: 10.1038/368753a0.
- Nosho, Katsuhiko *et al.*, (2008). “Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample.” *PLoS one* vol. 3,11. e3698. doi:10.1371/journal.pone.0003698
- Ohkubo, Yusuke *et al.*, (2005). “A role for c-fos/activator protein 1 in B lymphocyte terminal differentiation.” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* vol. 174,12. 7703-10. doi:10.4049/jimmunol.174.12.7703

- Oldenhuis, C N A M *et al.*, (2008) “Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology.” *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* vol. 44,7, 946-53. doi:10.1016/j.ejca.2008.03.006
- Olino, Kelly *et al.* (2020) “Exposing Hidden Targets: Combining epigenetic and immunotherapy to overcome cancer resistance.” *Seminars in cancer biology* vol. 65. 114-122. doi:10.1016/j.semcancer.2020.01.001
- Olsen, Thale Kristin, and Baryawno, Ninib, (2018) “Introduction to Single-Cell RNA Sequencing.” *Current protocols in molecular biology* vol. 122,1, e57. doi:10.1002/cpmb.57
- Omholt, Katarina *et al.* (2003) “NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression.” *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* vol. 9,17, 6483-8.
- Orimo, Hajime, (2006) “Reviewing the definition of elderly”. *Japanese journal of geriatrics* vol. 43,1, 27-34. doi:10.3143/geriatrics.43.27
- Orthwein, Alexandre *et al.*, (2012). “Optimal functional levels of activation-induced deaminase specifically require the Hsp40 DnaJ1.” *The EMBO journal* vol. 31,3. 679-91. doi:10.1038/emboj.2011.417
- Papadopoulos, N *et al.*, (1994). “Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 263,5153. 1625-9. doi:10.1126/science.8128251
- Parsons, D Williams *et al.*, (2005). “Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway.” *Nature* vol. 436,7052. 792. doi:10.1038/436792a
- Patel, Sandip Pravin, and Razelle Kurzrock. (2015) “PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy.” *Molecular cancer therapeutics* vol. 14,4, 847-56. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0983
- Paz-Ares, Luis *et al.*, (2018). “Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer.” *The New England journal of medicine* vol. 379,21. 2040-2051. doi:10.1056/NEJMoa1810865
- Paz-Ares, Luis *et al.*, (2019). “Durvalumab plus platinum-etoposide versus platinum-etoposide in first-line treatment of extensive-stage small-cell lung cancer (CASPIAN): a randomised,

controlled, open-label, phase 3 trial.” *Lancet* (London, England) vol. 394,10212. 1929-1939. doi:10.1016/S0140-6736(19)32222-6

Pedersen T.L. (2020). "patchwork: The Composer of Plots. R package version 1.1.1." <https://CRAN.R-project.org/package=patchwork>

Peng, Weiyi *et al.*, (2016) “Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy.” *Cancer discovery* vol. 6,2, 202-16. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0283

Peranzoni, Elisa *et al.* (2020) “Myeloid Cells as Clinical Biomarkers for Immune Checkpoint Blockade.” *Frontiers in immunology* vol. 11 1590. doi:10.3389/fimmu.2020.01590

Petitclerc, E. *et al.* (1999) “Integrin alpha(v)beta 3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival”, *Cancer research*, 59(11), pp. 2724–2730.

Petrelli, Fausto *et al.* (2019) “Prognostic and predictive role of elevated lactate dehydrogenase in patients with melanoma treated with immunotherapy and BRAF inhibitors: a systematic review and meta-analysis.” *Melanoma research* vol. 29,1. 1-12. doi:10.1097/CMR.0000000000000520

Pinato, David J *et al.*, (2019) “Association of Prior Antibiotic Treatment With Survival and Response to Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Patients With Cancer.” *JAMA oncology* vol. 5,12, 1774-1778. doi:10.1001/jamaoncol.2019.2785

Pinto, Joseph A *et al.*, (2018). “Gender and outcomes in non-small cell lung cancer: an old prognostic variable comes back for targeted therapy and immunotherapy?.” *ESMO open* vol. 3,3 e000344. doi:10.1136/esmoopen-2018-000344

Rabinovich, Gabriel A, and Diego O Croci, (2012) “Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer.” *Immunity* vol. 36,3, 322-35. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.004

Rabinovich, Gabriel A, and Toscano, Marta A, (2009) “Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation.” *Nature reviews. Immunology* vol. 9,5, 338-52. doi:10.1038/nri2536

Rahmati, Marveh *et al.*, (2020) “New insights on the role of autophagy in the pathogenesis and treatment of melanoma.” *Molecular biology reports* vol. 47,11, 9021-9032. doi:10.1007/s11033-020-05886-6

- Reck, Martin *et al.*, (2016). “Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer.” *The New England journal of medicine* vol. 375,19. 1823-1833. doi:10.1056/NEJMoa1606774
- Reck, Martin *et al.*, (2019). “Updated Analysis of KEYNOTE-024: Pembrolizumab Versus Platinum-Based Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score of 50% or Greater.” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 37,7. 537-546. doi:10.1200/JCO.18.00149
- Ribas, Antoni *et al.*, (2015). “Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial.” *The Lancet. Oncology* vol. 16,8. 908-18. doi:10.1016/S1470-2045(15)00083-2
- Rini, Brian I *et al.*, (2019). “Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma.” *The New England journal of medicine* vol. 380,12. 1116-1127. doi:10.1056/NEJMoa1816714
- Rittmeyer, Achim *et al.*, (2017). “Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial.” *Lancet (London, England)* vol. 389,10066. 255-265. doi:10.1016/S0140-6736(16)32517-X
- Rizvi, Naiyer A *et al.*, (2015). “Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 348,6230. 124-8. doi:10.1126/science.aaa1348
- Robert, Caroline *et al.*, (2015). “Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma.” *The New England journal of medicine* vol. 372,26. 2521-32. doi:10.1056/NEJMoa1503093
- Robinson, Mark D *et al.*, (2010) “edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.” *Bioinformatics (Oxford, England)* vol. 26,1: 139-40. doi:10.1093/bioinformatics/btp616
- Rodig, Scott J *et al.*, (2018) “MHC proteins confer differential sensitivity to CTLA-4 and PD-1 blockade in untreated metastatic melanoma.” *Science translational medicine* vol. 10,450. eaar3342. doi:10.1126/scitranslmed.aar3342

- Roelands, Jessica *et al.*, (2017). “Immunogenomic Classification of Colorectal Cancer and Therapeutic Implications.” *International journal of molecular sciences* vol. 18,10 2229. 24. doi:10.3390/ijms18102229
- Rollins, Robert A., Kim, Kimberly H. and Tsao, Cheng- Chung (2016). “The Emerging Epigenetic Landscape in Melanoma, Human Skin Cancer, Potential Biomarkers and Therapeutic Targets” *Miroslav Blumenberg, IntechOpen*, doi: 10.5772/64733. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/human-skin-cancer-potential-biomarkers-and-therapeutic-targets/the-emerging-epigenetic-landscape-in-melanoma>
- Rooney, Michael S. *et al.*, (2015) “Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity.” *Cell* vol. 160,1-2, 48-61. doi:10.1016/j.cell.2014.12.033
- Rose, April A N *et al.*, (2021) “Biologic subtypes of melanoma predict survival benefit of combination anti-PD1+anti-CTLA4 immune checkpoint inhibitors versus anti-PD1 monotherapy.” *Journal for immunotherapy of cancer* vol. 9,1, e001642. doi:10.1136/jitc-2020-001642
- Rosner, Samuel *et al.*, (2018) “Peripheral blood clinical laboratory variables associated with outcomes following combination nivolumab and ipilimumab immunotherapy in melanoma.” *Cancer medicine* vol. 7,3, 690-697. doi:10.1002/cam4.1356
- Ruff, Sophie E *et al.* (2020). “Roles for MDC1 in cancer development and treatment.” *DNA repair* vol. 95. 102948. doi:10.1016/j.dnarep.2020.102948
- Sade-Feldman, Moshe *et al.*, (2018) “Defining T Cell States Associated with Response to Checkpoint Immunotherapy in Melanoma.” *Cell* vol. 175,4, 998-1013.e20. doi:10.1016/j.cell.2018.10.038
- Saltz, Leonard B *et al.*, (2004). “Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor.” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 22,7. 1201-8. doi:10.1200/JCO.2004.10.182
- Samstein, Robert M *et al.*, (2019). “Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types.” *Nature genetics* vol. 51,2. 202-206. doi:10.1038/s41588-018-0312-8

Sanlorenzo, Martina *et al.*, (2018) “BRAF and MEK Inhibitors Increase PD-1-Positive Melanoma Cells Leading to a Potential Lymphocyte-Independent Synergism with Anti-PD-1 Antibody.” *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* vol. 24,14, 3377-3385. doi:10.1158/1078-0432.CCR-17-1914

Schmid, Peter *et al.*, (2019). “Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial.” *The Lancet. Oncology* vol. 21,1. 44-59. doi:10.1016/S1470-2045(19)30689-8

Schubert, Michael *et al.*, (2018) “Perturbation-response genes reveal signaling footprints in cancer gene expression.” *Nature communications* vol. 9,1 20, doi:10.1038/s41467-017-02391-6

Schumacher, Ton N, and Robert D Schreiber, (2015) “Neoantigens in cancer immunotherapy.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 348,6230, 69-74. doi:10.1126/science.aaa4971

Sedrak, Mina S *et al.*, (2021) “Older adult participation in cancer clinical trials: A systematic review of barriers and interventions.” *CA: a cancer journal for clinicians* vol. 71,1, 78-92. doi:10.3322/caac.21638

Seiwert, Tanguy Y *et al.*, (2016) “Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial.” *The Lancet. Oncology* vol. 17,7, 956-965. doi:10.1016/S1470-2045(16)30066-3

Shen, Hongxing *et al.* (2019) “Predictive biomarkers for immune checkpoint blockade and opportunities for combination therapies.” *Genes & diseases* vol. 6,3 232-246. doi:10.1016/j.gendis.2019.06.006

Shi, H. *et al.* (2012) “Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance”, *Nat Commun.* Division of Dermatology, Department of Medicine, University of California, Los Angeles, 52-121 CHS, 10833 Le Conte Avenue, California 90095-1750, USA., 3, p. 724. doi: 10.1038/ncomms1727.

Shin, Daniel Sanghoon *et al.*, (2017) “Primary Resistance to PD-1 Blockade Mediated by JAK1/2 Mutations.” *Cancer discovery* vol. 7,2, 188-201. doi:10.1158/2159-8290.CD-16-1223

Shitara, Kohei *et al.*, (2018). “Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial.” *Lancet* (London, England) vol. 392,10142. 123-133. doi:10.1016/S0140-6736(18)31257-1

Sidiropoulos, Konstantinos *et al.*, (2017). “Reactome enhanced pathway visualization.” *Bioinformatics* (Oxford, England) vol. 33,21. 3461-3467. doi:10.1093/bioinformatics/btx441

Siena, Salvatore *et al.*, (2009). “Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer.” *Journal of the National Cancer Institute* vol. 101,19. 1308-24. doi:10.1093/jnci/djp280

Singh, Harpreet *et al.*, (2017) "FDA analysis of enrollment of older adults in clinical trials for cancer drug registration: A 10-year experience by the U.S. Food and Drug Administration." *Journal of clinical oncology* vol. 35,15_suppl, 10009-10009. doi: 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.10009

Singh, Shamsher, and Bajorek, Beata, (2014) “Defining 'elderly' in clinical practice guidelines for pharmacotherapy.” *Pharmacy practice* vol. 12,4, 489. doi:10.4321/s1886-36552014000400007

Slominski, A. (2004) “Melanin Pigmentation in Mammalian Skin and Its Hormonal Regulation”, *Physiological Reviews*. American Physiological Society, 84(4), pp. 1155–1228. doi: 10.1152/physrev.00044.2003.

Snyder, Alexandra *et al.*, (2014) “Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma.” *The New England journal of medicine* vol. 371,23, 2189-2199. doi:10.1056/NEJMoa1406498

Sorbye, H *et al.*, (2007) “Patient characteristics and stratification in medical treatment studies for metastatic colorectal cancer: a proposal for standardization of patient characteristic reporting and stratification.” *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* vol. 18,10, 1666-72. doi:10.1093/annonc/mdm267

Sosman, J. A. *et al.* (2012) “Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with Vemurafenib”, *N Engl J Med*. 2012/02/24. Vanderbilt-Ingram Cancer Center, Nashville, TN

37232-6307, USA. jeff.sosman@vanderbilt.edu, 366(8), pp. 707–714. doi: 10.1056/NEJMoa1112302.

Spranger, Stefani *et al.*, (2015) “Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity.” *Nature* vol. 523,7559, 231-5. doi:10.1038/nature14404

Starossom, Sarah C *et al.*, (2012) “Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration.” *Immunity* vol. 37,2, 249-63. doi:10.1016/j.immuni.2012.05.023

Steck, P. A. *et al.* (1997) “Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers”, *Nature Genetics*, 15(4), pp. 356–362. doi: 10.1038/ng0497-356.

Sterrenberg, Jason N *et al.*, (2011). “Human DNAJ in cancer and stem cells.” *Cancer letters* vol. 312,2. 129-42. doi:10.1016/j.canlet.2011.08.019

Stuart, Tim *et al.* (2019) “Comprehensive Integration of Single-Cell Data.” *Cell* vol. 177,7. 1888-1902.e21. doi:10.1016/j.cell.2019.05.031

Su, Shian *et al.*, (2017) “Glimma: interactive graphics for gene expression analysis.” *Bioinformatics (Oxford, England)* vol. 33,13: 2050-2052. doi:10.1093/bioinformatics/btx094

Subrahmanyam, Priyanka B *et al.* (2018) “Distinct predictive biomarker candidates for response to anti-CTLA-4 and anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients.” *Journal for immunotherapy of cancer* vol. 6,1 18. doi:10.1186/s40425-018-0328-8

Subramanian, Aravind *et al.*, (2005) “Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 102,43. 15545-50. doi:10.1073/pnas.0506580102

Szabo, Peter A *et al.*, (2019). “Single-cell transcriptomics of human T cells reveals tissue and activation signatures in health and disease.” *Nature communications* vol. 10,1 4706. doi:10.1038/s41467-019-12464-3

Tallerico, Rossana *et al.*, (2016) “IL-15, TIM-3 and NK cells subsets predict responsiveness to anti-CTLA-4 treatment in melanoma patients.” *Oncoimmunology* vol. 6,2 e1261242. doi:10.1080/2162402X.2016.1261242

- Tamehiro, Norimasa *et al.*, (2017). “T-cell activation RhoGTPase-activating protein plays an important role in T_H17-cell differentiation.” *Immunology and cell biology* vol. 95,8. 729-735. doi:10.1038/icb.2017.27
- Tanaka, Atsushi, and Sakaguchi, Shimon, (2017). “Regulatory T cells in cancer immunotherapy.” *Cell research* vol. 27,1, 109-118. doi:10.1038/cr.2016.151
- Tang, Fuchou *et al.*, (2009) “mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell.” *Nature methods* vol. 6,5, 377-82. doi:10.1038/nmeth.1315
- Tannock, I. F. *et al.* (2016) *The Basic Science of Oncology*. 5th edn. New York, NY: McGraw-Hill Education Medical. Disponible en: <http://hemonc.mhmedical.com/content.aspx?aid=1127462315>.
- Tay, Rong En *et al.* (2021) “Revisiting the role of CD4⁺ T cells in cancer immunotherapy-new insights into old paradigms.” *Cancer gene therapy* vol. 28,1-2. 5-17. doi:10.1038/s41417-020-0183-x
- The Jackson Laboratory (2017). *When are mice considered old?* Recuperado 1 de julio de 2021, de <https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2017/november/when-are-mice-considered-old>
- Therneau T. (2020) "A Package for Survival Analysis in R. R package version 3.2-7" <https://CRAN.R-project.org/package=survival>>.
- Thibodeau SN *et al.*, (1993). "Microsatellite instability in cancer of the proximal colon". *Science*. vol. 260 no. 5109 816-819. doi: 10.1126/science.8484122
- Thompson, C. B. and Allison, J. P. (1997) “The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator”, *Immunity*, pp. 445–450. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80366-0.
- Thompson, J. F., Scolyer, R. A. and Kefford, R. F. (2005) “Cutaneous melanoma”, *Lancet*, pp. 687–701. doi: 10.1016/S0140-6736(05)17951-3.
- Tilzey, J F *et al.*, (1991). “Jun-B gene expression mediated by the surface immunoglobulin receptor of primary B lymphocytes.” *Biochemical and biophysical research communications* vol. 175,1. 77-83. doi:10.1016/s0006-291x(05)81202-1

Tirosch, Itay *et al.*, (2016). “Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq.” *Science* (New York, N.Y.) vol. 352,6282. 189-96. doi:10.1126/science.aad0501

Topalian, Suzanne L *et al.*, (2019) “Five-Year Survival and Correlates Among Patients With Advanced Melanoma, Renal Cell Carcinoma, or Non-Small Cell Lung Cancer Treated With Nivolumab.” *JAMA oncology*, vol. 5,10 1411–1420, doi:10.1001/jamaoncol.2019.2187

Tosolini, Marie *et al.*, (2017). “Assessment of tumor-infiltrating TCRV γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays.” *Oncoimmunology* vol. 6,3 e1284723. doi:10.1080/2162402X.2017.1284723

Tumeh, Paul C *et al.*, (2014) “PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance.” *Nature* vol. 515,7528, 568-71. doi:10.1038/nature13954

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Oncology Center of Excellence, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). "Inclusion of Older Adults in Cancer Clinical Trials Guidance for Industry" (2020). Disponible en: <https://www.fda.gov/media/135804/download>

U.S. Food and Drug Administration (2020). “FDA approves pembrolizumab for adults and children with TMB-H solid tumors”. Available at: <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/fda-approves-pembrolizumab-adults-and-children-tmb-h-solid-tumors>

Vaddepally, R. K. *et al.*, (2020). “Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence”. *Cancers*, 12(3), 738. doi: 10.3390/cancers12030738

Van Allen, E. M. *et al.* (2013) “The Genetic Landscape of Clinical Resistance to RAF Inhibition in Metastatic Melanoma”, *Cancer Discov.* Department of Medical Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School; Department of Pathology, Massachusetts General Hospital Cancer Center, Boston; Broad Institute of MIT and Harvard; Harvard-MIT Division of Health Sciences and Techno. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0617.

Van Allen, Eliezer M *et al.* (2015) “Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma.” *Science* (New York, N.Y.) vol. 350,6257, 207-211. doi:10.1126/science.aad0095

Van Cutsem, Eric *et al.*, (2007). “Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer.” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 25,13. 1658-64. doi:10.1200/JCO.2006.08.1620

van der Leun, Anne M *et al.*, (2020). “CD8+ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis.” *Nature reviews. Cancer* vol. 20,4. 218-232. doi:10.1038/s41568-019-0235-4

Vanden Bush, Tony J, and Bishop, Gail A, (2008). “TLR7 and CD40 cooperate in IL-6 production via enhanced JNK and AP-1 activation.” *European journal of immunology* vol. 38,2. 400-9. doi:10.1002/eji.200737602

Vasaikar, Suhas *et al.*, (2019). “Proteogenomic Analysis of Human Colon Cancer Reveals New Therapeutic Opportunities.” *Cell* vol. 177,4. 1035-1049.e19. doi:10.1016/j.cell.2019.03.030

Veigl, M L *et al.*, (1998) “Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 95,15. 8698-702. doi:10.1073/pnas.95.15.8698

Ventola C. L. (2017). “Cancer Immunotherapy, Part 1: Current Strategies and Agents”. *P &T: a peer-reviewed journal for formulary management*, 42(6), 375–383.

Viros, Amaya *et al.*, (2014) “Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53.” *Nature* vol. 511,7510, 478-482. doi:10.1038/nature13298

Wallis, Christopher J D *et al.*, (2019). “Association of Patient Sex With Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors and Overall Survival in Advanced Cancers: A Systematic Review and Meta-analysis.” *JAMA oncology* vol. 5,4. 529-536. doi:10.1001/jamaoncol.2018.5904

Walther, Axel *et al.*, (2009). “Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer.” *Nature reviews. Cancer* vol. 9,7. 489-99. doi:10.1038/nrc2645

Wang, Zhengyi, and Wu, Xiaoying (2020) “Study and analysis of antitumor resistance mechanism of PD1/PD-L1 immune checkpoint blocker.” *Cancer medicine* vol. 9,21. 8086-8121. doi:10.1002/cam4.3410

Wculek, Stefanie K *et al.* (2020) “Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy.” *Nature reviews. Immunology* vol. 20,1. 7-24. doi:10.1038/s41577-019-0210-

z

- Weber, Jeffrey *et al.*, (2016) “Phase I/II Study of Metastatic Melanoma Patients Treated with Nivolumab Who Had Progressed after Ipilimumab.” *Cancer immunology research* vol. 4,4, 345-53. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0193
- Weber, Rebekka *et al.*, (2018) “Myeloid-Derived Suppressor Cells Hinder the Anti-Cancer Activity of Immune Checkpoint Inhibitors.” *Frontiers in immunology* vol. 9 1310. doi:10.3389/fimmu.2018.01310
- Wei, Spencer C *et al.* (2017) “Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade.” *Cell* vol. 170,6. 1120-1133.e17. doi:10.1016/j.cell.2017.07.024
- Weisenberger, Daniel J *et al.*, (2006). “CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer.” *Nature genetics* vol. 38,7. 787-93. doi:10.1038/ng1834
- Welsh, C. F. *et al.* (2001) “Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho”, *Nature Cell Biology*, 3(11), pp. 950–957. doi: 10.1038/ncb1101-950.
- West, Howard *et al.*, (2019). “Atezolizumab in combination with carboplatin plus nab-paclitaxel chemotherapy compared with chemotherapy alone as first-line treatment for metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer (IMpower130): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial.” *The Lancet. Oncology* vol. 20,7. 924-937. doi:10.1016/S1470-2045(19)30167-6
- Wickham H. (2021). "tidyr: Tidy Messy Data. R package version 1.1.3." <https://CRAN.R-project.org/package=tidyr>
- Wickham H. *et al.*, (2019). “Welcome to the tidyverse.” *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. doi: 10.21105/joss.01686.
- Wickham H. *et al.*, (2021). "dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.0.5." <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>
- Wickham H., (2016). “ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4” <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- Willemijn, Theelen S M E *et al.*, (2020). “Pembrolizumab with or without radiotherapy for metastatic non-small-cell lung cancer: a pooled analysis of two randomised trials.” *The Lancet. Respiratory medicine* vol. 9,5. 467-475. doi:10.1016/S2213-2600(20)30391-X

- Willsmore, Zena N *et al.* (2021) “B Cells in Patients With Melanoma: Implications for Treatment With Checkpoint Inhibitor Antibodies.” *Frontiers in immunology* vol. 11 622442. doi:10.3389/fimmu.2020.622442
- Willsmore, Zena N *et al.*, (2021) “Combined anti-PD-1 and anti-CTLA-4 checkpoint blockade: Treatment of melanoma and immune mechanisms of action.” *European journal of immunology* vol. 51,3, 544-556. doi:10.1002/eji.202048747
- Wilmott, James S *et al.*, (2012) “Selective BRAF inhibitors induce marked T-cell infiltration into human metastatic melanoma.” *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* vol. 18,5, 1386-94. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2479
- Wood, Laura D *et al.* (2007). “The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 318,5853. 1108-13. doi:10.1126/science.1145720
- Wu, Guanming, and Haw, Robin (2017) “Functional Interaction Network Construction and Analysis for Disease Discovery.” *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 1558: 235-253. doi:10.1007/978-1-4939-6783-4_11
- Wu, H., Goel, V. and Haluska, F. G. (2003) “PTEN signalling pathways in melanoma”, *Oncogene*, pp. 3113–3122. doi: 10.1038/sj.onc.1206451.
- Xu, Yan-Ping *et al.* (2019) “Tumor suppressor TET2 promotes cancer immunity and immunotherapy efficacy.” *The Journal of clinical investigation* vol. 129,10 4316-4331. doi:10.1172/JCI129317
- Yaeger, Rona *et al.*, (2018). “Clinical Sequencing Defines the Genomic Landscape of Metastatic Colorectal Cancer.” *Cancer cell* vol. 33,1. 125-136.e3. doi:10.1016/j.ccell.2017.12.004
- Yang, Fang *et al.*, (2020). “Association of Sex, Age, and Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status With Survival Benefit of Cancer Immunotherapy in Randomized Clinical Trials: A Systematic Review and Meta-analysis.” *JAMA network open* vol. 3,8 e2012534. 3. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.12534
- Yang, Yi *et al.*, (2020). "A Pan-cancer analysis of GPR183 correlated with tumor immunity". *Research Square* doi: 10.21203/rs.3.rs-42118/v1

- Yao, Yongli *et al.* (2019) “Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy.” *Frontiers in immunology* vol. 10 792. doi:10.3389/fimmu.2019.00792
- Yarchoan, Mark *et al.*, (2017) “Targeting neoantigens to augment antitumour immunity.” *Nature reviews. Cancer* vol. 17,4, 209-222. doi:10.1038/nrc.2016.154
- Ye, Youqiong *et al.*, (2020). “Sex-associated molecular differences for cancer immunotherapy.” *Nature communications* vol. 11,1 1779. 14. doi:10.1038/s41467-020-15679-x
- Zappasodi, Roberta *et al.*, (2018) “Non-conventional Inhibitory CD4⁺Foxp3⁺PD-1^{hi} T Cells as a Biomarker of Immune Checkpoint Blockade Activity.” *Cancer cell* vol. 33,6, 1017-1032.e7. doi:10.1016/j.ccell.2018.05.009
- Zaretsky, Jesse M *et al.*, (2016) “Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma.” *The New England journal of medicine* vol. 375,9, 819-29. doi:10.1056/NEJMoa1604958
- Zhou, Jiawei *et al.* (2020) “Tumor-Associated Macrophages: Recent Insights and Therapies.” *Frontiers in oncology* vol. 10 188. doi:10.3389/fonc.2020.00188
- Zitvogel, Laurence *et al.*, (2018) “The microbiome in cancer immunotherapy: Diagnostic tools and therapeutic strategies.” *Science (New York, N.Y.)* vol. 359,6382, 1366-1370. doi:10.1126/science.aar6918