



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: ONCOLOGÍA

TÍTULO DE TESIS DOCTORAL:

**LIGANDOS DE NOTCH EN CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS
CIRCULANTES COMO BIOMARCADORES DE RESPUESTA A ANTICUERPOS
ANTI-PD1/PD-L1 EN CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO AVANZADO**

Doctorando:

JOSE GARCÍA SÁNCHEZ

Directores:

Dr. Agustín Lahoz Rodríguez

Dr. Óscar José Juan Vidal

Tutor:

Julián Carretero Asunción

Valencia, Octubre de 2024

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

Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: Lahoz Rodríguez, Agustín N.I.F. 07566860K,

Departamento/Instituto: Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión. Centro: IIS Hospital La Fe.

2.- Apellidos y nombre: Juan Vidal, Óscar Juan N.I.F. 25395444V,

Departamento/Instituto: Servicio de Oncología Médica. Centro: Hospital Universitari i Politècnic La Fe.

Tutor.

Apellidos y nombre. Carretero Asunción, Julián .N.I.F. 52686299S,

Departamento/Instituto: Departamento de Fisiología. Centro: Facultad de Farmàcia. Universidad de Valencia.

Directores y tutor, respectivamente, de la tesis doctoral: "Ligandos de Notch en Células Mieloides Supresoras Circulantes como biomarcadores de respuesta a Anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 en Cáncer de Pulmón No Microcítico avanzado" de D. Jose García Sánchez, estudiante del Programa de Doctorado **3139 Medicina** (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe favorable para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: Valencia, 15 de Octubre de 2024.

Fdo.: Agustín Lahoz Rodríguez

AGUSTIN
GERARDO
LAHOZ
RODRIGUEZ
Firmado digitalmente por AGUSTIN GERARDO LAHOZ RODRIGUEZ
Fecha: 2024.10.15
20:34:17 +02'00'

Director

Fdo.: Óscar José Juan Vidal

OSCAR
JOSE JUAN
VIDAL
Firmado digitalmente por OSCAR JOSE JUAN VIDAL
Fecha: 2024.10.17
07:56:26 +02'00'

Director

Fdo.: Julián Carretero Asunción

JULIAN
CARRETERO
ASUNCION
Firmado digitalmente por JULIAN CARRETERO ASUNCION
Fecha: 2024.10.15
21:59:42 +02'00'

Tutor

**ESCUELA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

DEDICATORIAS

A mi familia, a mis padres y hermanos, por apoyarme incondicionalmente en todo lo que me he propuesto a lo largo de mi vida y ayudarme a conseguirlo. Gracias por todo lo que me habéis dado y, sin lugar a dudas, sin vosotros no hubiese sido posible alcanzar mis metas.

A mis hijas, Claudia y Olivia, el motor de mi vida, quiero transmitirles que todo lo que uno se propone puede conseguirlo con dedicación y constancia y que, al final, todo esfuerzo tiene su recompensa.

A mí mismo, porque aunque haya pasado por momentos difíciles en los que hubiese tirado la toalla, finalmente he sacado fuerzas y motivación para seguir adelante y finalizar este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Llegar hasta aquí no ha sido un camino fácil. Ha requerido un enorme esfuerzo por mi parte y por todo el equipo de magníficos profesionales del que tengo la suerte de rodearme, sin ellos, este trabajo no hubiese sido posible. La investigación siempre ha despertado en mí un interés especial y esa fue la motivación principal que hizo embarcarme en este proyecto. Con ello pretendo aportar mi granito de arena a la investigación en cáncer de pulmón con el objetivo de conocer mejor al enemigo al que nos enfrentamos y ayudar en su lucha a tantos y tantos pacientes diagnosticados cada día. Llegados a este punto, me gustaría dedicar unas palabras de agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido, en mayor o menor medida, a la consecución de esta meta.

En primer lugar quiero agradecer a los pacientes, a sus familiares y cuidadores que hayan participado de forma altruista y sin dudarle en este proyecto con la mera ilusión de poder ayudar, en el futuro, a otras personas. De su lucha contra la enfermedad y su capacidad de superación aprendo todos los días en mi profesión.

A mis directores de tesis, Agustín Lahoz y Óscar Juan, y a mi tutor, Julián Carretero, por darme la oportunidad de poner en marcha este proyecto cuando ya pensaba que iba a quedar archivado en un cajón y por motivarme a seguir adelante todos estos años. A Marta Benet y a todo el equipo de la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión del Hospital La Fe. Sin lugar a dudas Marta ha sido la figura clave para que esta tesis doctoral haya llegado a buen puerto. Gracias por tu disponibilidad a cualquier hora del día, por tu motivación constante y por contagiarme tu pasión por la investigación.

A Antonio Llombart, por transmitirme su enorme capacidad de trabajo, esfuerzo y dedicación a la investigación en oncología. Es una auténtica satisfacción crecer a su lado como profesional y formar parte de su equipo de trabajo en el Hospital Arnau de Vilanova de Valencia que se ha convertido en una verdadera familia para mí. Agradecer especialmente a mis compañeros, Javier Garde y Nuria Piera, su implicación en este proyecto y su apoyo durante todos estos años, no sólo en el ámbito profesional sino también personal y a Leonor Fernández por impregnarme de su amplio conocimiento en el campo de la investigación y su interés y ayuda en este proyecto. No puedo tampoco dejar de recordar al resto del equipo del que formo parte, Juan Manuel Campos, Vicente Carañana, Ana Albert, Enrique Cabrera, Jose Muñoz, Sara Marín, Tamara Fenollosa, Paula Llor, Neus Cuadra, Ana Fortea y auxiliares de consultas, así como, a todos los residentes de Oncología que se han formado en nuestro servicio a lo largo de todos estos años y han colaborado con el proyecto.

Al equipo humano que forma y que ha formado parte en estos años la Unidad de Ensayos Clínicos de Oncología y del Hospital de Día del Hospital Arnau de Vilanova, especialmente a Ángela Real, Mara Osacar, María Portero y Andrés Moret, por hacer que todo el engranaje y logística de la obtención, procesamiento y envío de las muestras del estudio funcionara cada día a la perfección.

A Alfredo Sánchez, María de Julián, David Lorente, María Fonfría y resto de compañeros del Hospital Provincial de Castellón que han colaborado en el proyecto reclutando pacientes durante todo este tiempo. Gracias por hacer las cosas tan sencillas.

Al Dr. Jose Ferrando, Maribel y Cristina, del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Arnau de Vilanova por su inestimable colaboración en la preparación de las muestras de tejido para el estudio.

Finalmente, tengo que agradecer a Roche SA el soporte económico proporcionado para la financiación de este trabajo de investigación.

**GRACIAS a todos, sin cada uno de vosotros
este proyecto no hubiese salido adelante.**

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	14
1. INMUNOTERAPIA EN CÁNCER DE PULMÓN	14
1.1. Cáncer de Pulmón No Microcítico avanzado e Inmunoncología	14
1.2. Puntos de control inmunológicos	15
1.3. Anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 en monoterapia	15
1.4. Anticuerpos anti-PD1/PD-L1 en combinación	16
2. BIOMARCADORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA A INMUNOTERAPIA	17
2.1. Biomarcadores basados en tejido	18
2.2. Biopsia líquida y biomarcadores basados en sangre	19
2.3. Microbiota	22
3. LA VÍA NOTCH COMO POTENCIAL BIOMARCADOR EN INMUNOTERAPIA: IMPLICACIÓN DE VÍA NOTCH EN EL SISTEMA INMUNE	23
3.1. LA SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE LA VÍA NOTCH	23
3.1.1. Estructura de la vía Notch: Receptores y ligandos de la vía Notch	24
3.1.2. Activación de la vía Notch mediada por ligandos	25
3.1.3. Genes diana de la vía Notch	26
3.1.4. Activación de la vía Notch no canónica	27
3.1.5. Efecto biológico de la señalización de Notch	28
3.2. LA VÍA NOTCH EN LA HOMEOSTASIS DEL SISTEMA INMUNE	28
3.2.1. Células mieloides	29
3.2.2. Células linfoides	33
4. MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL MEDIADOS POR LA SEÑALIZACIÓN DE LA VÍA NOTCH	39
4.1. INDUCCIÓN DE INMUNOSUPRESIÓN MEDIADA POR LA VÍA NOTCH	40
4.1.1. Células Derivadas Mieloides Supresoras	41
4.1.2. Macrófagos Asociados a Tumor	47
4.1.3. Células T reguladoras	49
4.2. PROMOCIÓN DE UN MICROAMBIENTE PRO-TUMORAL	50
4.2.1. Fibroblastos Asociados a Cáncer	51
4.2.2. Neutrófilos Asociados a Tumor	51
4.2.3. Angiogénesis tumoral	51
4.2.4. Transición Epitelio-Mesénquima y desarrollo de metástasis	52
4.3. DISFUNCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL ADAPTATIVA	53
4.3.1. Células Dendríticas	53
4.3.2. Linfocitos T	54
4.3.3. Puntos de control inmunes	56
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	58
1. HIPÓTESIS	58
2. OBJETIVOS	59
2.1. Objetivos primarios	59
2.2. Objetivos Secundarios	59
III. MATERIAL Y MÉTODOS	60
1. DISEÑO DEL ESTUDIO	60
2. POBLACIÓN DEL ESTUDIO	61
2.1. Criterios de Inclusión específicos:	61

3. TAMAÑO MUESTRAL	62
4. PLAN TERAPÉUTICO	63
5. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO	63
5.1. VARIABLES CLÍNICAS	64
5.2. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO	65
5.2.1. Metodología para obtención y procesamiento muestras en sangre	65
5.2.2. Metodología para obtención y procesamiento muestras en tejido	71
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	74
6.1. Análisis de los datos clínicos	74
6.2. Análisis de las poblaciones celulares y variables génicas en la población de MDSCs	74
7. ASPECTOS ÉTICOS	75
7.1. Consideraciones Generales	75
7.2. Hoja de Información y Formulario de Consentimiento Informado	75
7.3. Confidencialidad de los Datos	76
7.4. Comité Ético de Investigación con medicamentos	76
IV. RESULTADOS	77
1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES	77
2. DATOS DE EFICACIA	80
3. ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES CLÍNICAS Y SUPERVIVENCIA	81
4. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES CELULARES INMUNES	84
4.1. Asociación entre poblaciones celulares circulantes y respuesta	86
4.2. Asociación entre poblaciones celulares mieloides circulantes y supervivencia	86
4.3. Asociación entre poblaciones celulares linfoides circulantes y supervivencia	87
4.4. Análisis multivariante regresión de COX	88
4.5. Asociación entre MDSCs y RNL	90
5. RESULTADOS ANÁLISIS DE VARIABLES GÉNICAS EN MDSCs	93
5.1. Asociación entre expresión de genes en MDSCs y respuesta	94
5.2. Asociación entre expresión de genes en MDSCs y supervivencia	95
5.3. Combinación de genes de la vía Notch en MDSCs y supervivencia	97
5.4. Evolución dinámica expresión de JAG1 en MDSCs y supervivencia	99
5.5. Análisis multivariante regresión de COX	99
5.6. Análisis multivariante de COX conjunto:	101
5.7. Correlación entre genes vía Notch, PD-L1, ARG1 e IDO1 en MDSCs	102
6. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS VARIABLES GÉNICAS EN TEJIDO	103
6.1. Asociación entre expresión de genes en tejido y respuesta	103
V. DISCUSIÓN	104
1. ANÁLISIS DE POBLACIONES CELULARES CIRCULANTES	104
1.1. RNL como biomarcador pronóstico y predictivo a ICIs en CPNMa	104
1.2. MDSCs como biomarcador pronóstico y predictivo a ICIs en CNMPa	105
1.2.1. MDSCs como biomarcador pronóstico	105
1.2.2. MDSCs como biomarcador predictivo de respuesta a ICIs en CPNMa	106
1.3. Correlación entre RNL y MDSCs	109
1.4. Treg como biomarcador pronóstico y predictivo a ICIs en CPNMa	111
1.5. IrAEs como factor predictivo de respuesta a ICIs en CPNMa	112

2. ANÁLISIS DE VARIABLES GÉNICAS EN MDSCs	113
2.1. LA EXPRESIÓN DE LIGANDOS DE NOTCH JAGGED EN MDSCs CIRCULANTES Y EN EL MAT PREDICEN RESISTENCIA A INMUNOTERAPIA EN CPNMa	114
2.1.1. Expresión de <i>Jagged1</i> en MAT y pronóstico	114
2.1.2. Expresión de <i>JAG1</i> e inmuno-evasión en el MAT	114
2.1.3. Expresión de <i>JAG1</i> en células tumorales y resistencia a antineoplásicos	118
2.2. LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA NOTCH EN MDSCs CIRCULANTES Y EN EL MAT PREDICEN RESISTENCIA AL TRATAMIENTO CON ICIs Y PEOR SUPERVIVENCIA	120
2.2.1. La activación de la señalización Notch en MDSCs en cáncer se asocia a un fenotipo M-MDSCs con mayor capacidad de inmunosupresión	120
2.2.2. La activación de la señalización Notch en el MAT se asocia a infiltración de células inmunosupresoras y progresión tumoral	122
2.2.3. La activación de la vía Notch en MAT y respuesta a ICIs en cáncer	124
2.3. LA EXPRESIÓN DE IDO1 EN MDSCs CIRCULANTES Y EN EL MAT SE ASOCIA CON LA RESPUESTA Y SUPERVIVENCIA A TERAPIA BASADA EN ICIs	125
2.3.1. Expresión de <i>IDO1</i> en MAT y pronóstico	126
2.3.2. Expresión de <i>IDO1</i> en MAT e inmuno-evasión	126
2.3.3. Expresión de <i>IDO</i> en células inmunes circulantes y respuesta a ICIs	127
2.4. POSIBLES APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA MODULACIÓN DE LA VÍA NOTCH EN INMUNOTERAPIA	128
2.4.1. Anticuerpos anti- <i>Jagged</i>	128
2.4.2. Inhibidores de la señalización Notch en MDSCs	130
2.5. Fortalezas y limitaciones del estudio	131
VI. CONCLUSIONES	133
I. Análisis de las poblaciones celulares inmunes	133
II. Análisis de la expresión de genes en MDSCs y tejido	133
VII. BIBLIOGRAFÍA	135
VIII. ANEXOS	156
IX. ACTIVIDADES CIENTÍFICAS RELACIONADAS	175
BECAS	175
PREMIOS	176
COMUNICACIONES A CONGRESOS	177

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

AEMPS	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios
CDp	Células Dendríticas plasmocitoides
CDs	Células Dendríticas
CLI	Células linfoides innatas
CPA	Células Presentadoras de Antígenos
CPNMa	Carcinoma de Pulmón No Microcítico avanzado
CSCs	<i>Cancer Stem-like Cells</i>
CTCAE-NCI	Criterios de toxicidad del <i>National Cancer Institute</i> , versión 5
CTCs	Células Tumorales Circulantes
ctDNA	DNA tumoral circulante
CTLA-4	Molécula 4 asociada a linfocitos T citotóxicos
DAMPs	Patrones Moleculares asociados a Daño
DICN	Dominio IntraCelular de Notch
DII	<i>Delta-like</i>
DSL	Dominio <i>Delta/Serrate/Lag-2</i>
EE	Enfermedad Estable
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
Hes	<i>Hairy and Enhancer of Split</i>
Hey	<i>Hairy and Enhancer of Split with YRPW motif</i>
HPV	Virus del Papiloma Humano
HSCs	Progenitores hematopoyéticos/stem cells mieloides, del inglés <i>Hematopoietic Stem Cells</i>
ICIs	Anticuerpos monoclonales inhibidores de puntos de control inmune, del inglés <i>Immune Checkpoint Inhibitors</i>
IDO	2,3-dioxigenasa indolamina
IHQ	InmunoHistoQuímica
IO	InmunOncología
irEAs	Efectos Adversos inmuno-relacionados
ITK	Inhibidores Tirosín Kinasa
Jag	<i>Jagged</i>
Kyn	Quinurenina
LPS	Lipopolisacáridos
Maml	Mastermind-like
MAT	MicroAmbiente Tumoral
MDSCs	Células supresoras derivadas de células mieloides, del inglés <i>Myeloid-derived Suppressor Cells</i>
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
miRNAs	microARN
MMPs	Metaloproteinasas de matriz

MMRD	Deficiencia en el sistema de reparación <i>MisMatch Repair</i>
mSG	mediana de Supervivencia Global
MSI	Inestabilidad de microsatélites, del inglés <i>MicroSatellite Instability</i>
mSLP	mediana de Supervivencia Libre de Progresión
NK	Células asesinas naturales, del inglés <i>Natural Killers</i>
NO	Óxido nítrico
NRARP	<i>Notch-regulated ankyrin repeat protein</i>
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PBMCs	Células mononucleares en sangre periférica, del inglés <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PD-1	Receptor de muerte celular programada 1
PD-L1	Ligando de muerte celular programada 1
PE	Progresión de Enfermedad
PEST	Dominio C-terminal de motivos ricos en prolina/ácido glutámico/serina/treonina
QT	Quimioterapia
RAM	<i>RBP-J-Association Module</i>
RBP-Jk	<i>Recombining Binding Protein suppressor of hairless</i>
RC	Respuesta Completa
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
RNL	Ratio Neutrófilo/Linfocito
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP	Respuesta Parcial
RPL	Ratio Plaqueta/Linfocito
SG	Supervivencia Global
SLP	Supervivencia Libre de Progresión
TCGA	Atlas del Genoma del Cáncer, del inglés <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TEM	Transición Epitelio-Mesénquima
TILs	Linfocitos infiltrantes de tumores, del inglés <i>Tumor-Infiltrating Lymphocytes</i>
TMB	Carga de mutaciones somáticas, del inglés <i>Tumor Mutational Burden</i>
TPS	Expresión de PD-L1 en célula tumoral
TRO	Tasa de Respuesta Objetiva
Trp	Triptófano
uPA	Uroquinasa activadora de plasminógeno

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Ligandos y receptores Notch</i>	25
<i>Figura 2. Señalización a través de la vía Notch mediada por ligando</i>	26
<i>Figura 3. Señalización a través de la vía Notch no mediada por ligando</i>	27
<i>Figura 4. Regulación de la diferenciación de células mieloides mediada por Notch</i>	29
<i>Figura 5. Regulación respuesta por células T y expresión de ligandos Notch en CDs</i>	31
<i>Figura 6. Implicación de la vía Notch en el desarrollo y activación de macrófagos</i>	33
<i>Figura 7. Vía Notch en la diferenciación y maduración de la célula T</i>	34
<i>Figura 8. Implicación de la vía Notch en respuesta de células T mediada por CPAs</i>	36
<i>Figura 9. Implicación de la vía Notch en la activación y función del linfocito T CD8</i>	36
<i>Figura 10. Implicación de la vía Notch en la diferenciación del linfocito B</i>	37
<i>Figura 11. Implicación de la vía Notch en el desarrollo y activación de células NK</i>	38
<i>Figura 12. Implicación de la vía Notch en el MAT y evasión en la respuesta inmune</i>	39
<i>Figura 13. Expresión de marcadores de superficie en poblaciones mieloides y MDSCs</i>	42
<i>Figura 14. Generación, expansión, reclutamiento y activación de MDSCs</i>	43
<i>Figura 15. Diferenciación de las células mieloides en el MAT mediada por Notch</i>	45
<i>Figura 16. Implicación de la vía Notch en la activación del linfocito T CD8+</i>	57
<i>Figura 18. Inmunofenotipado de PBMCs y caracterización de poblaciones celulares</i>	67
<i>Figura 19. Esquema del protocolo de aislamiento de MDSCs de sangre periférica</i>	68
<i>Figura 20. Cartucho empleado para la formación de gotas</i>	72
<i>Figura 23. Proporciones de poblaciones celulares inmunes circulantes basales</i>	85
<i>Figura 25. Curvas SLP y SG en función del porcentaje de PMN-MDSCs circulantes</i>	87
<i>Figura 26. Curvas de SLP y SG en función del porcentaje de Treg circulantes</i>	87
<i>Figura 27. Curvas SLP y SG del RNL dicotomizado por el punto corte de la mediana</i>	90
<i>Figura 28. Correlación entre MDSCs y subpoblaciones con RNL/RPL</i>	91
<i>Figura 32. Expresión de genes Notch en MDSCs en HD y pacientes con CPNMa</i>	93
<i>Figura 33. Correlación entre expresión de genes vía Notch en MDSCs y respuesta</i>	94
<i>Figura 34. Correlación entre expresión de PD-L1 e IDO1 en MDSCs y respuesta</i>	94
<i>Figura 35. Curvas de SLP en función de expresión de JAG1 y HES1 en MDSCs</i>	95
<i>Figura 36. Curvas de SG en función de expresión de NOTCH1 y PD-L1 en MDSCs</i>	96
<i>Figura 37. Curvas de SG en función del nivel de expresión de IDO1 en MDSCs</i>	96
<i>Figura 38. Combinación de expresión entre diferentes genes vía Notch y SLP/SG</i>	98
<i>Figura 39. Curvas SLP y SG en función de expresión JAG1 en MDSCs en basal y E1</i>	99
<i>Figura 40. Correlación entre los niveles de expresión de genes Notch en MDSCs</i>	102
<i>Figura 41. Correlación entre expresión genes Notch e IDO1 en tejido y respuesta</i>	103
<i>Figura 42. Implicación de Jag1 en mecanismos de inmuno-evasión en cáncer</i>	115

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Cálculo tamaño muestral y potencia</i>	62
<i>Tabla 2. Procedimientos del estudio</i>	63
<i>Tabla 3. Panel de Anticuerpos para inmunofenotipado de MDSCs y subpoblaciones</i>	66
<i>Tabla 4. Panel Anticuerpos para caracterización de subpoblaciones de células T</i>	66
<i>Tabla 5. Lista de reactivos para la PCR</i>	69
<i>Tabla 6. Lista de primers utilizados para ensayos de RT-PCR cuantitativa</i>	70
<i>Tabla 7. Condiciones requeridas para la RT-PCR cuantitativa</i>	70
<i>Tabla 8. Lista de reactivos para la ddPCR</i>	72
<i>Tabla 9. Lista de primers para la ddPCR</i>	72
<i>Tabla 10. Condiciones programa ddPCR</i>	73
<i>Tabla 11. Características basales de los pacientes (N = 105)</i>	78
<i>Tabla 12. Grupos en función de respuesta RECIST (N = 95)</i>	80
<i>Tabla 13. Asociación entre variables clínicas y resultados de supervivencia</i>	82
<i>Tabla 14. Proporciones de poblaciones celulares inmunes circulantes basales</i>	84
<i>Tabla 15. Análisis univariante para SLP y SG de las poblaciones celulares inmunes</i>	88
<i>Tabla 16. Resumen análisis multivariante SLP de variables clínicas y citométricas</i>	89
<i>Tabla 17. Resumen análisis multivariante SG de variables clínicas y citométricas</i>	89
<i>Tabla 18. Medianas de expresión de genes Notch, PD-L1, ARG1 e IDO1 en MDSCs</i>	93
<i>Tabla 19. Análisis univariante Kaplan-Meier para SLP y SG</i>	97
<i>Tabla 20. Resumen análisis multivariante del modelo de Cox para SLP</i>	100
<i>Tabla 21. Resumen análisis multivariante del modelo de Cox para SG</i>	100
<i>Tabla 22. Resumen análisis multivariante conjunto del modelo de Cox para SG</i>	101

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Hoja de Información al Paciente (HIP) _____	156
ANEXO 2. Consentimiento Informado _____	159
ANEXO 3. Informe del CEIm Hospital Arnau de Vilanova _____	165
ANEXO 4. Informe del CEIm Hospital La Fe _____	167
ANEXO 5. Clasificación estudio clínico por la AEMPS _____	169
ANEXO 6. Resolución del Comité Autonómico de Estudios Postautorización Observacionales Prospectivos con Medicamentos de la Comunidad Valenciana ____	172

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INMUNOTERAPIA EN CÁNCER DE PULMÓN

1.1. Cáncer de Pulmón No Microcítico avanzado e Inmunoncología

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte relacionada con cáncer en todo el mundo. Con casi 2,5 millones de nuevos casos y 1,8 millones de muertes en 2022, representa aproximadamente 1 de cada 10 (12,4%) cánceres diagnosticados y 1 de cada 5 (18,7%) muertes por cáncer ⁽¹⁾. Este **mal pronóstico** es consecuencia de la agresividad biológica de la enfermedad, la alta tendencia a la diseminación temprana y a una larga latencia asintomática. Por estas razones, la mayoría de los pacientes se presentan con enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico y menos del 20% están vivos a los 5 años ⁽²⁾. Este pronóstico tan desfavorable hace que el desarrollo de terapias activas en esta patología sea una prioridad médica.

El **tratamiento del Cáncer de Pulmón No Microcítico avanzado (CPNMa)** depende de la histología y perfil molecular del tumor. El CPNM representa del 80 al 85% de los casos e incluye dos subtipos histológicos principales: carcinoma de células escamosas y carcinoma no escamoso, fundamentalmente adenocarcinoma ⁽³⁾. Un subconjunto de CPNMa alberga alteraciones definidas molecularmente que son dianas terapéuticas para inhibidores de tirosina quinasa (ITK), y varios estudios han demostrado una mayor eficacia y un mejor perfil de seguridad para estos fármacos que la quimioterapia (QT). Sin embargo, la mayoría de los pacientes tienen una enfermedad sin una alteración diana por lo que no pueden beneficiarse de las terapias dirigidas y, en estos casos, la QT muestra un efecto limitado en las tasas de supervivencia. En este sentido, el desarrollo de la inmunoterapia contra el cáncer ha cambiado drásticamente el panorama del tratamiento y ha mejorado el pronóstico de estos pacientes. Aunque todavía es difícil estimar con precisión el beneficio de la supervivencia global (SG), algunos estudios han informado de un aumento de las tasas de supervivencia hasta 5 veces mayor que las obtenidas con QT ⁽⁴⁾. Sin embargo, solo una minoría de pacientes logra una respuesta prolongada con inmunoterapia, mientras que, la mayoría no responde o desarrolla una progresión de enfermedad durante el tratamiento.

En la actualidad no se dispone de ningún **biomarcador** totalmente fiable que permita seleccionar a los pacientes con CPNMa que van a obtener un mayor beneficio con inmunoterapia. Por tanto, es prioritario encontrar y validar nuevos biomarcadores predictivos más sensibles y específicos y, para ello, es necesario profundizar en el conocimiento de los procesos que pone en marcha la célula neoplásica, tanto a nivel sistémico como en el microambiente tumoral (MAT), que le permiten evadir al sistema de inmuno-vigilancia y progresar en su crecimiento, invasión y diseminación.

1.2. Puntos de control inmunológicos

La **inmunooncología** (IO) moderna consiste en diferentes estrategias, destinadas a movilizar y activar el sistema inmunitario para reconocer y destruir a las células cancerosas ⁽⁵⁾. En la práctica clínica actual, el principal enfoque terapéutico es el uso de anticuerpos monoclonales que actúan sobre moduladores clave en la respuesta inmune de las células T. Estas moléculas, también conocidas como puntos de control inmunitario, están presentes en las células T, las células presentadoras de antígenos (CPAs) y las células tumorales. Su interacción permite poner en marcha vías de señalización inmune inhibitoras o activadoras. Los puntos de control más relevantes son las vías inhibitoras, tales como, **la molécula 4 asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), el receptor de muerte celular programada 1 (PD-1) y el ligando de muerte celular programada 1 (PD-L1)** ⁽⁶⁾. Para los pacientes con CPNMa, los mayores éxitos se han logrado con anticuerpos monoclonales inhibidores del eje PD-1/PD-L1 (ICIs). Los anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 han demostrado un beneficio significativo sobre la QT, incluyendo un perfil de seguridad favorable, mayor actividad antitumoral, inducción de respuestas duraderas y mejor supervivencia. Varios ensayos han evaluado su eficacia, tanto en monoterapia como en combinación con otros agentes, y han llevado a modificar los algoritmos de tratamiento. Actualmente, un anticuerpo anti-CTLA4 (ipilimumab) y varios anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 (nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab y cemiplimab), han sido aprobados por las agencias reguladoras FDA y EMA para el tratamiento del CPNMa tanto en primera línea de tratamiento como tras progresión a QT basada en platino ⁽⁷⁾.

1.3. Anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 en monoterapia

Nivolumab es un anticuerpo monoclonal IgG4 completamente humano contra PD-1. En dos grandes ensayos fase III, CheckMate 017 ⁽⁸⁾ y CheckMate 057 ⁽⁹⁾, nivolumab mostró una mejor supervivencia frente a docetaxel tras progresión a QT de primera línea basada en platino en CPNMa escamoso y no escamoso, respectivamente. En base a estos resultados, nivolumab fue el primer ICI en recibir la aprobación de la FDA como **tratamiento de segunda línea** para la enfermedad avanzada. Posteriormente, otros dos ICIs confirmaron la superioridad de la inmunoterapia sobre docetaxel en pacientes pre-tratados con QT. **Atezolizumab** es un anticuerpo monoclonal que se une a PD-L1. En el ensayo OAK ⁽¹⁰⁾, los pacientes tratados previamente con QT se aleatorizaron para recibir atezolizumab o docetaxel. La SG fue significativamente mayor en el grupo de atezolizumab en comparación con el grupo de docetaxel. Atezolizumab fue aprobado como terapia de segunda línea independientemente del nivel de expresión de PD-L1 medido por inmunohistoquímica (IHQ) en célula tumoral (TPS). **Pembrolizumab**, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-PD-1, fue el primer ICI que mostró una eficacia diferenciada basada en la expresión de PD-L1. El ensayo Keynote 010 ⁽¹¹⁾ se realizó en

pacientes con CPNMa previamente tratados y expresión de PD-L1 en al menos el 1% de las células tumorales. Pembrolizumab demostró mejorar la SG en comparación con docetaxel en la población total, pero con beneficio significativo, especialmente en pacientes con al menos una expresión de PD-L1 del 50%.

En el contexto de la **primera línea de tratamiento**, el ensayo Keynote 024 ⁽¹²⁾ exploró el tratamiento con **pembrolizumab** en pacientes con alta expresión de PD-L1 (TPS $\geq$ 50%). La inmunoterapia se asoció con una supervivencia libre de progresión (SLP) y una SG significativamente más prolongadas, y un mejor perfil de seguridad que la QT basada en platino. Estos resultados establecieron a pembrolizumab como una terapia estándar de primera línea en pacientes con alta expresión de PD-L1. Recientemente, otros dos anticuerpos anti-PD-1/PD-L1, **cemiplimab** y **atezolizumab**, han mostrado beneficios en supervivencia en el tratamiento de primera línea de CPNMa con expresión PD-L1 TPS $\geq$ 50% en comparación con la QT ^(13, 14).

1.4. Anticuerpos anti-PD1/PD-L1 en combinación

A pesar de los avances, solo una minoría de pacientes responde a ICIs en monoterapia. Para mejorar la eficacia, se ha explorado la combinación de QT e inmunoterapia con el objetivo de conseguir un aumento de las tasas de respuesta y prolongar aún más la SG. La combinación de ICIs con QT aprovecha la potencial sinergia de ambas estrategias terapéuticas a través de varios mecanismos ⁽¹⁵⁾. Varios ensayos clínicos aleatorizados han demostrado un beneficio en SG al asociar **ICIs a la QT basada en platino**. El estudio KEYNOTE-189 ⁽¹⁶⁾ es un ensayo fase 3 en pacientes no escamosos. Pembrolizumab en combinación con platino y pemetrexed mejoró la SLP y la SG. Las tasas de SG a los 5 años fueron del 19% en el grupo de pembrolizumab frente al 11% en el grupo de QT sola. El beneficio en SG fue independiente de la expresión de PD-L1. La superioridad de la estrategia de combinación también se demostró en CPNMa escamoso. En el ensayo KEYNOTE-407 ⁽¹⁷⁾, la adición de pembrolizumab a carboplatino y paclitaxel o nab-paclitaxel mejoró la mediana de SG. Las tasas de SG a los 5 años fueron del 18% y del 9,7% con pembrolizumab/QT y placebo/QT, respectivamente. EMPOWER-Lung 3 ⁽¹⁸⁾, un ensayo fase 3, comparó cemiplimab más QT con doblete de platino versus QT sola como tratamiento de primera línea para CPNMa, independientemente de histología y expresión de PD-L1. El ensayo cumplió con los criterios de eficacia de SG preestablecidos. Las combinaciones de anticuerpos anti-PD-L1 y dobletes de QT basados en platino también han demostrado en el ensayo fase III IM-power130 ⁽¹⁹⁾, la superioridad en términos de SLP y SG de atezolizumab en combinación con carboplatino y nab-paclitaxel en comparación con la QT sola como tratamiento de primera línea para la enfermedad metastásica no escamosa.

También se han explorado **combinaciones de ICIs**, especialmente **anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTL-4, con y sin QT**. Se ha descubierto que el bloqueo simultáneo de CTLA-4 y PD-1/PD-L1 da como resultado una respuesta inmune sinérgica y mejorada contra el cáncer. En comparación con la QT, muestra un beneficio en la supervivencia, especialmente en algunos subgrupos de pacientes. El ensayo fase II Checkmate 568 ⁽²⁰⁾ probó con éxito la eficacia y seguridad de nivolumab más ipilimumab como tratamiento de primera línea del CPNMa. El beneficio de supervivencia sobre la QT se confirmó en el ensayo CheckMate 227 ⁽²¹⁾ y fue independiente del nivel de expresión de PD-L1. Un ensayo más reciente fase 3 Checkmate 9LA ⁽²²⁾ exploró el efecto de nivolumab más ipilimumab combinado con dos ciclos de QT basada en platino en el entorno de primera línea para el CPNMa. La combinación QT-IO proporcionó una mejoría significativa en la SG y tuvo un perfil de seguridad favorable independientemente de la histología y del nivel de expresión de PD-L1.

En todos estos ensayos, el **beneficio en la SG se observó en todos los subgrupos de pacientes**, incluidos aquellos con expresión baja o negativa de PD-L1. Además, aunque la inmunoterapia añade efectos adversos inmuno-relacionados (irEAs) a las toxicidades relacionadas con la QT, los tratamientos combinados han mostrado perfiles de tolerancia aceptables. Por tanto, los **ICIs combinados con doblete QT basada en platino se han convertido en el estándar de tratamiento de primera línea para el CPNMa**. Sin embargo, los esquemas combinados sólo se han comparado con la QT exclusiva. No se ha realizado una comparación directa con ICIs como agentes únicos en pacientes con PD-L1 TPS $\geq 50\%$. Por lo tanto, la **monoterapia con anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 sigue siendo una opción de tratamiento apropiada en este contexto**.

2. BIOMARCADORES PREDICTIVOS DE RESPUESTA A INMUNOTERAPIA

Un gran número de células y moléculas participan en la interacción tumor-inmunidad. Se han investigado numerosos biomarcadores potenciales, incluido el MAT, los puntos de control inmunitarios, los neoantígenos del cáncer, la carga mutacional del tumor, la inflamación y múltiples componentes asociados al tumor que circulan en el torrente sanguíneo ⁽²³⁾. No obstante, solo unos pocos biomarcadores basados en el análisis del tejido tumoral, principalmente la **expresión de PD-L1** y la **carga de mutaciones somáticas** (TMB), ayudan a predecir la eficacia de los ICIs en pacientes con CPNMa. Sin embargo, se siguen explorando en la actualidad otros biomarcadores potenciales, tanto en muestras de tejido como en biopsias líquidas.

2.1. Biomarcadores basados en tejido

El principal biomarcador utilizado en la práctica clínica es la **expresión de PD-L1 en las células tumorales y/o células inmunitarias**, evaluada mediante tinción IHQ ⁽²⁴⁾. Varios ensayos prospectivos han demostrado su correlación con la eficacia del tratamiento anti-PD-1/PD-L1. La primera evidencia sólida proviene de los ensayos Keynote 010 y Keynote 024, que condujeron a la aprobación de pembrolizumab en el entorno de segunda línea para pacientes con PD-L1 $\geq 1\%$ y como tratamiento de primera línea para pacientes con expresión de PD-L1 $\geq 50\%$, respectivamente ^(11, 12). En general, la mayoría de los estudios muestran que la expresión de PD-L1 puede predecir la eficacia de los anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 cuando se utilizan como agente único ⁽²⁵⁾. Sin embargo, con el desarrollo de estrategias de combinación, su valor predictivo se ve significativamente disminuido. La combinación de QT e ICIs aporta una mejoría en la supervivencia independientemente de la expresión de PD-L1. Aunque la eficacia aumenta con niveles más altos de PD-L1, también se ha demostrado su beneficio en tumores PD-L1 negativos ⁽²⁶⁾. Si la expresión de PD-L1 es el mejor biomarcador para la inmunoterapia en CPNMa sigue siendo un tema de debate, ya que varios factores limitan su fiabilidad ⁽²⁷⁾. Los estudios han demostrado la heterogeneidad intra-tumoral de la expresión de PD-L1, que puede ser variable en una misma muestra de tumor y se puede modificar durante el tratamiento ⁽²⁸⁾. Además, los ensayos clínicos han utilizado varios puntos de corte y métodos de detección, lo que ha llevado a la necesidad de una estandarización de la técnica ⁽²⁹⁾.

En los últimos años, la **TMB** ha surgido como otro biomarcador para la inmunoterapia. Se define como el número total de mutaciones somáticas en una muestra tumoral. Un alto número de mutaciones da como resultado un mayor número de neoantígenos tumorales. Por lo tanto, TMB refleja la carga de neoantígenos y representa un marcador subrogado de la inmunogenicidad del cáncer ⁽³⁰⁾. La evidencia de TMB como biomarcador relacionado con el sistema inmunitario en CPNMa se origina principalmente a partir de análisis retrospectivos o de análisis de subgrupos de ensayos clínicos aleatorizados. Así, en el ensayo CheckMate 227 ⁽²¹⁾, una TMB alta (≥ 10 mutaciones por megabase) se asoció con una SLP más prolongada en pacientes que recibieron una combinación de nivolumab más ipilimumab en comparación con QT, pero no logró predecir la SG. Dos revisiones sistemáticas y metanálisis recientes han demostrado un beneficio clínico y de supervivencia de los ICIs en pacientes con TMB alta en comparación con aquellos con TMB baja ^(31, 32) pero se requieren más datos prospectivos. Además, no se ha demostrado una correlación entre TMB y expresión de PD-L1 y existen otros problemas que limitan su utilidad y validación. Por tanto, en la actualidad, no existe una estandarización entre plataformas para su determinación, y no hay consenso para definir TMB "alta" ya que se ha utilizado un valor de corte diferente en los diferentes ensayos clínicos ⁽³³⁾.

La **deficiencia en el sistema de reparación MisMatch Repair (MMRD)** y la **inestabilidad de microsatélites (MSI)** se han asociado con un aumento de TMB y pueden ser determinantes en la inmunogenicidad del tumor ⁽³⁴⁾. En consecuencia, algunos ensayos clínicos han estudiado su papel potencial como biomarcadores predictivos a inmunoterapia. Tenemos evidencia reciente de una alta tasa de respuesta y una mayor supervivencia con inmunoterapia en varios tumores sólidos como alta MSI y MMRD, lo que ha llevado a la primera aprobación de un agente anti-PD1 independiente del tejido/localización tumoral por parte de la FDA ⁽³⁵⁾. Sin embargo, MMRD y MSI son raros en cáncer de pulmón y están poco estudiados como biomarcadores potenciales del beneficio de ICIs en este contexto.

Uno de los campos más emergentes en biomarcadores relacionados con ICIs surge de la caracterización de las **poblaciones de células en el MAT**. Entre estas, los linfocitos infiltrantes de tumores (TILs) se han correlacionado con la eficacia de ICIs en varios tipos de cáncer, incluido el CPNMa ⁽³⁶⁾. Los altos niveles de TILs, particularmente de células T CD8+, reflejan una mayor respuesta inmune contra el cáncer y caracterizan el fenotipo inflamado, el denominado tumor "caliente". La categorización de los tumores en "calientes" y "fríos" a través de la identificación de biomarcadores tisulares podría ayudar a la selección de pacientes que tienen más probabilidades de beneficiarse de los ICIs ⁽³⁷⁾. Se ha definido una metodología denominada "Immunoscore" para medir el infiltrado de células T intra-tumorales y peri-tumorales y actualmente se está desarrollando un Immunoscore para pacientes con CPNM ⁽³⁸⁾.

2.2. Biopsia líquida y biomarcadores basados en sangre

La biopsia de tejido es el método estándar para el diagnóstico del cáncer, la clasificación histológica y el diagnóstico molecular. Sin embargo, requiere métodos invasivos para su realización, y las lesiones tumorales a veces son difíciles de biopsiar. Además, puede tener un papel limitado en el estudio de la evolución de la enfermedad y en su capacidad para capturar la heterogeneidad del tumor. Para superar estas limitaciones, la biopsia líquida se ha convertido en una oportunidad atractiva para el diagnóstico del cáncer. Es una herramienta no invasiva y consiste en analizar elementos asociados al cáncer en fluidos biológicos, como sangre, orina y saliva. Principalmente, la biopsia líquida basada en sangre es uno de los principales campos en la investigación de biomarcadores en ICIs. Permite el aislamiento y análisis de múltiples componentes derivados de tumores que circulan en el torrente sanguíneo, incluidas células tumorales circulantes (CTCs), células inmunitarias, ADN libre de células circulante (ctDNA), vesículas extracelulares y microARN (miRNAs) ⁽³⁹⁾.

Las **poblaciones de células inmunitarias periféricas** podrían reflejar la interacción entre el sistema inmunitario y el cáncer. Las células mononucleares en sangre periférica (PBMCs), el recuento absoluto de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos o monocitos, la ratio plaquetas/linfocitos (RPL) o la ratio neutrófilos/linfocitos (RNL) se han investigado como predictores de respuesta a la inmunoterapia en diferentes tumores sólidos ⁽⁴⁰⁾. En particular, varios estudios han informado que una RNL alta tiene un valor predictivo y pronóstico negativo. Dos meta-análisis recientes encontraron que una RNL elevada se asoció con una menor SLP y SG en pacientes con CPNMa tratados con anticuerpos PD-1/PD-L1 ^(41, 42). También se han explorado los cambios dinámicos en los linfocitos T, especialmente en las células T CD8+/PD1+, como un marcador para distinguir a los respondedores y no respondedores a inmunoterapia ⁽⁴³⁾. En los últimos años ha despertado especial interés como biomarcador potencial para la terapia con ICIs, un grupo de células inmaduras denominadas células supresoras derivadas de células mieloides (MDSCs) que se encuentran tanto en la sangre periférica como en MAT y ejercen una actividad inmunosupresora. En particular, contribuyen a alterar a las células T CD8+ y las células asesinas naturales (NK) a través de la secreción de citoquinas y la expresión de marcadores de superficie de tipo inhibitorio. Las MDSCs periféricas se han propuesto como predictores negativos de respuesta y factores pronósticos en varios tumores sólidos, pero existe todavía controversia de su papel en CPNMa ⁽⁴⁴⁾ y se requieren más estudios para aclarar el papel potencial de las MDSCs y sus subpoblaciones como biomarcadores relacionados con el sistema inmunitario.

La identificación del **ctDNA en sangre**, se basa en la detección del ADN circulante que liberan las células tumorales al torrente sanguíneo que puede ser aislado directamente a partir de una muestra de plasma ⁽⁴⁵⁾. En el contexto de la enfermedad tumoral, el uso de ctDNA es particularmente útil para pacientes en los que se han agotado las muestras de tejido tumoral ya que únicamente con una muestra de sangre podría detectarse tanto la presencia de ADN tumoral como mutaciones específicas tumorales, variantes estructurales, alteraciones de número de copias y características epigenéticas ⁽⁴⁶⁾. Se ha utilizado el ctDNA para evaluar la expresión de PD-L1, TMB y otras firmas relacionadas con el sistema inmunitario. Una expresión baja de PD-L1 soluble y alta de TMB en sangre parecen correlacionarse con una buena respuesta a los ICIs ⁽⁴⁷⁾. Sin embargo, la principal evidencia proviene de análisis exploratorios retrospectivos o pequeñas series prospectivas ⁽⁴⁸⁾. Además, los estudios que evalúan la concordancia entre el tejido y la biopsia líquida han producido resultados contradictorios ⁽⁴⁹⁾ y los protocolos de detección no están estandarizados ⁽⁵⁰⁾. Recientemente la utilidad de ctDNA se ha ampliado para incluir la evaluación de la respuesta temprana a la terapia (respuesta molecular) y en los estadios precoces de CPNM, para la detección de enfermedad mínima residual y detección precoz de recaídas ⁽⁵¹⁾.

Los **miRNAs** constituyen otros biomarcadores circulantes de respuesta a ICIs que han levantado gran interés en los últimos años. Las **vesículas extracelulares** representan un grupo heterogéneo de estructuras membranosas que son producidas y liberadas al torrente sanguíneo por diferentes tipos celulares, incluidas las células neoplásicas e inmunes ⁽⁵²⁾. Realizan funciones fisiológicas de comunicación intercelular pero, también, están implicadas en procesos patológicos como el cáncer promoviendo el crecimiento tumoral, la metástasis y la evasión inmune ^(53, 54). Se diferencian 2 subtipos de vesículas extracelulares, los exosomas y las micropartículas derivadas de la membrana plasmática (microvesículas). Parece que los principales reguladores de los procesos mediados por vesículas extracelulares en cáncer son fragmentos de RNA monocatenario no codificantes denominados miRNAs. Los miRNAs actúan a nivel postranscripcional y postraslacional regulando diversas funciones celulares y, cada vez hay más evidencia de su implicación en el desarrollo, maduración y activación de las células inmunes ⁽⁵⁵⁾. Por tanto, los miRNAs ejercen un papel clave en la regulación de la inmunidad tumoral y representan biomarcadores potenciales para la inmunoterapia basada en ICIs. De esta manera, disponemos de evidencia procedente de estudios que han explorado el papel de firmas de miRNAs obtenidos del plasma de pacientes con CPNMa tratados con ICIs que se han asociado con respuesta y supervivencia a dicha terapia ⁽⁵⁶⁻⁵⁹⁾. Sin embargo, aunque los datos preliminares postulan a los miRNAs como biomarcadores prometedores en inmunoterapia, se necesitan más estudios para aclarar su papel e identificar mejor qué firmas de miRNAs pueden predecir mejor la respuesta a ICIs, así como, perfeccionar y estandarizar los métodos de detección.

Por tanto, los biomarcadores basados en biopsia líquida, a pesar de sus potenciales ventajas, no se han validado e incorporado en la práctica clínica por el momento, como consecuencia de una ausencia de estandarización en la metodología y unos hallazgos controvertidos en cuanto a la concordancia con biomarcadores en tejido entre otros motivos.

2.3. Microbiota

El tejido pulmonar alberga una comunidad compleja de microorganismos, denominados microbiota, que regula la homeostasis del microambiente local. Los pulmones sanos contienen una alta diversidad bacteriana y variabilidad a nivel de especies. De esta manera la disbiosis del microbioma pulmonar da lugar a una disminución de la diversidad de la flora bacteriana y un aumento de las bacterias patógenas y está implicada en numerosas patologías pulmonares, entre ellas, el cáncer ^(60, 61). Recientemente, muchos estudios han puesto su punto de mira en la relación entre el microbioma pulmonar e intestinal, los cuales están interconectados a través de una compleja comunicación bidireccional a nivel linfático y sanguíneo ⁽⁶²⁾. De esta manera, existe una evidencia creciente sobre el **papel de la composición de la microbiota intestinal en el respuesta inmune anti-tumoral** y la eficacia de la inmunoterapia en cáncer. Sabemos que el tratamiento con antibióticos previo, durante o poco después de la terapia con ICIs tiene un impacto negativo en los resultados del tratamiento en pacientes con CPNM ⁽⁶³⁾. En esta línea, se ha puesto de manifiesto una correlación positiva entre la abundancia de especies de *Akkermansia muciniphila* en la microbiota intestinal y una mayor respuesta a ICIs en pacientes con CPNMa ⁽⁶⁴⁾. En el mismo sentido, los pacientes con CPNMa tratados con terapia anti-PD1 con alta diversidad del microbioma intestinal alcanzaron una SLP más prolongada comparada con aquellos con una diversidad baja ⁽⁶⁵⁾. Por tanto, aunque todavía existe escasa evidencia sobre el papel del microbioma como biomarcador predictivo de respuesta a ICIs en CPNM, el racional biológico y los datos preliminares disponibles lo convierten en un biomarcador muy atractivo a investigar.

3. LA VÍA NOTCH COMO POTENCIAL BIOMARCADOR EN INMUNOTERAPIA: IMPLICACIÓN DE VÍA NOTCH EN EL SISTEMA INMUNE

3.1. LA SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE LA VÍA NOTCH

El gen Notch fue identificado por primera vez a principios del siglo XX en estudios con *Drosophila melanogaster*. En estos modelos, la haploinsuficiencia de Notch daba lugar al desarrollo de *Drosophila* con muescas (“*notches*”, en inglés) al final de sus alas, mientras que, la insuficiencia total del gen resultaba ser letal ⁽⁶⁶⁾. El gen Notch no fue aislado y secuenciado hasta la década de los 80s cuando se descubrió que el producto del gen correspondía a una proteína transmembrana que contenía muchas repeticiones similares al Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) ⁽⁶⁷⁾. Posteriormente, se profundizó en el conocimiento de la estructura de la vía Notch (ligandos, receptores, genes diana y regulación transcripcional) tanto en *D. melanogaster* como en otros metazoos, poniendo de manifiesto que se trata de una vía de señalización altamente conservada desde el punto de vista evolutivo ⁽⁶⁸⁾.

La señalización a través de la vía Notch está implicada en diversos procesos fisiológicos celulares tales como proliferación, diferenciación y destino celular, apoptosis, angiogénesis y mantenimiento del estado *stem cell*, además de tener un papel clave en la regulación del sistema hematopoyético ^(69, 70). La desregulación de la señalización de Notch está implicada en un amplio rango de enfermedades incluido el cáncer. La señalización de la vía Notch participa en muchos aspectos de la biología del cáncer, que abarcan del mantenimiento de las *Cancer Stem-like Cells (CSCs)*, la angiogénesis tumoral, la inmunidad anti-tumoral, la invasión y metástasis, de tal manera que, esta vía puede desempeñar funciones tanto de promoción como de supresión tumoral en diversos tipos de cáncer ⁽⁷¹⁾. En 1991, el gen Notch se vinculó por primera vez con la leucemia linfoblástica aguda de células T humanas. Además, disponemos de evidencia manifiesta de que esta vía de señalización ejerce un efecto de doble filo sobre la inmunidad tumoral al regular la abundancia y funcionalidad de diversas células inmunes, incluidas las células supresoras derivadas de mieloides, los macrófagos asociados a tumores, las células dendríticas y células T ⁽⁷³⁾.

3.1.1. Estructura de la vía Notch: Receptores y ligandos de la vía Notch

El **gen Notch** codifica un receptor transmembrana de un único paso con múltiples dominios. Sus ligandos son también proteínas transmembrana. En mamíferos se describen 4 isoformas del receptor Notch 1-4 y cinco ligandos agrupados en dos familias: ligandos *Delta* homólogos de *Drosophila*, denominados *Delta-like* (DLL 1, 3 y 4), y ligandos tipo *Serrate like* llamados *Jagged* (Jag1 y Jag2). Todos estos ligandos son denominados **ligandos canónicos de Notch** y se caracterizan por un *dominio Delta/Serrate/Lag-2* (DSL) conservado y repeticiones en tándem del factor de crecimiento epidérmico (*EGF like*) en su dominio extracelular. Los **receptores maduros de Notch** también poseen un dominio extracelular con repeticiones *EGF like*, un dominio transmembrana y un dominio intracelular (DICN). Las repeticiones *EGF like* del dominio extracelular de ligandos y receptores de Notch son las que están implicadas en la interacción ligando/receptor. El DICN está compuesto por un dominio de unión a RBP-Jk (RAM: *RBP-J-Association Module*), siete repeticiones anquirina (ANK) que sirven de unión a cofactores, un dominio de transactivación (TAD) y un dominio C-terminal de motivos ricos en prolina/ácido glutámico/serina/treonina (PEST) que es responsable de su degradación por el proteosoma ^(68, 74-76) (**Figura 1**). Los ligandos pueden tener un efecto de activación o inhibición sobre la señalización de la vía Notch a través de interacciones con el receptor de tipo *trans* o *cis* respectivamente. De esta manera, las interacciones *trans* se producen entre dos células adyacentes induciendo una activación de la señalización de la vía, mientras que, las interacciones *cis* ocurren en una misma célula ejerciendo un efecto inhibitorio ⁽⁷⁷⁾. Después de la transcripción y traducción, los **precursores de Notch** se generan en el retículo endoplásmico y luego se translocan al aparato de Golgi ⁽⁷⁸⁾. En el retículo endoplasmático, los precursores de Notch son glicosilados por la enzima POFUT1, que une fucosa a residuos específicos de serina/treonina en las repeticiones de EGF de la porción extracelular del receptor. Posteriormente, en el aparato de Golgi, la familia de glicosiltransferasas *Fringe* extiende la O-fucosa, mientras que las xilosiltransferasas extienden la O-glucosa ^(79, 80). La **glicosilación de Notch** es vital para su estabilidad y función, de tal manera que, la interacción de los receptores Notch con los ligandos Notch se puede modular mediante la glicosilación de los receptores Notch ⁽⁷⁵⁾. El nivel de receptores Notch en la membrana celular está controlado por endocitosis constitutiva, promovida por las ubiquitina ligasas. Una cantidad apreciable de receptores Notch serán ubiquitinados y degradados en el proteosoma, mientras que el resto se expresa en la membrana celular para transmitir señales ^(74, 75).

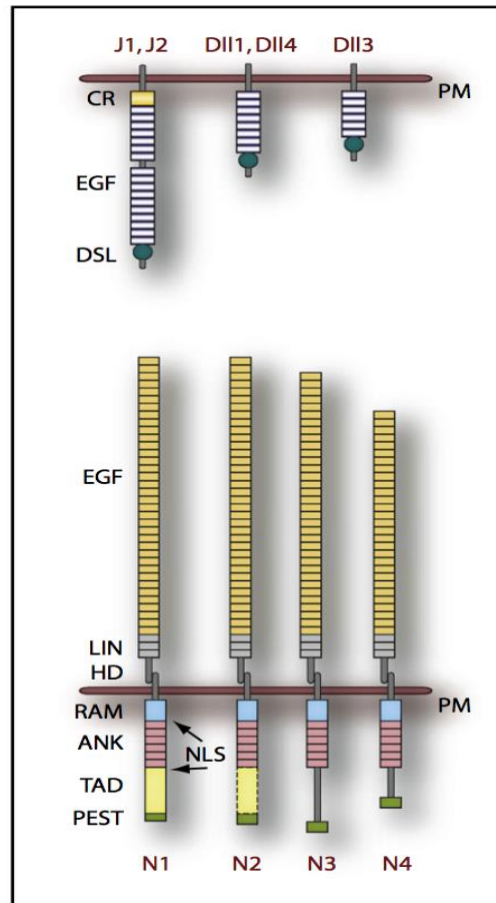


Figura 1. Ligandos y receptores Notch

Immunity, 2010 (Adaptada de *Radtke F et al*).

3.1.2. Activación de la vía Notch mediada por ligandos

La unión ligando-receptor entre células vecinas induce la liberación, por proteólisis regulada secuencial, del DICN al citoplasma. La primera escisión del receptor (S1) se produce en el aparato de Golgi antes de su migración a la superficie celular por una furin-proteasa y da como resultado un receptor heterodimérico formado por un dominio extracelular unido de forma no covalente a un péptido transmembrana que contiene el dominio transmembrana y el dominio intracelular. Cuando la activación de la vía Notch depende del ligando, las fuerzas mecánicas de la unión ligando-receptor expone el lugar de escisión S2 a la acción proteolítica de una desintegrina y metaloproteasa de la familia de proteasas ADAM. ADAM17 y, especialmente, ADAM10 son las enzimas esenciales en la activación de la vía Notch dependiente de ligando. Tras este segundo corte S2 se produce un cambio conformacional en el receptor de Notch que lo hace accesible a la acción del complejo de proteasas gamma-secretasa intramembrana. Esta escisión final conocida como S3, libera el DICN al citoplasma ^(75, 81-84).

El DICN migra al núcleo donde interacciona a través de su dominio RAM con factores de transcripción como CSL (*CBF1/Suppressor of Hairless/LAG-1*), en mamíferos RBP-Jk (*Recombining Binding Protein suppressor of hairless*). En este proceso DICN desplaza co-represores de CSL que lo mantienen inactivo y recluta co-activadores como Mastermind-like y la histona acetiltransferasa para formar el complejo transcripcional de Notch que regula la transcripción de sus genes diana ^(75, 81, 83) (**Figura 2**).

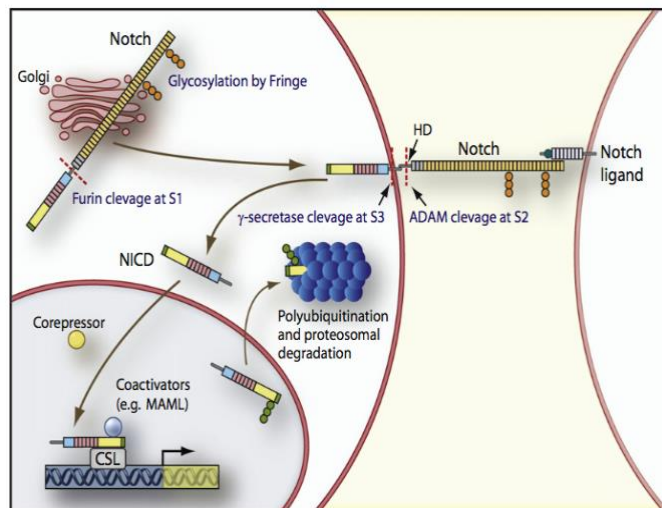


Figura 2. Señalización a través de la vía Notch mediada por ligando

Immunity, 2010 (Adaptada de Radtke F et al).

3.1.3. Genes diana de la vía Notch

La vía de Notch tiene diferentes genes diana que van a depender del tipo y contexto celular ^(75, 81, 83):

- **Genes que promueven la proliferación celular:** Cdkn1a, Myc y EGFR.
- **Genes que promueven la supervivencia celular:** bcl-2.
- **Genes que controlan la propia vía:** Receptor Notch y, sobre todo, la expresión de los genes de los ligandos de Notch. *Notch-regulated ankyrin repeat protein* (NRARP) es un regulador negativo de la señalización de la vía al unirse al complejo del DICN activado y producir la pérdida de DICN.
- **Genes de la familia Hes (*Hairly and Enhancer of Split*) y de la familia Hey (*Hairy and Enhancer of Split with YRPW motif*),** tales como, Hes1, Hes5, Hes7, Hey1, Hey2 y HeyL que codifican para factores de transcripción de tipo bHLH (represores transcripcionales) y explican las funciones de la vía más características en el adulto.

Las principales particularidades de la vía de señalización Notch son ^(75, 81):

- Los receptores y ligandos son proteínas transmembrana, por lo tanto, se trata de una vía de señalización entre células adyacentes para controlar destino celular por medio de procesos competitivos de inhibición lateral o de división asimétrica.
- El propio receptor de membrana actúa como un factor de transcripción nuclear, por lo tanto, la vía no presenta pasos intermedios de transducción de señales en el citoplasma. Dado que no hay una cascada de amplificación de la señal en la vía, es la dosis y el tiempo de interacción con el ligando la que va a determinar el grado de activación de esta.
- DICN no es un transactivador de genes por sí mismo, por tanto, tiene que unirse a un factor de transcripción (CSL) que en condiciones basales es un represor transcripcional.

3.1.4. Activación de la vía Notch no canónica

La vía de Notch también puede ejercer sus funciones de forma no canónica al activarse receptores Notch en endosomas, independientemente de la unión a ligando y de CSL, e interactuar con otras vías de señalización como Wnt/beta-catenina, NF-kB, TGFb, STAT3, PI3K, mTORC2 y HIF1alfa entre otras ⁽⁸⁵⁾. Además, se ha descrito una vía de Notch no canónica y no nuclear en la que DICN interacciona con mTORC2 en el citoplasma para activar la señalización de PI3K-AKT y promover la transcripción de IL-10 e IL-12 ⁽⁸⁶⁾. El dominio intracelular Jag1 puede promover el crecimiento tumoral y la transición epitelio-mesénquima (TEM) sin unirse a los receptores Notch ⁽⁸⁷⁾ (**Figura 3**).

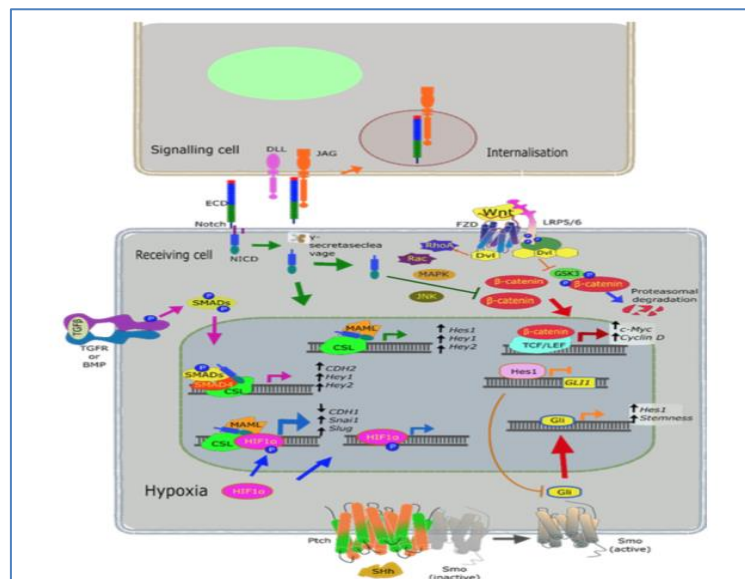


Figura 3. Señalización a través de la vía Notch no mediada por ligando (no canónica)

Cells, 2021 (Adaptada de Misiorek et al).

3.1.5. Efecto biológico de la señalización de Notch

Debemos tener en cuenta que el efecto biológico de la señalización de Notch a través de la vía canónica o no canónica puede ser variable en función del momento y de la intensidad de la señal, así como, de la expresión diferencial de ligandos/receptores y de los mecanismos de regulación transcripcional y postranscripcional. Además, hay que considerar que el número de puntos de unión potenciales del complejo Notch/RBP-J en el genoma excede al número de genes que la vía regula dentro de un tipo celular. De esta manera, el estado de la cromatina que va a controlar el acceso al genoma puede condicionar la especificidad del efecto de la señalización de Notch al determinar la unión del complejo de transcripción en zonas proximales a región promotora de sus genes diana o en zonas regulatorias distales. Por tanto, el resultado final va a depender mucho del contexto celular en el que nos encontremos ^(88, 89). Otro elemento a tener en cuenta en la señalización a través de la vía son las diferencias en las señales enviadas a través de diferentes combinaciones de interacciones ligando-receptor ⁽⁹⁰⁾.

Desde un punto de vista oncogénico la disregulación de Notch puede tener efectos opuestos. De esta manera, puede presentar un efecto oncogénico por hiperactivación de la vía (cáncer de mama, leucemia linfoblástica aguda T, leucemia linfática crónica B, linfoma esplénico de la zona marginal) o tener un efecto supresor tumoral por pérdida de función de la vía dependiendo del tipo tumoral ⁽⁹¹⁾.

3.2. LA VÍA NOTCH EN LA HOMEOSTASIS DEL SISTEMA INMUNE

La señalización a través de la vía Notch ocupa una posición clave en la regulación del sistema inmune a nivel de hematopoyesis, diferenciación de las células inmunes e inflamación y también está implicada en diversos procesos patológicos como autoinmunidad e inmunosupresión inducida por tumores. De esta manera, Notch puede controlar la diferenciación y función de células implicadas tanto en la inmunidad innata (células mieloides y células NK) como adaptativa (linfocitos T CD4, CD8 y Treg) ⁽⁹²⁾.

3.2.1. Células mieloides

3.2.1.1. Progenitores hematopoyéticos/stem cells mieloides (HSCs) en la médula ósea

Las células mieloides son esenciales en la homeostasis de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Estas células mieloides (granulocitos, macrófagos y células dendríticas) se desarrollan en condiciones fisiológicas a partir de **progenitores hematopoyéticos pluripotenciales** mediante un proceso secuencial de diferenciación en la médula ósea. Este proceso de diferenciación está regulado por una compleja red de citoquinas y por la interacción directa célula-célula entre HSCs y células del estroma.

Efectos de la vía Notch en los HSCs mieloides

La señalización a través de la vía Notch juega un papel fundamental en la interacción entre HSCs y estroma y, por tanto, en el desarrollo y diferenciación de las células mieloides. Las células HSCs expresan los cuatro receptores de la familia Notch e interactúan constantemente con células estromales circundantes que expresan ligandos de Notch ⁽⁹³⁾. Sin embargo, el efecto exacto de Notch sobre la diferenciación de las células mieloides a partir de HSCs todavía no se conoce en profundidad y sigue siendo controvertido. De esta manera, la mayoría de las evidencias que encontramos en la literatura soportan un papel crítico de Notch en el mantenimiento de las HSCs promoviendo su auto-renovación como consecuencia del bloqueo de la diferenciación terminal de las células mieloides ^(94, 96, 97), sin embargo, otros datos sugieren que la señalización a través de la vía es necesaria para el desarrollo de células mieloides maduras ^(95, 98, 99). Por tanto, parece que el impacto de la vía Notch en la diferenciación de las células mieloides es crítico pero puede depender de diferentes factores: el estadio de diferenciación en el que se desencadena su activación, la presencia de citoquinas específicas o el tipo de ligando que activa la vía (**Figura 4**).

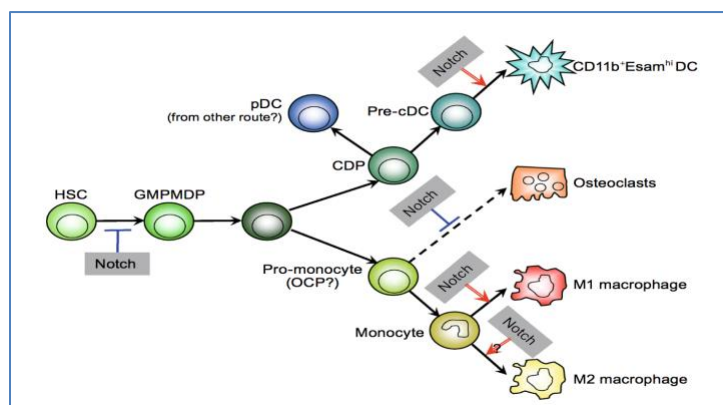


Figura 4. Regulación de la diferenciación de las células mieloides mediada por Notch

Protein Cells, 2016 (Adaptada de *Shang et al*).

3.2.1.2. Células dendríticas

Las **células dendríticas (CDs)** son CPAs que reconocen, adquieren, procesan y presentan antígenos a los linfocitos T para activar la respuesta inmune específica de antígeno. Las CDs juegan un papel clave en la respuesta inmune adaptativa frente a patógenos, células tumorales y auto-antígenos. Las CDs captan antígenos en tejidos y órganos linfoides y reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por medio de receptores PRR. El reconocimiento y la captura de patógenos desencadenan una cascada de eventos de señalización que conduce a la maduración de las CDs, lo que implica el crecimiento de dendritas, una mayor expresión de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II y moléculas coestimuladoras, secreción de citoquinas y migración a órganos linfoides para presentar el antígeno peptídico a las células T vírgenes ^(100, 101). Por lo tanto, las CDs están íntimamente involucradas tanto en la respuesta inmune innata como adaptativa. Dentro de las CDs podemos distinguir a las **CDs clásicas** y a las **CDs plasmocitoides (CDp)**. Ambas poblaciones celulares derivan de HSCs que emigran de la médula ósea hasta los tejidos linfoides periféricos para completar su diferenciación terminal. Las CDs clásicas constituyen la población celular dominante y se diferencian a partir del linaje mieloide mientras que las CDp representan una pequeña proporción y se diferencian a partir de progenitores linfoides ⁽¹⁰¹⁾.

Efectos de la vía Notch sobre la diferenciación de CDs

Varios estudios han evidenciado el papel clave de la señalización de Notch en la diferenciación y maduración de las CDs (**Figura 4**). Existe evidencia, pero también cierta controversia en torno al grado de **participación de la vía Notch en la diferenciación de CDs clásicas**. Varios grupos han descrito en estudios *in vitro* que la vía Notch tiene un efecto directo favoreciendo la diferenciación de las CDs ^(102, 103). En contra a estos hallazgos, otros estudios *in vivo* en modelos murinos han puesto de manifiesto que el bloqueo de la vía Notch inhibe el desarrollo de células T pero no parece afectar al desarrollo de las CDs. De esta manera, *Radtke et al* ⁽¹⁰⁴⁾, generaron ratones *knockout* condicionales para Notch1 y demostraron que el desarrollo de células T estaba bloqueado en estos ratones. Sin embargo, el número de CDs en timo, CD clásicas y CDs de *Langerhans* en la piel fue normal. En este sentido, los ligandos de Notch expresados en las células del estroma parecen regular de forma opuesta la diferenciación de las CDs, de tal manera que, la expresión de DLL1 en el estroma esplénico promueve su diferenciación, mientras que, Jagged1 la inhibe al promover la acumulación de sus precursores inmaduros, como se puso de manifiesto en un modelo de mielopoyesis inducida ⁽¹⁰⁵⁾.

Efectos de la vía Notch sobre la maduración de las CDs

La señalización a través de la vía Notch está involucrada tanto en la maduración funcional de las CDs como en sus funciones efectoras que median la respuesta de las células T, comportándose en general, como un regulador positivo. Las CDs expresan receptores y ligandos Notch, así como receptores tipo *toll-like* (TLRs). Los TLRs estimulan de forma potente la expresión de ligandos Notch en las CDs ⁽¹⁰⁶⁾. De esta manera, la vía Notch juega un papel crítico en la maduración de CD inducidas por péptidos o lipopolisacáridos (LPS). Dos procesos esenciales en la maduración de las CDs, como son el crecimiento de las dendritas y la expresión de MHC de clase II, se redujeron significativamente en las CDs deficientes en RBP-J durante la maduración mediada por LPS ⁽¹⁰⁷⁾.

Como se ha comentado previamente, la interacción de los ligandos/receptores de la vía Notch entre las CDs y los linfocitos T puede modular la función de los linfocitos T colaboradores *naïve* y linfocitos T efectores y determinar la **polarización de la respuesta inmune Th1 vs Th2/Th17/Treg** ⁽¹⁰⁸⁻¹¹¹⁾. Durante la activación de la célula T, el tipo de ligando de Notch presentado en la superficie de las CDs puede determinar la diferenciación y polarización de la célula T. De esta manera, las CDs con alta expresión de ligandos DLL1 o DLL4 pueden polarizar a los linfocitos T CD4⁺ hacia una respuesta inmune de tipo Th1 (antitumoral) y conducir a la diferenciación de linfocitos T CD8⁺ en células memoria. DLL4-Notch actúa como una señal de co-estimulación para potenciar la cascada PI3K activada por TCR-CD28 necesaria para una respuesta antitumoral efectiva ⁽¹¹⁰⁾. Por su parte, las CDs con alta expresión de ligandos Jag-2 y baja expresión de ligandos DLL1 y 4 promueven el desarrollo de respuestas inmunes de tipo Th2 o Th17, mientras que, aquellas con una alta expresión de ligandos Jag-1 pueden inducir la polarización de las células T hacia un fenotipo T regulador ⁽¹¹¹⁾. (**Figura 5**).

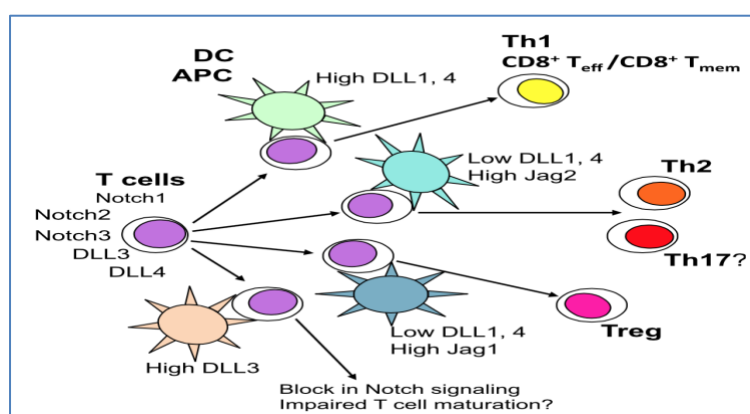


Figura 5. Regulación de la respuesta mediada por células T según la expresión de ligandos de Notch en CDs

3.2.1.3. Macrófagos

Los macrófagos constituyen una población celular heterogénea que pueden ejercer funciones como células fagocíticas y CPA y, por tanto, ejercen un papel clave tanto en la respuesta inmune innata como adaptativa así como en la remodelación e inflamación de los tejidos. El cáncer es otra área en la que los macrófagos han surgido como un actor crucial en la creación de un MAT que promueve el crecimiento tumoral y la metástasis, en oposición a su papel tradicional como una célula inmune innata ^(112, 113). Los macrófagos se caracterizan por su plasticidad fenotípica, de tal manera que, se han descrito al menos dos fenotipos según su vía de activación: macrófagos con activación clásica (M1) y macrófagos con activación alternativa (M2). Los macrófagos M1 son activados por PAMP y están especializados en respuestas inmunes innatas contra patógenos intracelulares. Los receptores TLR en los macrófagos M1 desencadenan la activación de NF- κ B, AP-1 y STAT1 y promueven la liberación de citocinas proinflamatorias y quimioquinas que conllevan a un incremento en la capacidad de presentación antigénica y una respuesta inmune Th1. Los macrófagos M2 secretan citoquinas antiinflamatorias e inmunosupresoras como IL-10 y TGF- β y su función fisiológica consiste en limitar el daño tisular causado por la inflamación y promover la reparación y remodelación tisular. Los efectos de los macrófagos sobre la respuesta inmune adaptativa son más complejos y pueden condicionar efectos contrapuestos, tanto anti-tumorales como pro-tumorales, dependiendo del contexto del microambiente ^(112, 113).

Efectos de la vía Notch sobre la diferenciación y maduración de Macrófagos

La señalización a través de la vía Notch juega un papel importante en la diferenciación, polarización y activación de los macrófagos (**Figura 6**). En líneas generales, podemos decir que la señalización a través de la vía de Notch favorece la activación y las funciones efectoras de los **macrófagos con un fenotipo pro-inflamatorio (M1)** ⁽¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾. Parece que la vía de Notch puede estar también implicada en la activación alternativa de los **macrófagos hacia un fenotipo anti-inflamatorio M2**. En un modelo de macrófagos con deleción de *Rbpj*, se requirió la señalización de la vía de Notch a través de CSL/RBP-Jk para la activación de macrófagos con fenotipo M2, así como, para la transcripción de sus genes diana como *il4* y *Arg1* ⁽¹¹⁷⁾. En la misma línea, otros investigadores han descrito la activación de Notch en macrófagos con fenotipo anti-inflamatorio que producen elevadas cantidades de IL-10 y bajos niveles de IL-12 para amortiguar la respuesta inmunitaria ⁽¹¹⁸⁾. Por tanto, la vía de Notch puede estar implicada en la activación tanto clásico como alternativa de los macrófagos y su efecto puede depender del contexto celular ^(114, 115, 119).

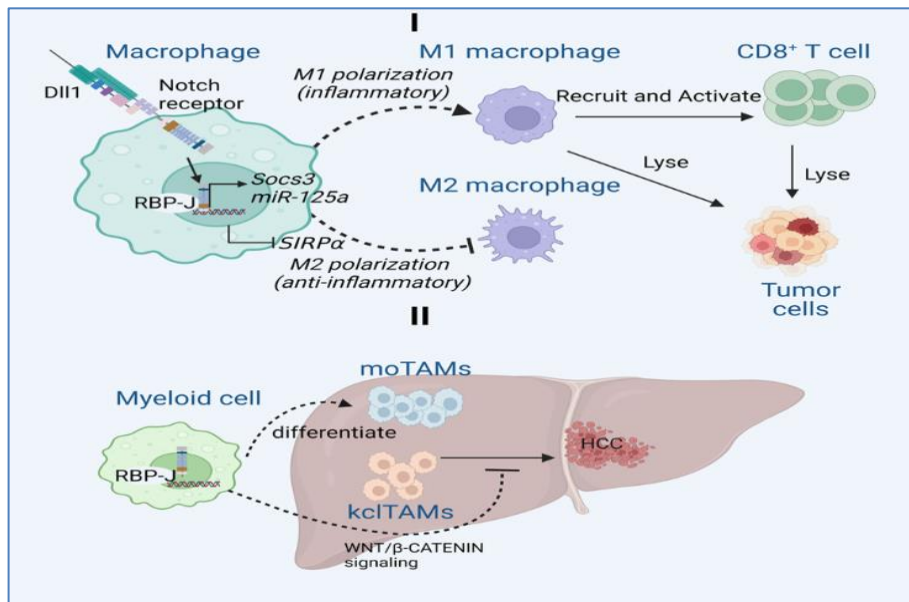


Figura 6. Implicación de la vía Notch en el desarrollo y activación de macrófagos

Journal of Hematology & Oncology, 2023 (Adaptada de Li et al).

3.2.2. Células linfoides

3.2.2.1. Linfocitos T

Durante la respuesta inmune, las CPAs activan las células T *naive* y desencadenan su expansión clonal diferenciándose en linfocitos T colaboradores o *helper* (Th). Funcionalmente, las células Th1 son necesarias para la eliminación de virus y patógenos intracelulares. Las células Th2 median la inmunidad contra los parásitos helmintos y las reacciones alérgicas. Las células Th17 son críticas para controlar las infecciones fúngicas y bacterianas extracelulares y mediar la autoinmunidad mientras que las células Treg están involucradas en la regulación de la auto-tolerancia periférica y la inmunosupresión tumoral.

Efectos de la señalización de la vía Notch en la fisiología del linfocito T

Cabe destacar el papel de la vía Notch en la fisiología del linfocito T tanto a nivel central, donde está implicada en determinar el destino de la célula T en diferentes etapas de su desarrollo evolutivo, como a nivel periférico, en la que es necesaria en toda la línea de desarrollo del linfocito T para su proliferación, supervivencia y diferenciación⁽¹²⁰⁾ (Figura 7).

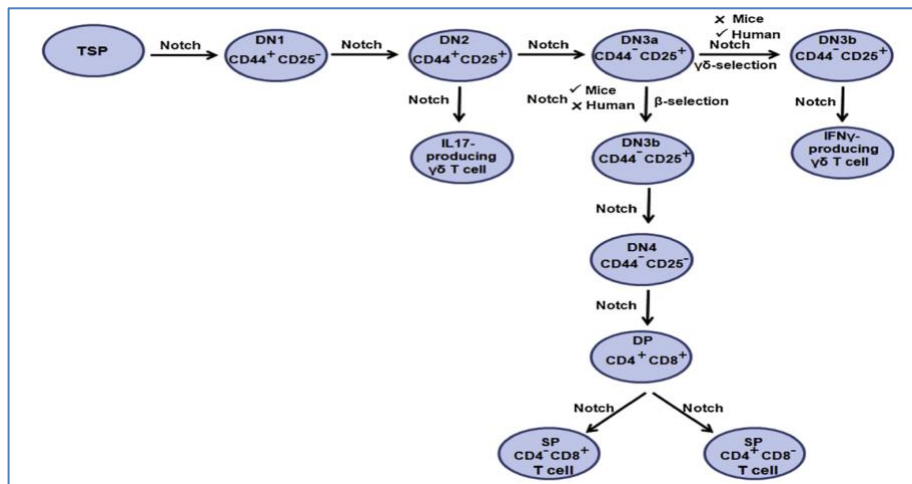


Figura 7. Vía Notch en la diferenciación y maduración de la célula T

Immunology Letters, 2019 (Adaptada de *Chiplunkar et al*).

A **nivel central** los progenitores linfoides multipotentes proT y proB se diferencian hacia un **linaje de célula T en detrimento del linaje B** mediante un proceso de inhibición lateral que implica una expresión diferencial de ligandos de Notch en médula ósea ⁽¹²¹⁾. Por otra parte, una vez que los progenitores linfoides migran al timo, la interacción DLL1-Notch promueve la supervivencia de células T pre-CD4-CD8 mediante la regulación de su metabolismo en el tejido tímico. De esta manera, diferentes modelos han puesto de manifiesto que la sobreexpresión de los ligandos DLL1 o DLL4 en los HSCs en la médula ósea *in vivo* o la expresión de DLL1 o DLL4 en el microambiente tímico conduce a la inducción del desarrollo de células T y la supresión de células B ⁽¹²²⁾. Posteriormente al establecimiento de la identidad del linaje T, de nuevo la señalización de Notch también está implicada en la **diferenciación y maduración de los linajes de células T $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ y CD4+ versus CD8+**. De esta manera, la expresión de Jag2 en las células epiteliales tímicas activan la señalización de Notch3 en los linfocitos favoreciendo la generación de células T $\gamma\delta$ frente a $\alpha\beta$ ⁽¹²³⁾. La activación de la vía Notch también parece estar implicada en la decisión del linaje CD4+ versus CD8+. Los estudios iniciales mostraron que la expresión constitutiva del DICN1 en los timocitos inmaduros resultaba en un mayor número de timocitos CD8+ y CD4+/CD8+ (dobles positivos) ⁽¹²⁴⁾.

A **nivel periférico** la señalización a través de la vía de Notch regula varias funciones de las **células T maduras vírgenes**, tales como, su diferenciación, proliferación y polarización. A pesar de que la actividad de la vía Notch disminuye tras la fase de diferenciación linfóide doble positivo (CD4+/CD8+) en el timo, las células CD4 y CD8+ maduras vírgenes expresan receptores Notch1 y Notch2 en la periferia. De esta manera, si bloqueamos la vía de Notch en linfocitos T maduros activados se produce un descenso de su activación, proliferación, supervivencia, citotoxicidad y capacidad de producción de citoquinas ⁽¹²⁵⁾.

Linfocito T CD4+

El papel de la vía de Notch en la regulación de la **diferenciación y función del linfocito T CD4+** está bien establecido. De esta manera, la interacción de los ligandos/receptores de la vía Notch entre las CPAs y los linfocitos T puede modular la función de los linfocitos T colaboradores *naïve* y linfocitos T efectores y determinar la polarización de la respuesta inmune Th1 vs Th2/Th17/Treg ⁽¹¹¹⁾ (**Figura 8**). Las células T expresan en su superficie el complejo del receptor de célula T (TCR) y receptores de Notch, mientras que, las CPAs expresan moléculas de co-estimulación y ligandos de Notch. Durante la activación de la célula T, el tipo de ligando de Notch presentado en la superficie de las CPAs puede determinar la diferenciación y polarización de la célula T. De esta manera, las CPAs con alta expresión de ligandos DLL1 o DLL4 pueden polarizar a los linfocitos T CD4+ hacia una respuesta inmune de tipo Th1 (antitumoral) y conducir a la diferenciación de linfocitos T CD8+ en células memoria. De echo, el DICN está directamente implicado en la expresión del factor transcripcional *T-bet* así como en la producción de IFN γ en el linfocito T CD4+, fenómenos claves en la respuesta inmune de tipo Th1. Por su parte, las CPAs con alta expresión de ligandos Jag-2 y baja expresión de ligandos DLL1 y 4 promueven el desarrollo de respuestas inmunes de tipo Th2 o Th17 mediante la activación de genes como *Il4* y *Gata3* e *Il17* y *ROR γ t* respectivamente ^(108, 109), mientras que, aquellas con una alta expresión de ligandos Jag-1 pueden inducir la polarización de las células T hacia un fenotipo T regulador ⁽¹¹⁰⁾.

Linfocito T CD8+

Por su parte, el papel de la vía de Notch en la activación y función del **linfocito T CD8 citotóxico**, aunque menos conocido, también parece clave. La vía Notch regula directamente la producción de moléculas efectoras y citoquinas en el linfocito T CD8 (granzima, perforina, interferón gamma) ⁽¹²⁶⁻¹²⁹⁾, la diferenciación hacia células T efectoras de vida corta, así como el mantenimiento de células T memoria ⁽¹³³⁾ (**Figura 9**). Así, la activación de la vía de Notch en el linfocito T CD8 a través de anticuerpos agonistas de Notch o proteínas de fusión del ligando DLL4 conducen a un aumento de la respuesta antitumoral ^(130, 131), sugiriendo el potencial efecto terapéutico de promover la señalización de Notch en las células T CD8 del microambiente tumoral. Otros trabajos describen un papel supresor de la vía sobre el linfocito T CD8 cuando se activa a través del ligando Jagged-1 ⁽¹³²⁾. Por tanto, podemos ver como los ligandos de Notch parece que tienen un efecto opuesto sobre la señalización de la vía en la célula T: la unión de ligandos DLL en las CPAs a los receptores Notch del linfocito T CD8+ inducen una respuesta citotóxica antitumoral mientras que la unión a ligandos tipo Jagged resultan en una señal inhibitoria sobre la vía.

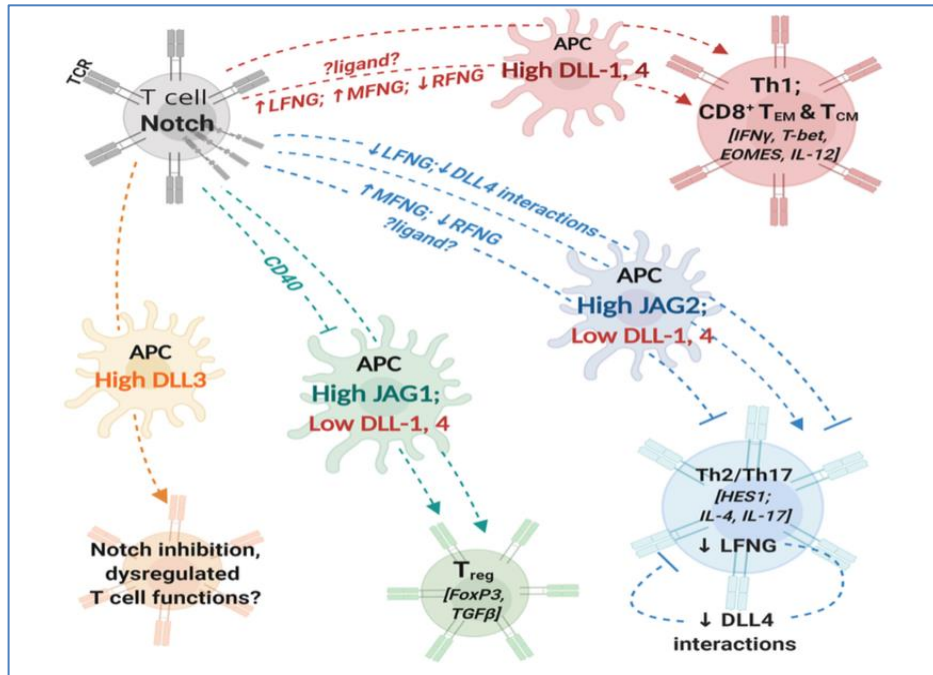


Figura 8. Implicación de la vía Notch en la respuesta de células T mediada por CPAs

Front Immunol, 2020 (Adaptada de Goruganthu et al).

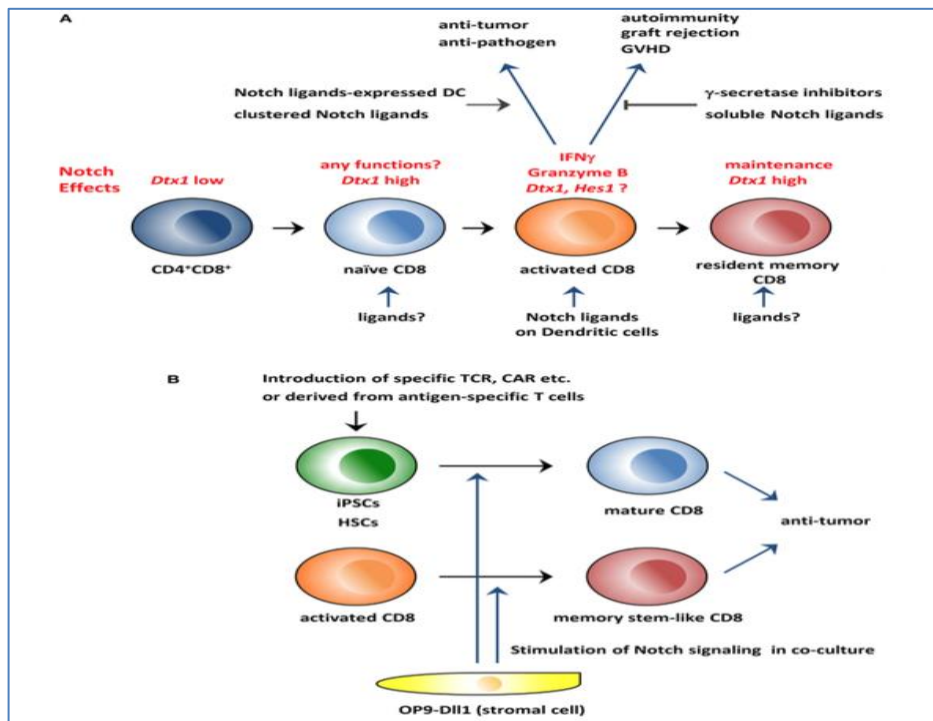


Figura 9. Implicación de la vía Notch en la activación y función del linfocito T CD8

Front Immunol, 2018 (Adaptada de Tsukumo et al).

3.2.2.2. Linfocitos B

La vía de Notch también está implicada en la **regulación de la diferenciación y funciones de los linfocitos B**. La señalización a través de la vía Notch parece fundamental para guiar una diferenciación apropiada en diferentes etapas del desarrollo de las células B desde las células progenitoras hematopoyéticas en la médula ósea hasta las células B diferenciadas que participan en las respuestas inmunes ⁽¹³⁴⁾ (**Figura 10**). Estudios *in vitro* han demostrado que la señalización de Notch1 conduce a la diferenciación de las células T y NK a partir de las células progenitoras hematopoyéticas linfoides humanas (CD34+), mientras que inhibe la diferenciación de las células B ⁽¹³⁵⁾. De esta manera, el bloqueo de Notch1 interrumpe completamente el desarrollo de células T e incrementa la acumulación de células B ectópicas en el timo.

A **nivel periférico**, una vez que las células B inmaduras migran desde la médula ósea al bazo, se requiere un incremento en la actividad de la vía mediada por la señalización DLL1-Notch para la maduración de un subgrupo de células B que residen en la zona marginal. Estas células B generan rápidamente células plasmáticas en respuesta a patógenos, sobre todo, en lo que respecta a bacterias encapsuladas ⁽¹³⁶⁾.

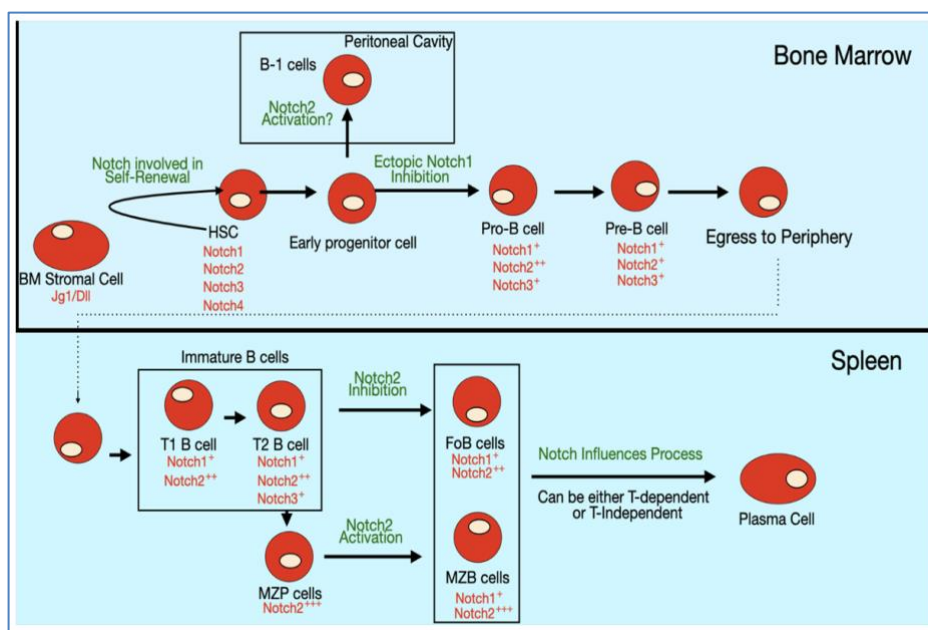


Figura 10. Implicación de la vía Notch en la diferenciación del linfocito B

Front Immunol, 2021 (Adaptada de *Garis et al*).

3.2.2.3. Células asesinas naturales

Las células asesinas naturales (NK) son células antivirales y antitumorales cruciales en el sistema inmunológico innato. La señalización de Notch desempeña un papel indispensable en la regulación de su desarrollo y funciones efectoras (**Figura 11**). De esta manera, los precursores CD34⁺ de la sangre del cordón umbilical humano se diferencian en células NK *in vitro* después de ser estimulados con ligandos Notch (principalmente DLL1, DLL4 y Jagged2) en presencia de citoquinas (IL-7, Flt3 e IL-15). Estas células NK pudieron lisar células tumorales porque regulan positivamente su transcripción y liberación de granzima B e IFN- γ mediada por la activación de Notch1 y Notch2 ⁽¹³⁷⁾. A medida que las células NK humanas maduran, la señalización de Notch mediada por DLL1 se activa para promover la expresión de CD16 y de los receptores tipo Ig asesinos (KIR), lo que produce citotoxicidad contra las células tumorales ⁽¹³⁸⁾. En células NK murinas, la activación de las células NK mediada por CDs está controlada por la interacción de Notch con Jagged2 ⁽¹³⁹⁾. En comparación con las células NK humanas normales, la expresión de Notch1 se redujo significativamente en las células NK de pacientes con cáncer de pulmón o cáncer gástrico ⁽¹⁴⁰⁾. En conjunto, estas observaciones sugieren que la activación de Notch puede mejorar significativamente las propiedades antitumorales de las células NK.

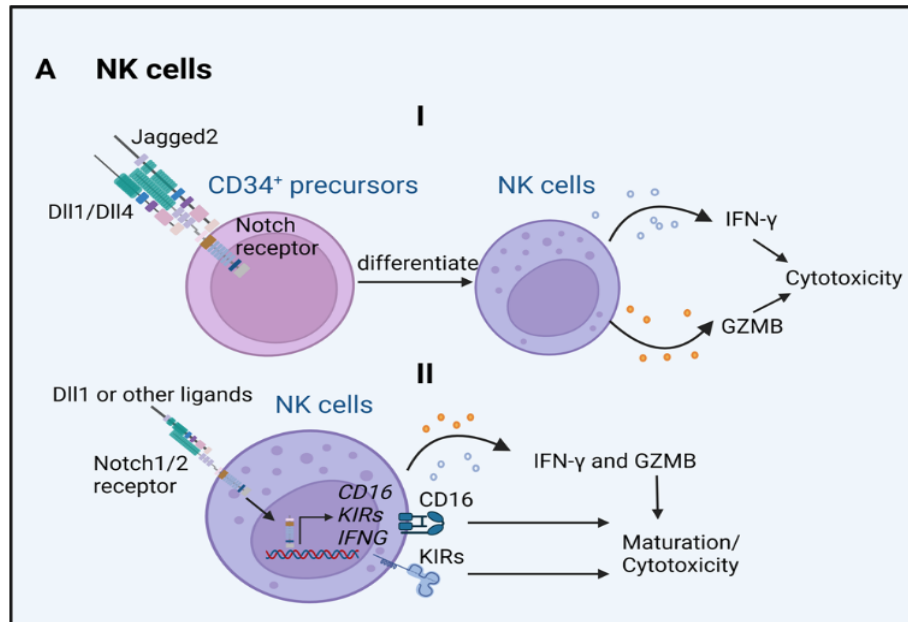


Figura 11. Implicación de la vía Notch en el desarrollo y activación de células NK

Journal of Hematology & Oncology, 2023 (Adaptada de Li et al).

4. MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL MEDIADOS POR LA SEÑALIZACIÓN DE LA VÍA NOTCH

Las células neoplásicas son capaces de poner en marcha una serie de procesos, tanto a nivel sistémico como en el MAT, que pueden alterar la diferenciación y función de las células del sistema inmune con la finalidad de evadir al sistema de inmunovigilancia y progresar en su crecimiento, invasión y diseminación ⁽¹⁴²⁾. La señalización a través de la vía de Notch está implicada en la regulación de todos los tipos celulares que median la **respuesta inmune innata y adaptativa antitumoral** (CDs, neutrófilos, linfocitos B, linfocitos T CD4+ Th1, CD8+ citotóxicos y células NK), así como, de elementos clave en la **inmunosupresión del microambiente** que las células tumorales utilizan en su favor para evadir esa respuesta inmune (MDSCs, TAM tipo M2, linfocitos Treg y Breg, CAFs, puntos de control del sistema inmune como PD1/PD-L1, además de, otras células del microambiente como células endoteliales y células mesenquimales) ⁽¹⁴³⁾. De ahí que, Notch pueda ser un biomarcador de respuesta a terapia con ICIs en cáncer atractivo para evaluar (**Figura 12**).

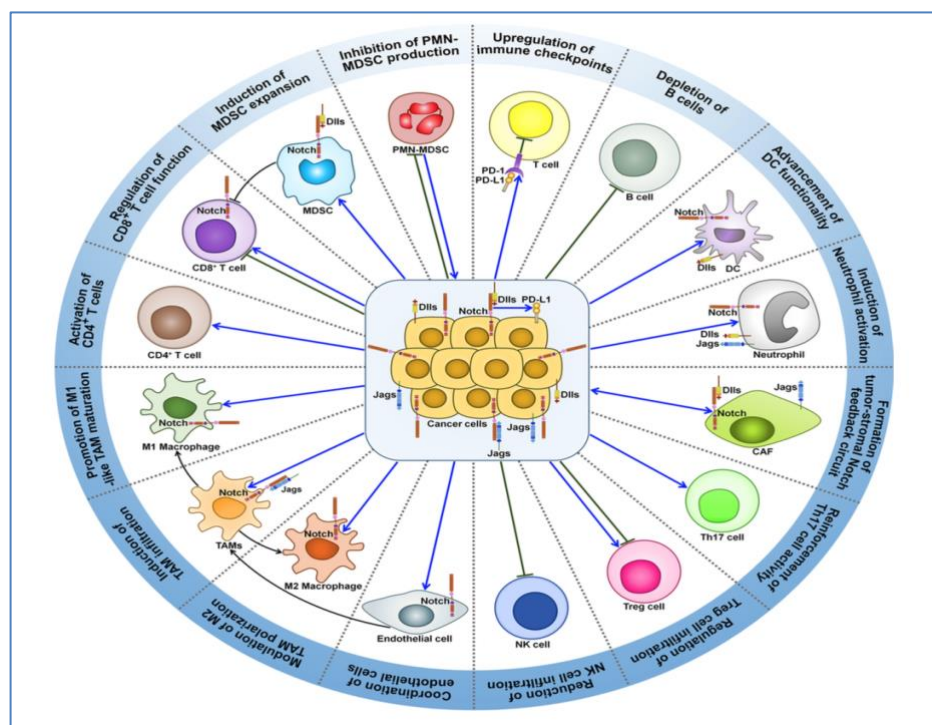


Figura 12. Implicación de la vía Notch en el MAT y evasión en la respuesta inmune

Front Immunol, 2024 (Adaptada de Wang et al).

La señalización de Notch está implicada en el desarrollo del cáncer a través de múltiples mecanismos de evasión del sistema inmune, entre los que destacan:

- 4.1. Inducción de inmunosupresión.
- 4.2. Promoción de un microambiente pro-tumoral.
- 4.3. Disfunción de la respuesta inmune adaptativa anti-tumoral.

4.1. INDUCCIÓN DE INMUNOSUPRESIÓN MEDIADA POR LA VÍA NOTCH

La vía de Notch está implicada en la regulación de las dos principales poblaciones celulares inmunosupresoras asociadas a cáncer (**células mieloides y células T reguladoras**).

CÉLULAS MIELOIDES

Las células mieloides diferenciadas (granulocitos, células dendríticas y macrófagos) ejercen una función clave en la respuesta inflamatoria aguda presentando antígenos, activando la respuesta inmune adaptativa mediada por células T y fagocitando patógenos y también contribuyen a la eliminación de las células tumorales en las fases iniciales de la carcinogénesis (**sistema de inmuno-vigilancia**). Sin embargo, con el tiempo, las células neoplásicas pueden poner en marcha mecanismos para evadir el sistema de inmuno-vigilancia, e incluso, utilizar los propios recursos del sistema inmune para favorecer la progresión tumoral (**inmuno-edición**). Existe una amplia evidencia que avala el papel crítico de las células mieloides en la progresión del cáncer. Los principales cambios que se producen en la población mioide, como consecuencia de la liberación de múltiples factores solubles por el MAT, incluyen la acumulación de MDSCs, defectos en la diferenciación y maduración de las células dendríticas y la acumulación y polarización de los macrófagos asociados a tumor ⁽¹⁴⁴⁾.

Revisaremos la implicación de la vía Notch en las diferentes poblaciones de células mieloides en cáncer:

- Células derivadas mieloides supresoras (MDSCs del inglés *Myeloid-Derived Suppressor Cells*).
- Células dendríticas (CDs).
- Macrófagos asociados a tumor (TAM del inglés *Tumor Associated Macrophages*).

4.1.1. Células Derivadas Mieloides Supresoras

MDSCs y cáncer

En el MAT se genera un entorno inflamatorio persistente que pone en marcha múltiples procesos, entre otros, hipoxia, privación de nutrientes, acidificación del medio, niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS) y liberación de factores de crecimiento. Estos procesos alteran la diferenciación de las células mieloides y dan lugar a la formación de subpoblaciones celulares con una potente actividad inmunosupresora y pro-tumoral, denominadas células derivadas mieloides supresoras. Las MDSCs tienen importantes implicaciones, no sólo en cáncer, sino también en otros procesos patológicos como procesos inflamatorios e infecciones crónicas, autoinmunidad o reacciones alérgicas ⁽¹⁴⁵⁾.

Las MDSCs representan uno de los reguladores clave en el proceso de immuno-edición en cáncer a diferentes niveles. Pueden inhibir directamente las células T efectoras y las células NK a través múltiples mecanismos, generan un MAT más inmunosupresor al reclutar células inmunitarias inhibitorias (células T y B reguladoras y TAM), promueven la supervivencia de las células tumorales y favorecen su evasión inmune, remodelan el MAT estimulando la invasión y la angiogénesis tumoral y también están implicadas en la formación del nicho pre-metastásico ^(146, 147). Por tanto, no es de extrañar que exista una amplia evidencia del rol de las MDSCs en la progresión tumoral y respuesta a los tratamiento antineoplásicos. En diferentes tipos de tumores sólidos, los niveles elevados de MDSCs se han relacionado con mal pronóstico y estadios avanzados de la enfermedad, así como, un posible marcador predictivo de respuesta a inmunoterapia basada en ICIs ^(148, 149). De ahí que, exista un interés creciente en la actualidad en desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas a contrarrestar los efectos inmunosupresores de la población de MDSCs.

Identificación y clasificación de MDSCs

La población de MDSCs está constituida por una población heterogénea de células progenitoras mieloides y células mieloides inmaduras que tienen funciones inmunosupresoras. Desde un punto inmunofenotípico, las MDSCs constan de dos grandes grupos de células llamadas **PMN-MDSC**, que son fenotípicamente y morfológicamente similares a los neutrófilos y **M-MDSC**, que son fenotípica y morfológicamente similares a los monocitos. En la mayoría de las neoplasias sólidas, entre ellas el CPNM, las PMN-MDSCs representan más del 80% de todas las subpoblaciones de MDSCs. Sin embargo, en otras neoplasias como el melanoma, las M-MDSCs constituyen la subpoblación dominante. Además de estas dos poblaciones principales, las MDSCs incluyen a un pequeño grupo de células con actividad formadora de colonias mieloides que abarcan una mezcla de precursores mieloides inmaduros que se denominan MDSCs en etapa temprana (**early-MDSCs**) o inmaduras.

En humanos, las MDSCs se describieron principalmente en sangre y tumores, así como, en la médula ósea en diferentes estadios. Los criterios para la caracterización fenotípica de estas células por inmunofluorescencia y citometría de flujo ahora están relativamente bien definidos. Entre las PBMCs, las PMN-MDSCs se definen como CD11b+ CD14- CD15+ o CD11b+ CD14- CD66b+, y las M-MDSCs como CD11b+ CD14+ HLA-DR-/low CD15-. CD33 se puede utilizar como marcador alternativo a CD11b, puesto que, las M-MDSCs expresan niveles más altos de CD33 que las PMN-MDSCs. Las células Lin- (incluyendo CD3, CD14, CD15, CD19, CD56) HLA-DR- CD33+ contienen grupos mixtos de MDSCs que comprenden progenitores más inmaduros. Es importante tener en cuenta que estos marcadores de superficie también se expresan en otras células mieloides ^(150, 151) (**Figura 13**). Por tanto, se han intentado identificar marcadores más específicos para diferenciar mejor las MDSCs de otras poblaciones mieloides (especialmente PMN-MDSCs de neutrófilos) y se han descrito marcadores de superficie celular asociados con funciones específicas de MDSCs tales como CCR5, CD84, LOX1 o FATP2 ⁽¹⁴⁵⁾. Estas dos subpoblaciones de MDSCs también tienen diferentes formas de suprimir la activación de las células T. Las PMN-MDSCs expresan un alto nivel de ROS y bajo nivel de NO, mientras que, en las M-MDSCs ocurre lo contrario. También se han realizado análisis transcriptómicos de las células mieloides infiltrantes de tumores en diferentes tipos de cáncer y se ha podido observar que los transcriptomas de PMN-MDSCs y M-MDSCs difieren entre sí y entre los de neutrófilos y monocitos, tanto en ratones como en humanos ⁽¹⁵²⁾.

Cell-surface marker	Myeloid cell type				
	Neutrophils	Eosinophils	PMN-MDSCs	Monocytes	M-MDSCs
CD11b	+	+	+	+	+
CD14	-	-	-	+	+
CD15	+	+	+	-	-
CD66b	+	+	+	-/low	-
HLA-DR	-	-	-	+	-/low

MDSC, myeloid-derived suppressor cell; M-MDSCs, monocytic MDSCs; PMN-MDSCs, polymorphonuclear MDSCs.

Figura 13. Expresión de marcadores de superficie en poblaciones mieloides y MDSCs

Nature Reviews Clinical Oncology, 2024 (Adaptada de *Lasser et al*)

Generación, expansión, reclutamiento y activación de MDSCs en cáncer

Las MDSCs se generan a través de un complejo proceso que inicialmente conlleva una fase de expansión y acondicionamiento en la médula ósea y el bazo, durante el cual las células mieloides inmaduras se acumulan y se vuelven inmunosupresoras. Posteriormente, se produce una fase de activación en el MAT en la cual estas células adquieren sus funciones inmunosupresoras máximas. Las MDSCs se reclutan, expanden y activan a través de una compleja red de factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) y PAMPs que derivan tanto de las células tumorales como de las condiciones asociadas al MAT (hipoxia, déficit de nutrientes, acidificación e inflamación crónica) (**Figura 14**) ⁽¹⁵³⁾.

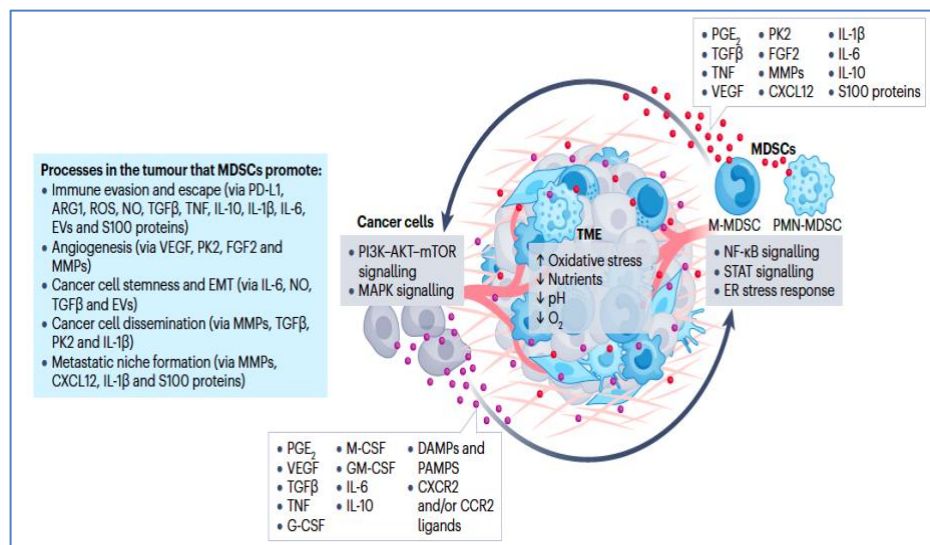


Figura 14. Generación, expansión, reclutamiento y activación de MDSCs

Nature Reviews Clinical Oncology, 2024 (Adaptada de *Lasser et al*).

Mecanismos de progresión tumoral mediados por MDSCs

Las MDSCs están implicadas en la progresión tumoral a través de múltiples mecanismos tanto inmunes como no inmunes (**Figura 14**):

- a) Inmuno-evasión** a través de la inhibición de la proliferación y de la actividad antitumoral de las células T efectoras mediante la producción de ROS, NO, arginasa y 2,3-dioxigenasa indolamina (IDO). Además, las MDSCs suprimen la citotoxicidad de la células NK e inducen la acumulación y activación en el MAT de otras células inmunosupresoras como linfocitos Treg, Breg y TAM a través de la secreción de diferentes citoquinas. Las MDSCs están estrechamente relacionadas con la generación de linfocitos T exhaustos en el MAT a través de la expresión de altos niveles de receptores inhibitorios de los puntos de control inmune como PD-L1.

- b) **Promoción de angiogénesis tumoral** a través de la liberación de factores pro-angiogénicos.
- c) **Estimulación de *Cancer Stem Cells* y de la TEM** a través de la producción de IL-6, NO y TGFb.
- d) **Favoreciendo invasión y diseminación tumoral** a través de la secreción de metaloproteinasas de matriz (MMPs).
- e) **Promoviendo la formación del nicho pre-metastásico** mediante la liberación de quimioquinas como CXCL12 o S100 y el establecimiento de metástasis a través de la producción de MMPs e IL-1b.

Implicación de la vía Notch en la generación, expansión, reclutamiento y activación de MDSCs en cáncer

Efectos de la vía Notch sobre la diferenciación de células mieloides hacia MDSCs

Como se ha comentado previamente, el papel de Notch en la mielopoiesis no se conoce con exactitud, pero varios estudios han mostrado que la señalización a través de la vía parece importante en la expansión y acumulación de MDSCs ⁽¹⁵⁴⁻¹⁵⁶⁾. En el contexto tumoral existen trabajos que demuestran que la **inhibición de la señalización de Notch en HSCs, MDSCs y CD**s está directamente implicada en la diferenciación anormal de las células mieloides. En un modelo murino transgénico, se pudo apreciar que el bloqueo de la escisión S2 o S3 del receptor Notch regulado por ADAM10 en los HSCs codujo a una inhibición del desarrollo de células B y a una acumulación de MDSCs ⁽¹⁵⁷⁾. *Cheng et al* ⁽¹⁵⁵⁾ evaluaron el papel de la señalización de la vía Notch en la diferenciación de las células mieloides en cáncer estudiando 3 poblaciones celulares: CD34+ HSC en médula ósea, Gr-1+CD11b+ MDSCs en bazo y CDs CD11c+ MHC II+ en bazo. Observaron que la expresión de genes diana de Notch (*Hes1* y *Hes5*) estaba reducida significativamente en las 3 poblaciones celulares comparada con los controles no tumorales. Estos investigadores evaluaron también la expresión de *Hes1* en PMN-MDSCs de sangre periférica obtenidas de pacientes con cáncer y fue significativamente más baja que la procedente de donantes sanos. Además, los autores confirmaron una disminución significativa de todos los ligandos de Notch (*Jag1*, *Jag2*, *DLL1*, 3 y 4) en la médula ósea de un modelo tumoral murino comparado con ratones sanos. El grupo de *Wang et al* ⁽¹⁵⁸⁾ también confirmó en un modelo tumoral murino que la señalización de Notch está inhibida en las MDSCs. Aislaron MDSCs periféricas de los bazos de ratones y encontraron que la expresión de receptores (*Notch1* y 2), ligandos (*Dll1*, *Dll4* y *Jag1*) y genes diana (*Hes1* y 5 y *Hey1* y 2) de la vía Notch estaba suprimida de forma significativa. Además, también observaron que si se modulaba la señalización a través de la vía Notch se podía influir en el proceso de diferenciación y en la capacidad inmunosupresora de las MDSCs. Observaron una reducción en la proporción de M-MDSCs a expensas de una mayor proliferación, expansión y acumulación de PMN-MDSCs en órganos linfoides y MAT, las cuales presentaron una menor capacidad inmunosupresora. Estos investigadores

también observaron que la señalización a través de la vía Notch juega un papel clave en destino de las MDSCs hacia una diferenciación monocítica o polimorfonuclear MDSC ⁽¹⁵⁹⁾. Finalmente otros estudios sugieren el potencial **papel de los ligandos de Notch Jagged-1 y DLL-1 en la generación de MDSCs en la médula ósea**. DLL-1 promueve la diferenciación de células dendríticas, mientras que, Jag-1 bloquea su diferenciación a través de un efecto opuesto sobre la vía de Wnt e induce la acumulación de células mieloides inmaduras ⁽¹⁶²⁾.

En conclusión, parece clave el papel de la vía Notch en la diferenciación de las células mieloides en el MAT siendo su expresión diferente en función de la población mioide, pero en general, se describe una inhibición de la vía en MDSCs y TAM y una activación en CDs (**Figura 15**).

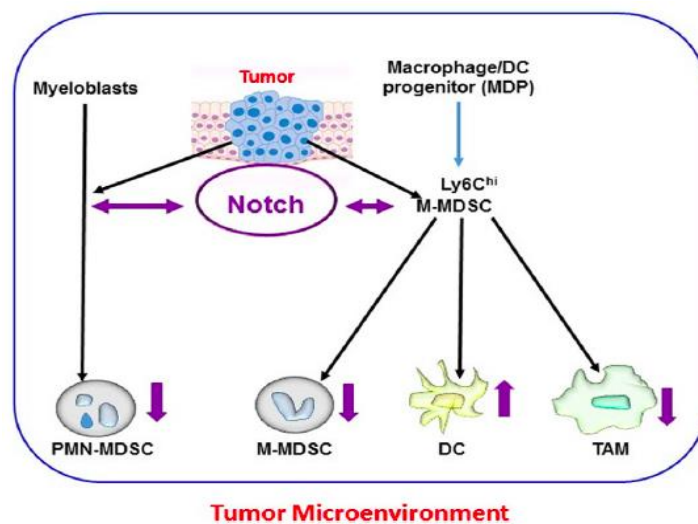


Figura 15. Diferenciación de las células mieloides en el MAT mediada por Notch

Nature Reviews Clinical Oncology, 2024 (Adaptada de *Lasser et al*).

Efectos de la vía Notch sobre *Cancer Stem-like Cells* mediados por MDSCs

Las células inmunes pueden promover la progresión tumoral a través de varios mecanismos que incluyen la inducción de la proliferación de CSCs. Las células madre o células iniciadoras de tumores son una subpoblación de células tumorales que median la formación de tumores primarios y metástasis mediante propiedades de auto-renovación y evasión inmune. Además, están asociadas con la progresión, la resistencia al tratamiento, y la supervivencia en pacientes con cáncer ⁽¹⁶³⁾. Las MDSCs pueden favorecer la progresión tumoral y la resistencia a los tratamientos al promover las propiedades de CSCs en las células tumorales y la vía Notch está implicada en este proceso. *Welte et al* ⁽¹⁶⁴⁾ mostraron en un modelo murino de cáncer de mama que la producción de G-CSF por las células tumorales mediada por la vía mTOR promovía la

acumulación de MDSCs. Estas células aumentaban de forma recíproca la expresión de genes relacionados CSCs en las células tumorales a través de la activación de la vía Notch. En la misma línea, *Peng et al* ⁽¹⁶⁵⁾ mostraron que la presencia de MDSCs en muestras de tejido tumoral de cáncer de mama se correlacionaban con la existencia de CSCs y una mayor proporción de ambas poblaciones predecían una peor supervivencia de forma independiente. Estos autores sugieren que las MDSCs promueven y mantienen propiedades de CSCs en las células tumorales a través de la intercomunicación entre las vías STAT3 y Notch.

Efectos de la vía Notch sobre la migración y reclutamiento de MDSCs

La vía de Notch también está implicada en la generación del nicho metastásico a través de la promoción de la migración y reclutamiento de MDSCs. En este sentido cabe destacar la relación de la vía de Notch con FBXW7, una E3 ubiquitin protein ligasa implicada en la degradación de diferentes onco-proteínas implicadas en crecimiento tumoral. El gen que codifica *F-box protein FBXW7* se comporta como un supresor tumoral en el MAT y puede inhibir el desarrollo de metástasis. *Yumimoto et al* ⁽¹⁶⁶⁾ mostraron que la delección de *Fbxw7* en células estromales inducía una acumulación del DICN1 y, consecuentemente, una activación transcripcional de CCL2. CCL2 es una quimioquina implicada en el reclutamiento de MDSCs y macrófagos en el nicho pre-metastásico. En la misma línea *Otani et al* ⁽¹⁶⁷⁾, describieron el reclutamiento de MDSCs mediado por la activación de Notch en TAMs y la consecuente liberación de quimioquina CCL2 e IL-10 en un modelo de glioma. Se llegan a conclusiones similares en un modelo de cáncer colorrectal en el que Notch3 aumentó la expresión de varias citoquinas y promovió el reclutamiento de MDSCs y TAMs en el MAT ⁽¹⁶⁸⁾.

Expresión diferencial de ligandos de Notch en MDSCs del MAT

La señalización a través de la vía Notch parece estar suprimida en los linfocitos T CD8 del MAT y esa inhibición podría estar mediada por la expresión diferencial de ligandos de Notch en el estroma tumoral. Podemos destacar en este sentido, el papel de las MDSCs en la generación de un microambiente inmunosupresor mediante la alta expresión de ligandos Jagged-1 y 2. Así *Sierra et al* ⁽¹⁶⁹⁾ estudiaron la expresión de Jag1 y 2 en tumores cultivados *in vitro* y procedentes de ratones y detectaron una mayor expresión de Jag1 y 2 en los tumores subcutáneos comparados con las células tumorales cultivadas *in vitro*. Además, midieron la expresión de RNAm de Jagged1/2 en las 2 poblaciones celulares mayoritarias aisladas en un modelo murino 3LL de carcinoma de pulmón (células tumorales CD45-CD49+ y células mieloides CD45+CD11b+) y encontraron unos niveles elevados de expresión en ambas poblaciones ⁽¹⁷⁰⁾.

La expresión de ligandos de Notch en MDSCs circulantes pueden potenciar la capacidad de diseminación y metástasis de las CTCs. Un trabajo reciente publicado por *Sprouse et al* ⁽¹⁷¹⁾ nos muestra que las MDSCs circulantes pueden interactuar directamente con las CTCs y promover su supervivencia y potencial metastásico a través de la interacción Jagged1-Notch1 en los clusters CTCs/PMN-MDSCs. En este trabajo se aislaron por citometría de flujo CTCs y PMN-MDSCs de muestras de sangre periférica de pacientes con melanoma y cáncer de mama. Los estudios de co-cultivo *in vitro* demostraron una producción aumentada de ROS y una alta expresión de Jagged1 en las MDSCs de los clusters que condicionaba la sobreexpresión del receptor Notch1 en CTCs a través del eje ROS-NRF2-ARE. La inhibición de la producción de ROS bloqueaba las interacciones CTC/MDSCs y conducía a una reducción de la proliferación y supervivencia de las CTCs.

En resumen, la señalización a través de la vía de Notch modula de forma decisiva la biología de las MDSCs en múltiples puntos dependiendo del nivel de expresión de receptores y ligandos implicados, del estadio de la diferenciación mieloide, de factores del MAT y de la subpoblación de MDSCs considerada.

4.1.2. Macrófagos Asociados a Tumor

Los TAMs son uno de los componentes más importantes del MAT y suelen adquirir un fenotipo M2 aunque, al igual que ocurre en condiciones fisiológicas, su fenotipo es muy plástico y puede cambiar según el contexto. Un recuento elevado de TAMs se ha relacionado con aumento de la angiogénesis, mayor invasión de las células tumorales, supresión de la inmunidad adaptativa antitumoral al reclutar MDSCs y células Treg y, en definitiva, con mal pronóstico en cáncer ⁽¹⁷²⁻¹⁷⁴⁾.

Efectos de la vía de Notch en la población de TAMs

En general, como ya se ha comentado previamente, la señalización a través de la vía de Notch se regula positivamente en los macrófagos activados determinando un fenotipo M1. En el contexto tumoral, parece que la señalización a través de la vía Notch tiene un papel crítico modulando la **polarización M1 versus M2 de los macrófagos** en la respuesta inmune antitumoral. En este sentido, *Wang et al* ⁽¹⁷⁵⁾ mostraron en un modelo tumoral que los TAMs con fenotipo M2 presentaban una supresión de la señalización de la vía Notch con unos niveles más bajos de ligandos DLL, receptores Notch1 y 2 y *Hes1* respecto a la población de macrófagos M1. En este modelo, la activación de la señalización de Notch en los macrófagos promovió un cambio de fenotipo a M1 y una respuesta inmune anti-tumoral Th1 a través de un cambio en la expresión de proteínas de la familia SOCS3.

De nuevo, parece que la **expresión diferencial de los ligandos de Notch en el MAT puede tener su implicación en la polarización de la población de TAMs**. En este sentido tenemos varios trabajos en carcinoma de mama ⁽¹⁷⁶⁻¹⁷⁷⁾ y en adenocarcinoma de pulmón y páncreas ^(179, 180) en los que la expresión de Jag1 en el estroma tumoral estaría asociada con la infiltración de TAMs. En estos estudios la expresión de RNAm de Jag1 se ha correlacionado con una alta densidad de infiltración de TAMs con fenotipo M2 y con peor SLE y SG. Diferentes IL y quimioquinas podrían estar implicadas en la polarización de los TAMs mediada por Jag1. Así, en otro modelo de cáncer de mama, la señalización de la vía Notch mediada por Jag1 aumentó la secreción de IL-4 e IL-6 induciendo una polarización de TAMs a un fenotipo M2 y favoreciendo la progresión tumoral ⁽¹⁷⁸⁾. En un modelo de ratones portadores de glioma, la terapia con virus oncolíticos indujo la expresión de Jag1. La activación de Notch en los TAMs mediada por Jag1 promovió la secreción de CCL2, amplificando el reclutamiento de M-MDSC y atenuando la respuesta inmune antitumoral de las células T ⁽¹⁸¹⁻¹⁸²⁾. Otra de las dianas de la señalización de la vía Notch implicada en la **polarización de los macrófagos y en la generación de TAMs** que se han descrito son los **microRNAs**. Varios de estos miRNAs, como miR-148a-3p ⁽¹⁸³⁾ y miR-125a ⁽¹⁸⁴⁾, se encuentran regulados por la vía Notch y participan en la diferenciación y activación de los macrófagos hacia TAMs.

La vía de Notch parece también implicada en el **proceso de reclutamiento de los TAMs al MAT** a partir de los monocitos circulantes. Diversas quimioquinas, tales como CCL2, CCL5, CCL7, CXCL8 y CXCL12, liberadas por las células tumorales inducen la migración, diferenciación y supervivencia de las células mieloides que infiltran el tumor. En diferentes modelos de cáncer de mama, se pone de manifiesto que la señalización CCR2/CCL2 parece clave en el reclutamiento de monocitos hacia el MAT y su diferenciación a TAMs ⁽¹⁸⁵⁻¹⁸⁶⁾. En estos trabajos se muestra cómo la vía de Notch regula la expresión de dos importantes citoquinas pro-inflamatorias (IL1b y CCL2) en la célula tumoral, condicionando la adhesión de monocitos a los vasos sanguíneos, su extravasación y migración hacia el MAT para diferenciarse hacia TAMs con un fenotipo pro-tumoral. Además, la vía Notch también regula la activación de las células tumorales mediada por la liberación de TGFb por parte de los TAMs potenciando la expresión de Jagged1. La señalización Notch/Jagged1 amplifica de nuevo la secreción de citoquinas/quimioquinas aumentando el reclutamiento de TAMs. De esta manera, se establece un circuito de regulación paracrina entre estas dos poblaciones celulares dependiente de la señalización de Notch que promueve la supervivencia tumoral.

4.1.3. Células T reguladoras

Las células Treg son un subconjunto de células T CD4+ que se encuadran dentro de las denominadas células inmunitarias con funciones supresoras. Las Treg pueden desarrollarse en el timo, como células Treg naturales (nTreg), y se caracterizan por la expresión de la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25) y el factor de transcripción nuclear *Foxp3*, pero también pueden originarse a nivel periférico a partir de células T CD4+ *naïve* mediante la estimulación por contacto directo con CPAs o por factores solubles como TGFb e IL-2 (pTreg). Las células Treg regulan las respuestas inmunes al prevenir la activación y expansión de células T auto-reactivas, manteniendo, de esta manera, la homeostasis inmunológica y evitando el desarrollo de enfermedades autoinmunes, reacciones de hipersensibilidad o el rechazo de trasplantes. Las células Treg pueden ejercer sus funciones supresoras sobre la población T efectora mediante diferentes mecanismos: contacto celular directo con células T CD4+ auto-reactivas, eliminación de células T efectoras o creación de un microambiente inmunosupresor mediante la liberación de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGFb ⁽¹⁸⁷⁾. La infiltración de Treg se asocia con una disminución en la proporción de linfocitos T citotóxicos, progresión tumoral y mal pronóstico en diferentes tipos de cáncer ^(188, 189).

Efectos de vía Notch en la diferenciación y expansión de células Treg

La vía de Notch está implicada en la diferenciación *de novo* de células nTreg en el timo, así como, en la inducción y/o expansión de células pTreg a nivel periférico. En cuanto al papel de Notch en la **generación de células nTreg en el timo** la evidencia disponible es escasa y contradictoria. Por un lado, tenemos trabajos que evidencian el efecto de Notch en la regulación de la transcripción de *Foxp3* en nTreg ⁽¹⁹⁰⁻¹⁹²⁾. Por otro lado, encontramos otros trabajos en los que la delección de Notch1 no tendría impacto en la población de células nTreg en el timo ⁽¹⁹³⁾. Trabajos posteriores sugieren que la activación del TCR sería el principal responsable de la adquisición y mantenimiento del fenotipo Treg a partir de los precursores tímicos y que la vía Notch tendría un papel secundario en el desarrollo de las nTreg incidiendo en la expresión de *Foxp3* ⁽¹⁹⁴⁾. En cuanto a la implicación de la vía Notch en la **inducción y/o expansión de las pTreg, así como, en el mantenimiento de sus funciones inmunosupresoras a nivel periférico** los datos experimentales son más robustos e implicarían tanto a la vía canónica como no canónica. *Chatila et al* ⁽¹⁹⁶⁾ usaron diferentes modelos murinos en los que se bloqueaba o activaba la señalización de la vía Notch en la población de células Treg para evaluar el efecto a nivel periférico en sus funciones inmunosupresoras. La sobreexpresión del DICN1 en Treg producía linfo-proliferación, apoptosis de Treg, reprogramación de Treg hacia un fenotipo Th1 y autoinmunidad al suprimir la transcripción de genes críticos en la función inmunosupresora de las Treg tanto de forma directa (vía canónica) como de forma indirecta a través de Rictor-AKT-Foxo1 y su efecto sobre la regulación epigenética de *Foxp3* (vía no canónica). En muchos casos, TGFb representa la vía de señalización

predominante, de tal manera que, la **vía de Noth ejercería un papel secundario cooperando con TGFb** en la inducción de Treg. Ambas vías de señalización cooperan en el mantenimiento de la población pTreg a través de la activación de la transcripción de *Foxp3*, mediante la interacción de Notch1/CSL y pSMAD3 en su región promotora ⁽¹⁹⁹⁾. Además, la interacción entre las vías de señalización de Notch y TGF-b también estaría implicada en la regulación de la función inmunosupresora de las Treg sobre las células T efectoras. *Ostroukhova et al* ⁽²⁰⁰⁻²⁰¹⁾ demostraron que las células Treg que expresan en su membrana TGFb son capaces de activar la vía Notch en sus células diana y ejercer sus funciones inmunosupresoras sobre la población T efectora.

En diferentes **modelos tumorales** podemos comprobar la implicación de la **señalización de Notch en la expansión y función inmunosupresora de las Treg**. La alta expresión de DLL3 en cáncer de mama se correlacionó con una proporción elevada de células Th foliculares y Treg y con un peor pronóstico ⁽¹⁹⁷⁾. Otros estudios en cáncer gástrico y melanoma muestran que la alta expresión de Notch en el MAT se asocia con una menor infiltración de células T CD8+ y un aumento de Treg y MDSCs mediante la regulación positiva de TGFb ^(198, 202).

Efecto de la expresión de ligandos Jagged en el MAT en inducción/expansión de Treg

En este sentido, de nuevo, la expresión diferencial de los ligandos de Notch puede ser clave en la homeostasis de la población de Treg en el MAT. Como se ha comentado previamente, la interacción de los ligandos/receptores de la vía Notch entre las CPAs y los linfocitos T puede modular la función de los linfocitos T colaboradores *naive* y determinar la polarización de la respuesta inmune Th1 vs Th2/Th17/Treg. De esta manera, las CDs con una alta expresión de ligandos Jag-1 pueden inducir la polarización de las células T hacia un fenotipo T regulador ⁽²⁰³⁾. Esta hipótesis se pone de manifiesto en varios trabajos en los que la **expresión de ligandos tipo Jagged en células del microambiente**, tales como CPAs, HSCs, células *stem* mesenquimales del estroma o MDSCs, pueden determinar una activación de la señalización de la vía Notch y conducir a una **inducción de Treg a partir de células T CD4+ *naive* o a una expansión de células Treg pre-existentes** ^(204-208, 209).

4.2. PROMOCIÓN DE UN MICROAMBIENTE PRO-TUMORAL

La señalización a través de la vía Notch está implicada en la modificación del microambiente hacia un rol pro-tumoral ejerciendo un papel clave en la regulación de los tipos celulares responsables del soporte del MAT, así como, en la angiogénesis tumoral y el fenómeno de transición epitelio-mesénquima. Analizaremos el papel de Notch en dos poblaciones claves en el soporte del MAT:

- Fibroblastos asociados a cáncer (CAFs, del inglés *Cancer-associated fibroblasts*).
- Neutrófilos asociados a tumor (TANs, del inglés *Tumor-associated neutrophils*).

4.2.1. Fibroblastos Asociados a Cáncer

Los CAFs constituyen el principal componente celular en el MAT, existiendo una evidencia creciente de su implicación en la progresión tumoral en diferentes tipos de cáncer. Uno de sus principales mecanismos para promover un microambiente pro-tumoral es el desarrollo de una angiogénesis aberrante y parece que Notch estaría también implicada en este proceso. En un modelo celular de cáncer de pulmón, el contacto célula-célula entre CAFs y células tumorales, mediado por la señalización Jag1/Notch2, indujo la formación de una red vascular aberrante que favoreció la infiltración de células tumorales y neutrófilos tipo N2 en el MAT ⁽²¹⁰⁾.

Tenemos más evidencia de la importancia de la vía Notch en la interacción entre la célula tumoral y los CAFs para promover un estroma pro-tumoral. Los CAFs liberan estaniocalcina 1 (STC1) que interacciona directamente con receptores Notch1 en células de hepatocarcinoma potenciando su progresión tumoral. Además, Notch1 es capaz de regular STC1 a nivel transcripcional promoviendo, de esta manera, la expansión del estroma tumoral ⁽²¹¹⁾. En un modelo de cáncer de mama expuesto a radiación, se objetivó una expansión de CSCs que sobre-expresaban DLL1 y favorecían el reclutamiento de CAFs en el MAT dependiente de IL-6. Posteriormente, la activación de la señalización de Notch mediada por DLL1 en CAFs desencadenó la activación de la vía Wnt en CSCs con sobre-expresión DLL1 generando células tumorales más radorresistentes ⁽²¹²⁾. Sin embargo, también hay evidencia de que los CAFs activados por Notch pueden ejercer un efecto de supresión tumoral ^(213, 214).

4.2.2. Neutrófilos Asociados a Tumor

Los TANs tienen un papel relevante en la migración y extravasación de las células tumorales, así como, en la formación del nicho pre-metastásico. *Wood et al* ⁽²¹⁵⁾ documentaron en tejido de cáncer de colon metastásico la presencia de neutrófilos con activación de la señalización Notch y TGF- β . En un estudio retrospectivo en muestras de tejido parafinadas de cáncer de ovario se analizó la población de TANs. Un nivel elevado de TANs se asoció con una disfunción de células T CD8+ a través de la expresión de Jag2 condicionando un peor pronóstico. IL-8 contribuyó al reclutamiento de TANs y a la inducción de la expresión de Jag2 en TANs ⁽²¹⁶⁾.

4.2.3. Angiogénesis tumoral

La angiogénesis tumoral es un evento clave en los procesos de progresión tumoral, invasión y metástasis. La señalización a través de la vía Notch (DLL4-Notch1) regula de forma fisiológica la angiogénesis, coordinando la formación correcta de brotes y ramificaciones de neovasos a través del contacto directo célula-célula, del endotelio tipo “tip” y “stalk” del brote angiogénico.

Efectos de la vía Notch en la angiogénesis tumoral

En el contexto tumoral, la vía **Notch** está implicada en dos funciones claves del **endotelio**: el **mantenimiento de las CSCs** y la **formación de nichos pre-metastásicos**. En este sentido, en un modelo de neoesferas de glioblastoma se ha puesto de manifiesto la expresión de ligandos de Notch en las células endoteliales y de receptores de Notch en las células tumorales adyacentes. El co-cultivo de ambas poblaciones celulares daba como resultado el crecimiento tumoral, así como, un aumento en las propiedades de auto-renovación de las CSCs ⁽²¹⁷⁾. En la misma línea, en modelos murinos de cáncer de ovario y carcinoma de cabeza y cuello destaca el papel clave de la expresión de ligandos Jagged1 en el endotelio del MAT en la progresión tumoral, al favorecer la proliferación y resistencia al tratamiento de células neoplásicas, así como, la angiogénesis tumoral ⁽²¹⁸⁻²¹⁹⁾. La señalización de Notch está implicada en la promoción de un endotelio pro-inflamatorio, lo que da como resultado la apertura de uniones gap y favorece la adhesión de las células tumorales. En un trabajo de *Wieland et al* ⁽²²⁰⁾ se ha demostrado que las células tumorales y las células mieloides pueden activar Notch1 endotelial en un sitio metastásico distante. La activación sostenida de Notch indujo un endotelio inflamado que expresaba la molécula de adhesión VCAM1 promoviendo aún más la infiltración de neutrófilos, la adhesión de las células tumorales al endotelio y la intravasación en el tumor.

4.2.4. Transición Epitelio-Mesénquima y desarrollo de metástasis

La capacidad de las células tumorales de invadir los tejidos adyacentes y de colonizar órganos distantes son características distintivas del cáncer. Las células epiteliales, para poder escapar de su microambiente local, ponen en marcha un proceso de desarrollo reversible denominado TEM, durante el cual la pérdida de características epiteliales (expresión de E-cadherina y moléculas de adhesión célula-célula) hace que las células adquieran características mesenquimales que les permiten invadir, resistir la apoptosis, diseminarse y adquirir características de CSCs ⁽²²¹⁾.

Efectos de la vía Notch en la TEM y desarrollo de metástasis

Notch es una de las vías de señalización implicadas en la regulación de la TEM. En este sentido, varios estudios pre-clínicos demuestran el papel que puede tener la **expresión de ligandos de Notch Jagged en la activación del proceso de TEM en la célula tumoral**. La expresión de ligandos Jag1 y activación de Notch1 es responsable de la TEM en modelos de cáncer de mama. Este proceso, parece estar dirigido por uno de los genes diana de Notch, Slug, que actuaría como un represor transcripcional de E-cadherina y conduciría a la activación de b-catenina ⁽²²²⁾. La implicación de Jag1 en el proceso de TEM se ha descrito también en otros tipos tumorales como cáncer de cérvix ⁽²²³⁾, hepatocarcinoma ⁽²²⁴⁾ y cáncer de páncreas ⁽²²⁵⁾. **Jag1 también está implicado en la capacidad de migración y metástasis de la célula tumoral** en cáncer de mama ⁽²²⁶⁾, próstata ⁽²²⁹⁾ y colon ⁽²³⁰⁾, así como, en la especificidad de tejido en la diseminación del

cáncer de mama ^(227, 228). Como ya se ha comentado con anterioridad, la expresión de Jag1 por IHQ se correlacionó con mayor riesgo de recaída metastásica. Además, en este trabajo, se obtuvieron muestras de sangre de pacientes con cáncer de mama metastásico y más del 85% de las CTCs aisladas expresaban Jag1 y se asociaron a una SLP más corta, lo que sugiere de nuevo la implicación de Notch en la supervivencia de las CTCs y su capacidad metastásica ⁽¹⁷⁶⁾.

4.3. DISFUNCIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL ADAPTATIVA

La respuesta inmune antitumoral adaptativa está mediada por:

- Células dendríticas.
- Linfocitos T.
- Puntos de control inmune.

4.3.1. Células Dendríticas

Los defectos en la diferenciación, maduración y función de las CDs constituyen una de las principales alteraciones que se producen en la respuesta inmune adaptativa en pacientes con cáncer. En líneas generales, la señalización a través de la vía de Notch promueve la diferenciación, maduración y función de las CDs.

Efectos de la vía Notch sobre la diferenciación de CDs

La diferenciación de las CDs desde las HSCs está controlada por una compleja red de factores de crecimiento y citoquinas, así como, por el contacto directo célula-célula en el estroma de la médula ósea. En este sentido, varios estudios han evidenciado el **papel clave de la señalización de Notch en la diferenciación y maduración de las CDs** ⁽²³¹⁾. Así, los ligandos de Notch expresados en las células del estroma parecen regular de forma opuesta la diferenciación de las CDs, de tal manera que, DLL1 promueve su diferenciación mientras que Jag1 la inhibe al promover la acumulación de sus precursores inmaduros, como se puso de manifiesto en un modelo de mielopoyesis inducida ⁽²³²⁾. De nuevo, la expresión diferencial de ligandos de Notch en el microambiente puede condicionar la diferenciación de las CDs y, probablemente, en el contexto tumoral la expresión aumentada de ligandos Jagged en el MAT podría estar implicada en los defectos de diferenciación de las CDs.

Efectos de la vía Notch sobre la maduración de las células dendríticas

La señalización a través de la vía Notch está involucrada tanto en la maduración funcional de las CDs como en sus funciones efectoras que median la respuesta de las células T. Como se ha comentado previamente, la interacción de los ligandos/receptores de la vía Notch entre las CDs y los linfocitos T puede modular la función de los linfocitos T colaboradores *naïve* y linfocitos T efectores y determinar la polarización de la respuesta inmune Th1 versus Th2/Th17/Treg. Por tanto, la expresión diferencial de los ligandos de Notch en las CDs pueden modular la respuesta de la célula T en el contexto de la inmunidad anti-tumoral. Esto se ha puesto de manifiesto por parte del grupo de *Tchekneva et al* ⁽²⁰³⁾ en un estudio en el que usaron métodos genéticos y farmacológicos para evaluar el papel de los ligandos DLL y Jag expresados en CDs en la regulación de la respuesta inmune mediada por célula T en un modelo murino de cáncer de pulmón LLC y páncreas MT5. Estos investigadores generaron un modelo de ratón genéticamente modificado con delección homo o heterocigota de los alelos de DLL1 y Jag2 en CDs CD11c+ y observaron un crecimiento acelerado de los tumores y una menor supervivencia en los ratones con delección para ligandos DLL1 en CDs, pero no en el caso de delección de Jag2, comparado con los ratones *wild-type*. Estos hallazgos ponen de manifiesto que las CDs que expresan DLL1, pero no Jag2, son indispensables para la inducción de una respuesta inmune específica de antígeno y para la generación de linfocitos T efectores y memoria. Además, analizaron las poblaciones celulares inmunes que infiltraban tumores primarios pulmonares humanos y observaron una correlación significativa entre la expresión de Jag1 o Jag2 en CDs y la expresión de PD-1 en linfocitos T CD8+ efectores y memoria, presentando Jag1 la mayor correlación. Estos efectos se han podido reproducir en un modelo de cáncer de colon, donde la inhibición de Notch2 interfirió en la presentación de antígenos a linfocitos T CD8+ a través de una supresión del receptor de quimioquina CCR7 ⁽²³³⁾. La vía Notch también parece implicada en la regulación de las células NK mediada por CDs. La sobre-expresión de ligandos Jag2 en CDs aumentó la citotoxicidad de células NK y retrasó la proliferación en un modelo de linfoma de células B ⁽²³⁴⁾.

4.3.2. Linfocitos T

La vía de Notch en el linfocito T CD8+

Los linfocitos T CD8+ citotóxicos son el brazo efector de la inmunidad adaptativa antitumoral y numerosos trabajos han mostrado que muchas de sus funciones dependen de la señalización a través de la vía Notch. De esta manera, podemos ver como la **supresión de la vía Notch en el linfocito T CD8+** en diferentes modelos animales conduce a una respuesta inmune antitumoral deficiente, siendo este uno de los eventos clave dentro de los mecanismos de evasión del sistema inmune que promueve la célula tumoral en el MAT ⁽²³⁵⁻²³⁸⁾.

Expresión diferencial de ligandos de Notch en el estroma tumoral y respuesta anti-tumoral mediadas por linfocito T CD8+

Esta supresión de la vía de Notch en los linfocitos T CD8 que infiltran el tumor podría estar mediada por la expresión diferencial de ligandos de Notch en el estroma tumoral, y, en este sentido, *Sierra et al*⁽¹⁶⁹⁾ publicaron que el MAT suprime la expresión de Notch1 y 2 en las células T intra-tumorales pero no en las células T periféricas aisladas del bazo en un modelo tumoral murino. Podemos destacar, el papel de las MDSCs en la generación de un MAT inmunosupresor mediante mecanismos dependientes de NO y por la alta expresión de ligandos Jag-1 y 2. En la misma línea, en un modelo murino de cáncer de mama la activación de Notch inducida por su ligando Jag1 derivado de las células tumorales fomentó la producción de citoquinas, IL-6 y WISP-1, que contribuyeron al reclutamiento de macrófagos al MAT. Los macrófagos activados por Notch interactúan con las células T infiltrantes para suprimir su proliferación y activación, impulsando, de esta manera, la evasión inmune adaptativa de las células tumorales⁽²³⁹⁾. Varios estudios pre-clínicos avalan esta hipótesis y demuestran que la reactivación de la vía de Notch en el linfocito T CD8+ es capaz de vencer la inmunosupresión generada por el tumor en su microambiente:

- Una activación selectiva de DLL1-Notch en los precursores de la médula ósea aumentó la activación de las células Th1 resultando en un incremento de la infiltración intra-tumoral de células T CD8+, elevó el número de linfocitos T CD8 memoria, disminuyó la población de Treg e inhibió el crecimiento tumoral en un modelo murino de cáncer de pulmón⁽²⁴⁰⁾.
- La reactivación de la vía Notch mediante la transferencia adoptiva transgénica condicional de su dominio intracelular en el linfocito T CD8+ aumentó su respuesta citotóxica con una mayor producción de INFγ y granzima B y permitió vencer la inmunosupresión generada por MDSCs *in vivo*⁽¹⁶⁹⁾.
- El tratamiento con un inhibidor del proteasoma en un modelo tumoral murino provocó una mayor expresión de INFγ y otras moléculas efectoras en células T CD8 a través de la regulación positiva de varios componentes de la vía Notch⁽²⁴¹⁾.
- El co-cultivo de células estromales con expresión de DLL1 con células T CD4+ y CD8+ generó células T *stem* memoria altamente proliferativas y de larga duración. Además, estas células dejaban de expresar marcadores de linfocito T exhausto y tenía un efecto antitumoral⁽²⁴²⁾.

Por el contrario, el bloqueo de la señalización de Notch en un modelo de glioma facilitó la evasión inmune y la progresión del tumor disminuyendo la expresión de citoquinas dependientes de CMH tipo I y de INFγ, así como, el reclutamiento de células T CD8+⁽²⁴³⁾.

La vía Notch en el linfocito T CD4+ y la polarización de la respuesta inmune

Como se ha comentado previamente, la interacción de los ligandos/receptores de la vía Notch entre las CPAs y los linfocitos T puede modular la función de los linfocitos T colaboradores *naïve* y determinar la polarización de la respuesta inmune Th1 vs Th2/Th17/Treg. De esta manera, las CPAs con alta expresión de ligandos DLL1 o DLL4 pueden polarizar a los linfocitos T CD4+ hacia una respuesta inmune de tipo Th1 (antitumoral). Por su parte, las CPAs con alta expresión de ligandos Jag-2 y baja expresión de ligandos DLL1 y 4 promueven el desarrollo de respuestas inmunes de tipo Th2 o Th17, mientras que, aquellas con una alta expresión de ligandos Jag-1 pueden inducir la polarización de las células T hacia un fenotipo T regulador favoreciendo mecanismos de evasión de la respuesta inmune en el MAT ⁽²⁰³⁾.

4.3.3. Puntos de control inmunes

PD-1 es un receptor de membrana que pertenece a la familia de CD28 y que se expresa en linfocitos T activados, células NK y células mieloides. PD-1 interacciona con 2 ligandos de la familia B7, PD-L1 y PD-L2. PD-L1 se expresa ampliamente en CPAs y HSCs. La interacción PD-1 y PD-L1 activa una vía inhibitoria que conduce a un bloqueo de la respuesta inmune celular mediada por el linfocito T CD8, constituyendo un mecanismo fundamental de evasión de la respuesta inmune en el contexto del cáncer. Los niveles de expresión de PD-1 vienen determinados por el grado de transcripción de su región promotora *Pdcd1*. Se han descrito tanto factores que activan la transcripción de *Pdcd1* [NFATc1, inducido por la activación del TCR del linfocito T, o IRF9, inducido por INF alfa] como factores que reprimen su transcripción ⁽²⁴⁴⁾.

Efecto de Notch sobre la expresión de puntos de control inmune como PD-1

La vía de Notch también juega un papel clave en la expresión de PD-1 al ejercer un control directo en la transcripción de *Pdcd1* durante la activación del linfocito T CD8+ ⁽²⁴⁵⁾. En modelos *in vitro* se ha demostrado que la inhibición de Notch reduce la expresión en superficie de PD-1 en linfocitos CD8 tras la estimulación antigénica. Por tanto, la inducción de la transcripción de PD-1 durante la activación del linfocito T CD8 estaría mediada por la activación del TCR y consiguiente translocación del factor transcripcional NFAT al núcleo, así como, por la interacción entre ligandos de Notch expresados por las CPAs y receptores Notch expresados en el linfocito T CD8. Además de potenciar los efectos antitumorales de las células T, la señalización de Notch podría acelerar el agotamiento de las células T. Por tanto, la vía de Notch podría tener también un efecto negativo durante el proceso de activación de la célula T CD8 y, de esta manera, la presentación antigénica mantenida por CPAs que expresan ligandos de Notch puede conducir una activación de la señalización de Notch sostenida que lleve a una inhibición funcional del linfocito T CD8 al inducirse la expresión de PD1 de forma permanente en el contexto del cáncer e infecciones crónicas ⁽²⁴⁶⁾.

En un modelo de cáncer gástrico con alta expresión de ubiquitina-4, que se encarga de la degradación de un represor de la vía Notch (Numb), se objetivó aumento de la señalización de la vía y una sobre-expresión de PD-1 en células tumorales ⁽²⁴⁷⁾. En el mismo sentido, la señalización a través de Notch/c-Myc/EZH2 indujo la expresión de PD-L1 en células de leucemia linfática crónica (LLC), lo que contribuyó a una mayor resistencia a las células T activadas en un modelo murino de LLC ⁽²⁴⁸⁾. En un modelo de CSCs en cáncer de mama, la activación de Notch3 aumentó la expresión de PD-L1 a través de mTOR y potenció las características *stem cells* ⁽²⁴⁹⁾. En un estudio retrospectivo con muestras tumorales de pacientes con cáncer de páncreas resecao, existió correlación entre una alta expresión proteica de DLL3 y la expresión de PD-L1 y se asociaron con una disfunción de linfocitos T ⁽²⁵⁰⁾.

Por tanto, podemos ver como la vía Notch puede favorecer tanto la función supresora de las células Treg como promover la adquisición de un fenotipo T exhausto a través de la modulación de los puntos de control inmune inhibitorios como PD-1, amortiguando de esta manera la respuesta de las células T y, en el contexto tumoral, favoreciendo la evasión del sistema inmune (**Figura 16**).

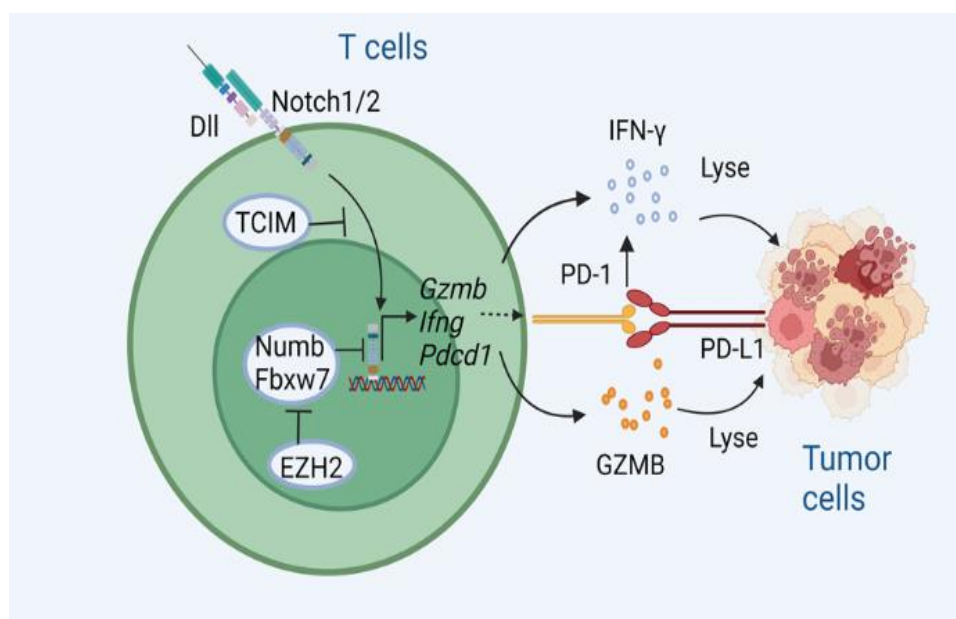


Figura 16. Implicación de la vía Notch en la activación del linfocito T CD8+

Journal of Hematology & Oncology, 2023 (Adaptada de *Li et al*)

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis está basada en las siguientes premisas:

- 1.1. La señalización a través de la vía de Notch está implicada en la regulación de todas las poblaciones celulares que median la respuesta inmune innata y adaptiva anti-tumoral (CDs, neutrófilos, linfocitos B, linfocitos T CD4+ Th1, CD8+ citotóxicos y células NK), así como, de elementos clave en la inmunosupresión del MAT (MDSCs, TAM tipo M2, linfocitos Treg, CAFs, puntos de control del sistema inmune, además de, otras células del microambiente).
- 1.2. Las MDSCs juegan un papel clave en el proceso de inmuno-edición en cáncer mediante diversos mecanismos y existe evidencia de su implicación en la progresión tumoral y respuesta a los tratamientos antineoplásicos.
- 1.3. La expresión diferencial de ligandos de Notch, en el sentido de una alta expresión de ligandos tipo Jagged, en el microambiente y, en particular, en MDSCs parece mediar, en modelos pre-clínicos, un importante mecanismo de escape al sistema inmune en el MAT (inhibición de células CD8+, CD4+ y NK, expansión de Treg, disfunción de CDs, polarización de TAMs a fenotipo M2, inducción de puntos de control inmunológico inhibitorios).

Dadas estas premisas nuestra hipótesis sostiene que los niveles de MDSCs circulantes, así como, la expresión de ligandos, receptores y genes diana de la vía Notch en las mismas y en tejido tumoral de pacientes con CPNMa pretratados con QT basada en platino puede identificar aquellos con mayor probabilidad de respuesta y supervivencia al tratamiento con ICIs.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos primarios

- 2.1.1. Explorar la correlación entre la proporción basal de poblaciones celulares inmunes circulantes (MDSCs totales y subpoblaciones, linfocitos Treg, CD8+, CD4+, B, células NK, NKT y monocitos) y respuesta radiológica, SLP y SG tras tratamiento con ICIs en pacientes con CPNMa pretratados con QT basada en platino.
- 2.1.2. Explorar la correlación entre RNL pre-tratamiento y SLP/SG tras tratamiento con ICIs en pacientes con CPNMa pretratados con QT basada en platino.
- 2.1.3. Explorar la correlación entre los niveles de expresión de ligandos (DLL y JAG), receptores (DLL y JAG) y genes diana (HES1 y HEY1) de la vía Notch, así como, los niveles de expresión de IDO1, ARG1 y PD-L1 en MDSCs circulantes y respuesta radiológica, SLP, SG y tasa de supervivencia a largo plazo tras tratamiento con ICIs en pacientes con CPNMa pretratados con QT basada en platino.

2.2. Objetivos Secundarios

- 2.2.1. Explorar la asociación entre la proporción basal de MDSCs totales y subpoblaciones circulantes y RNL pre-tratamiento con ICIs en pacientes con CPNMa pretratados.
- 2.2.2. Explorar la correlación entre los niveles de expresión de ligandos, receptores y genes diana de la vía Notch, así como, los niveles de expresión de IDO1, ARG1 y PD-L1 en tejido tumoral y la respuesta radiológica al tratamiento con ICIs en pacientes con CPNMa pretratados con QT basada en platino.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Esta tesis doctoral ha sido desarrollada a partir de un estudio observacional de seguimiento prospectivo multicéntrico sobre muestras de pacientes con CPNMa tratados con ICIs dentro de la práctica clínica habitual entre marzo de 2018 y noviembre de 2021. Se trata de un estudio integrativo de análisis de biopsias líquidas de tipo traslacional. Se han obtenido muestras seriadas de sangre periférica y de tejido tumoral de pacientes tratados con anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 para analizar la expresión de biomarcadores en MDSCs circulantes y su asociación con la respuesta al tratamiento y supervivencia (**Figura 17**).

Este proyecto se ha llevado a cabo en los servicios de Oncología Médica de 3 hospitales públicos de la Comunidad Valenciana dentro del Grup de Investigació i Divulgació en Oncologia (GIDO):

- Hospital Arnau de Vilanova, Valencia.
- Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia.
- Consorcio Hospitalario Provincial de Castellón, Castellón.

El análisis de biomarcadores se ha llevado a cabo en la Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión (UBMP) del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe.

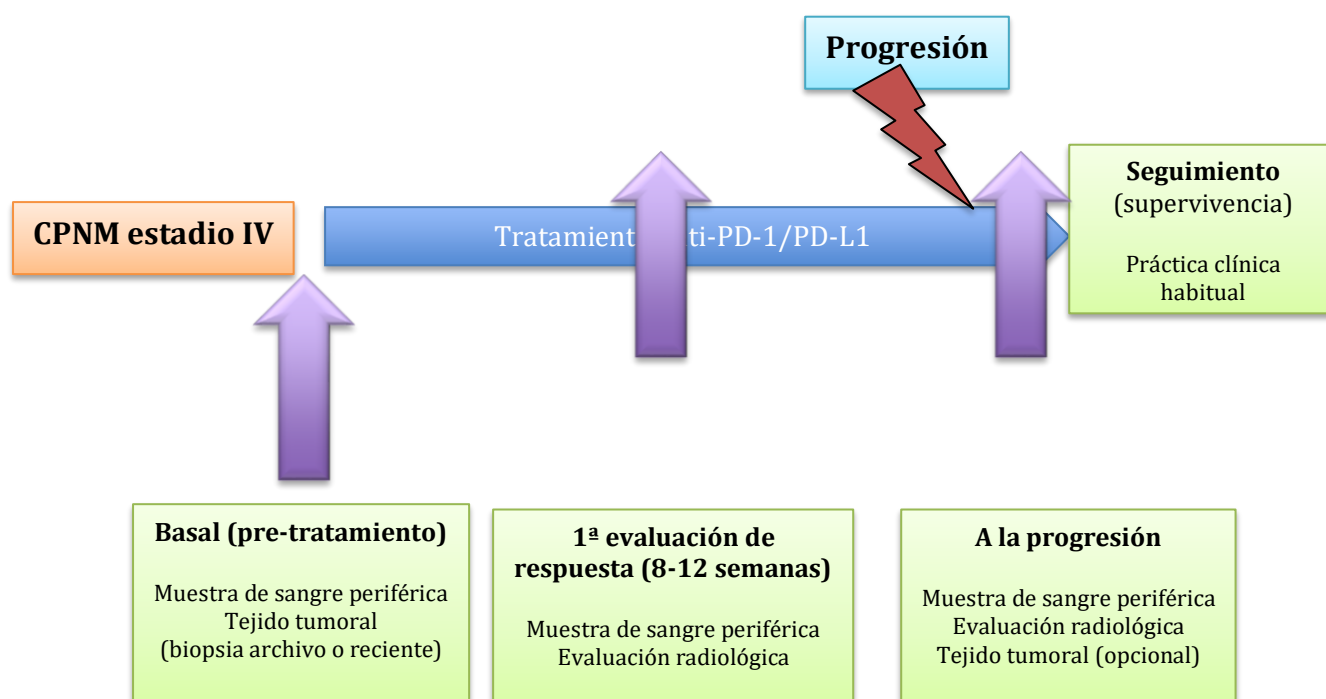


Figura 17. Diseño del estudio

2. POBLACIÓN DEL ESTUDIO

La población que se ha incluido en el estudio está constituida por pacientes diagnosticados de CPNMa (estadio III irresecable o estadio IV) que han iniciado tratamiento con anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 tras progresión, al menos, a una línea de tratamiento con QT basada en platino y no tuviesen contraindicación para el tratamiento con ICIs.

2.1. Criterios de Inclusión específicos:

- Consentimiento informado por escrito para participar en el estudio, antes de la inclusión en el mismo y en el cual se autorice a la extracción de muestras de sangre periférica. [L]
[SEP]
- Edad igual o mayor de 18 años.
- Estado funcional aceptable y compatible con un tratamiento onco-específico activo: ECOG 0-1.
- Diagnóstico de CPNMa no resecable, metastásico o recidivante documentado histológicamente o citológicamente.
- Tratamiento previo con QT para la enfermedad localmente avanzada o avanzada. Los pacientes con mutaciones de EGFR o reordenamientos de ALK/ROS1 podían ser incluidos si habían recibido tratamiento anti-PD-1/PD-L1 tras progresión a terapia dirigida y, al menos, una línea de QT basada en platino.
- Pacientes candidatos a recibir una $\geq 2^{\text{a}}$ línea de tratamiento y para los cuales, a criterio del médico tratante, la opción terapéutica más adecuada fuese el tratamiento con un anticuerpo anti-PD1/PD-L1 (nivolumab, pembrolizumab o atezolizumab), siguiendo siempre las especificaciones de las fichas técnicas de los fármacos mencionados.
- Enfermedad medible por criterios RECIST 1.1.
- Pacientes en los que se haya podido obtener muestras de sangre periférica y tuviesen disponibilidad de tejido tumoral previo a tratamiento con anti-PD1/PD-L1.
- Pacientes con metástasis cerebrales fueron elegibles si las metástasis habían sido tratadas y no había evidencia de progresión por TC y/o RM.
- Función hematológica, hepática y renal aceptables, y sin contraindicación para la administración de inmunoterapia de acuerdo con ficha técnica.
- No tratamiento previo con anti-PD-1, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-CTLA-4 o cualquier otros anticuerpo o fármaco dirigido a puntos de control del sistema inmune o co-estimulación de células T.
- Pacientes con capacidad de adhesión a los procedimientos del estudio y seguimiento.

3. TAMAÑO MUESTRAL

Se ha estimado un tamaño muestral de 100 pacientes. La tasa de respuesta global de los pacientes tratados en el estudio CheckMate 057 (CPNM no escamoso) y CheckMate 017 (CPNM escamoso) fue de aproximadamente el 20%. Tomando estos datos como referencia, esperaríamos encontrar aproximadamente 20 respondedores y 80 no respondedores en nuestro conjunto de datos. Definimos la respuesta como se hace en los ensayos CheckMate 057 y 017 (respuestas completas y parciales por criterios RECIST v1.1, según la evaluación del investigador). La IHQ de PD-L1 fue capaz de discriminar los respondedores de los no respondedores en el ensayo CheckMate 057. En este ensayo, la tasa de respuesta RECIST fue de 37% en los pacientes con una expresión de PD-L1 $\geq 10\%$ y del 11% en los pacientes con expresión de PD-L1 $< 10\%$. Por ello, hemos asumido que, para ser clínicamente relevante, nuestro biomarcador debe tener al menos un rendimiento equivalente a la de la expresión de PD-L1 en el ensayo CheckMate 057.

Hemos asumido una hipótesis H0 (tasa de respuesta en el grupo con biomarcador negativo) del 10% y una hipótesis H1 (tasa de respuesta RECIST 1.1 en el grupo con biomarcador positivo) del 40%. Suponiendo una tasa de error alfa del 10%, la potencia de acuerdo con la diferente distribución del biomarcador positivo/negativo sería (**Tabla 1**):

Tabla 1. Cálculo tamaño muestral y potencia

Biomarcador (+)	Biomarcador (-)	Power*	
		Two-sided test	One-sided test
25%	75%	80.4%	88.9%
50%	50%	88.7%	94.3%
75%	25%	80.4%	88.9%

*H0=0.1; H1=0.4; alpha=0.1. ArcSinus method para potencia/cálculo tamaño muestral.

4. PLAN TERAPÉUTICO

Los pacientes han sido tratados con anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 en ciclos de 15 o 21 días según las dosis recomendadas y la práctica clínica habitual de cada centro participante, manteniendo el tratamiento hasta progresión de la enfermedad, toxicidad inaceptable o a consideración del clínico según práctica habitual.

- **Nivolumab** a dosis de 3 mg/kg en infusión de 60 minutos en ciclos cada 15 días.
- **Pembrolizumab** a dosis de 2 mg/kg en ciclos cada 21 días en pacientes con expresión de PD-L1 $\geq 1\%$.
- **Atezolizumab** dosis fija 1200 mg iv en ciclos cada 21 días.

La administración del fármaco, modificación de dosis, retraso del tratamiento y manejo de la toxicidad inmuno-relacionada se ha llevado a cabo de acuerdo a las recomendaciones del laboratorio y práctica clínica habitual de cada centro.

5. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Se han recogido las siguientes variables en diferentes etapas del estudio:

Tabla 2. Procedimientos del estudio

Día	Basal	Visitas de tratamiento	1ª valoración respuesta (1)	Discontinuación tratamiento	Seguimiento (2)
Consentimiento informado	X				
Datos demográficos e historia clínica	X				
Criterios de selección	X				
ECOG	X			X	
Variables de laboratorio	X		X	X	
Dosis anti-PD1/PD-L1		X			
Muestra de sangre periférica	X		X	X	
Muestra de tejido	X			X (OPCIONAL)	
Evaluación de respuesta	X		X	X	
Supervivencia					X

(1) Valoración de respuesta: Se realizará según la práctica clínica habitual cada 8-12 semanas. El método para la valoración radiológica de la respuesta tumoral debe ser el mismo en todas las visitas.

(2) Visitas de seguimiento: Se han realizado según la práctica clínica habitual.

5.1. VARIABLES CLÍNICAS

Variables clínicas en la evaluación basal

Se han recogido los siguientes datos de la historia clínica y oncológica del paciente:

- **Variables demográficas:** Edad al inicio del tratamiento. Sexo. Historia familiar de cáncer. Hábito tabáquico.
- **Historia oncológica:** Fecha del primer diagnóstico. Tipo histológico. Estadio de la enfermedad según el sistema TNM. Localización de las metástasis. Tratamientos previos para el cáncer de pulmón (cirugía, radioterapia y/o QT).
- **Variables clínico-patológicas basales:** ECOG. Peso. Talla. Pérdida de peso ($\geq 10\%$, $< 10\%$ o no pérdida de peso). Patologías relevantes. Medicación concomitante.
- **Análisis de sangre:** Recuento absoluto de leucocitos, neutrófilos, hemoglobina y plaquetas.
- **Pruebas de imagen.** Todos los enfermos disponían de una tomografía computerizada (TC) que abarcara al menos el tórax y el abdomen y/o TC-PET realizadas en el mes previo al inicio del tratamiento.

Variables clínicas durante el tratamiento, en la evaluación de respuesta al tratamiento y en la progresión de la enfermedad o interrupción del tratamiento

Variables que se han recogido durante el tratamiento con ICIs:

- Descripción del esquema, número de ciclos, fecha inicio y duración.
- Líneas de tratamiento previas.
- Toxicidad desarrollada durante el tratamiento. Reacciones adversas desde el inicio del tratamiento, según los criterios de toxicidad del National Cancer Institute, versión 5 (CTCAE-NCI).

En todos los pacientes se ha realizado una evaluación de respuesta al tratamiento con TC o TC-PET entre 8 y 12 semanas del inicio del tratamiento con ICIs. Se han recogido las siguientes variables:

- Lesiones diana y no diana (fecha de la evaluación, localización, tamaño).
- Mejor respuesta obtenida, por RECIST 1.1: Respuesta completa (RC), respuesta parcial (RP), enfermedad estable (EE) o progresión de la enfermedad (PE).
- Fecha de la progresión de la enfermedad (según RECIST) o interrupción del tratamiento.
- Tipo de respuesta por RECIST 1.1: Respondedor o no respondedor.
- Causa de interrupción del tratamiento: Toxicidad, tratamiento completado, pérdida de seguimiento, progresión de la enfermedad, fallecimiento o decisión médica.

Seguimiento

Se ha llevado a cabo una actualización periódica de la supervivencia de cada paciente según el desarrollo del estudio. Se han recogido las siguientes variables:

- Estado del paciente: Vivo sin evidencia de enfermedad, Vivo con evidencia de enfermedad, exitus o pérdida de seguimiento.
- Si vivo, se recoge fecha de la última visita.
- Si ha fallecido, fecha de su muerte y causa de su muerte: Cáncer de pulmón o sus complicaciones (incluyendo efectos adversos relacionados con el tratamiento oncológico) u otras causas.

5.2. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

5.2.1. Metodología para obtención y procesamiento muestras en sangre

Se obtuvieron 3 tubos de sangre venosa por venopunción de pacientes con diagnóstico de CNMPa previo al tratamiento con anti-PD-1/PD-L1. De los 3 tubos, 2 de ellos estaban heparinizados para la obtención de células mononucleares en sangre periférica, mientras el otro tubo se obtuvo para la preparación de suero. Las muestras se enviaron al laboratorio de referencia través de un circuito logístico diseñado al efecto, de tal modo que, el tiempo máximo desde la extracción de la sangre hasta su procesamiento ha sido inferior a 6 horas, a fin de preservar el material a analizar (PBMCs, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*). Las **muestras de sangre periférica (plasma y suero)** se obtuvieron en diferentes fases:

- **Basal:** Previa al inicio de tratamiento.
- **Primera evaluación radiológica:** 8-12 semanas tras inicio de tratamiento.
- **En el momento de la interrupción del tratamiento por progresión u otras causas.**

Inmunofenotipado de PBMCs y caracterización de las poblaciones celulares

El aislamiento de PBMCs se realizó utilizando un método de centrifugación en gradiente de densidad Ficoll (Hystopaque). Para ello, se diluye la muestra de sangre 1:1 con solución salina tamponada con fosfato (PBS) con un 2% de suero bovino fetal (SBF), antes de estratificación sobre Ficoll. Después de centrifugar 20 minutos a 1200 x g, las PBMCs se recolectan en la interfase de plasma. Las células se lavan 2 veces con 15 ml de PBS + 2% SBF, y se lisan con un buffer de lisis de eritrocitos (eBioscience RBC Lysis buffer, Thermofisher). Una vez lisados los eritrocitos, se resuspenden en tampón MACS (PBS, 0,5% de BSA, EDTA 2 mM) al que se añade los anticuerpos específicos y se incuban durante 10 minutos a 4°C. Tras el marcaje, se centrifugan a 300 g 10 minutos y se resuspenden en 0.3 ml de PBS para su análisis. El análisis multicolor se llevó a cabo utilizando un Citómetro de flujo analizador FACSCanto-II (Becton Dickinson).

Para el inmunofenotipado de las PBMCs se han utilizado anticuerpos monoclonales anti-humanos conjugados con fluorocromo frente a diferentes moléculas (Milteny Biotech). Para la caracterización de las MDSCs y sus subpoblaciones se utilizaron los anticuerpos anti-CD33, anti-CD11b, anti-CD14, anti-CD15 y anti-HLA-DR (**Tabla 3**). Las MDSC humanas expresan los marcadores mieloides CD11b+ y CD33+, pero son habitualmente negativas para HLA-DR (receptor de superficie celular de CMH clase II). Las MDSCs se pueden clasificar en, al menos, dos subpoblaciones: monocíticas (M-MDSCs) y polimorfonucleares (PMN-MDSCs). En humanos, las M-MDSCs se caracterizan por un fenotipo HLA-DR-, CD11b+, CD33+ y CD14+ (los monocitos maduros expresan HLA-DR). Las PMN-MDSCs se caracterizan por un fenotipo HLA-DR-, CD11b+, CD33+, CD14- and CD15+. Se ha descrito una tercera población en estadio temprano de MDSCs, early-MDSCs (e-MDSCs), que comprenden más progenitores inmaduros y que carecen de la expresión tanto de CD14 como de CD15.

Tabla 3. Panel de Anticuerpos para inmunofenotipado de MDSCs y subpoblaciones

Fenotipo	CD33	CD11b	HLA-DR	CD14	CD15
Fluoróforo	VioBright (FITC)	PE	PE-Vio770	PerCp-Vio	APC
Milteny (ref)	130-111-027	130-110-553	130-111-791	130-110-523	130-113-482

Para las subpoblaciones de células T se utilizaron los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD56. Dentro de la población de células T se determinarán la población de células Treg: anti-CD45, anti-CD4, anti-CD25, anti-CD127 (**Tabla 4**).

Tabla 4. Panel Anticuerpos para caracterización de subpoblaciones de células T

Fenotipo	CD3	CD8	CD56	Treg detection kit
Fluoróforo	PerCp	PE-Vio770	APC-Vio770	CD45-VioBlue CD4-FITC CD25-APC CD127-PE
Milteny (ref)	130-113-131	130-110-680	130-114-548	130-096-082

Cada medida contenía al menos 100,000 eventos y los porcentajes de cada población se calcularon sobre la población de *singletes*. Los análisis se realizaron con el software Infinicyt™ (Cytognos, Salamanca, España) y las estrategias de gateo tanto para las poblaciones de MDSCs como de leucocitos se muestran en la **Figura 18**. De cada paciente obtuvimos el porcentaje de cada una de las subpoblaciones celulares en las PBMCs. Para el caso de las MDSCs totales, se obtiene el porcentaje respecto al total de las PBMCs. En el caso de las subpoblaciones de MDSCs (PMN-MDSCs, M-MDSCs y e-MDSCs) también se calcula el porcentaje respecto al total de las PBMCs. Para realizar las estimaciones de Kaplan-Meier, se calcula el valor de la mediana de los porcentajes de cada subpoblación celular y se clasifican como “low” a los pacientes cuyos porcentajes son inferiores al valor de la mediana y “high” a los que tienen valor superior.

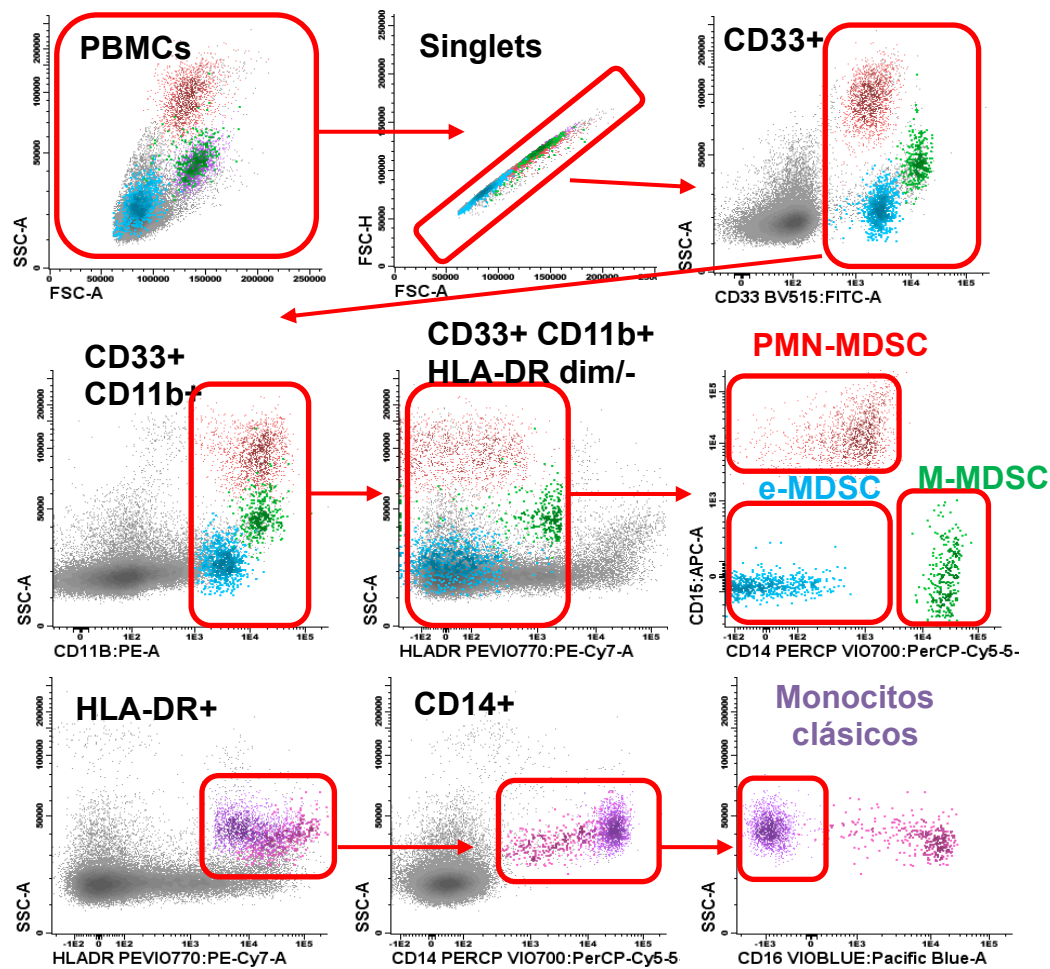


Figura 18. Inmunofenotipado de PBMCs y caracterización de poblaciones celulares

Aislamiento de las células MDSCs de sangre periférica

El método de aislamiento de las MDSCs de sangre total se realizó utilizando una modificación de la técnica publicada en 2016 (*Myeloid-Derived Suppressor Cells Express Brutons Tyrosine Kinase and Can Be Depleted in Tumor-Bearing Hosts by Ibrutinib Treatment*, 2016). Con esta técnica, se parte de 10 ml de sangre y se añaden 500 μ l de HLA Myeloid enrichment (stemcell) (**Figura 19**). Este reactivo comprende una combinación de anticuerpos de células sanguíneas dispuestas en forma de tetrámero, de tal manera que, se van a unir a todas las células, excepto las que presentan el marcador CD33 en la membrana. Tras el tiempo de incubación, se diluye 1:1 con PBS + 2% SBF y se añade a una solución de ficoll específica para estas células y se centrifugan a 1200 g durante 20 minutos. Los tetrámeros de anticuerpos adheridos a las células, caerán al fondo junto a los eritrocitos y las células CD33 se quedan en la interfase. Las células se lavan 2 veces con PBS + 2% SBF y se incuban con las beads magnéticas de HLA-DR para obtener la fracción negativa. Las células se transfieren a una columna magnética que se coloca en un imán, de tal forma que, todas las células que atraviesan la columna, sin ser retenidas, son la fracción HLA-DR negativa. Una vez obtenidas las células MDSCs con esta metodología se caracterizan en un citómetro de flujo, al igual que las PBMCs, para estudiar el rendimiento y la pureza del método.

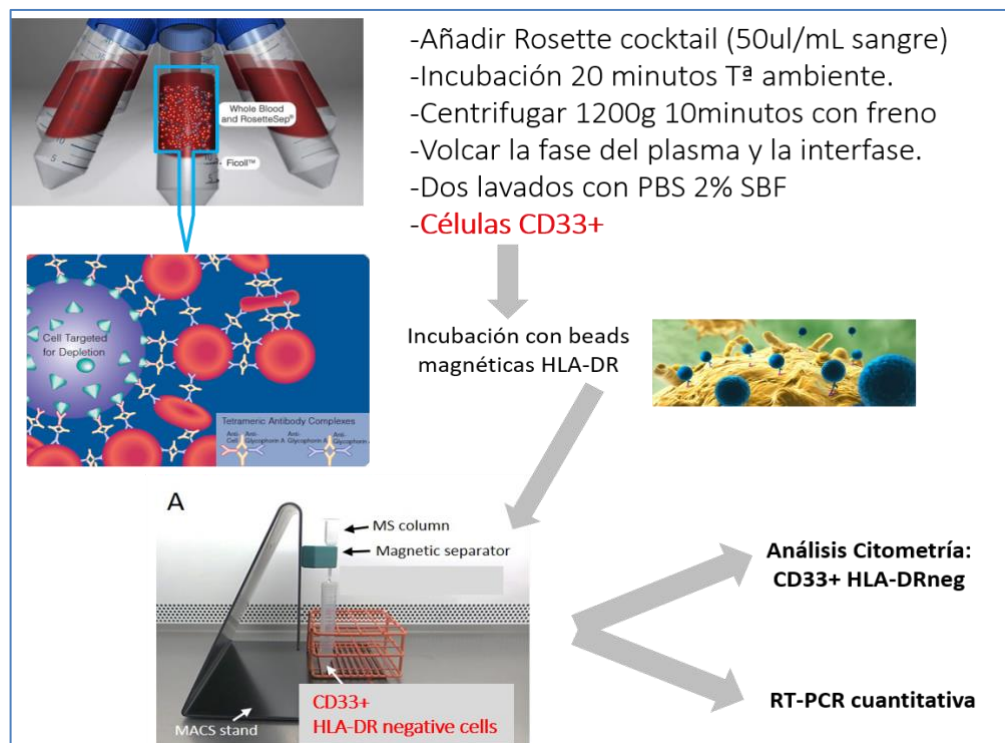


Figura 19. Esquema del protocolo de aislamiento de MDSCs de sangre periférica

Análisis transcriptómico en MDSCs

El aislamiento de RNA de las células MDSCs se llevó a cabo utilizando un kit de Omega bio-tek (E.Z.N.A. Total RNA kit). Una vez extraído el RNA se cuantificó con el instrumento nanodrop.

El primer paso es transcribir el RNA a DNA complementario (cDNA). Para realizar la retrotranscripción se utilizaron 500 ng de RNA por reacción. El cDNA obtenido se diluyó 10 veces con agua libre de RNAsas y DNAsas para realizar las PCRs cuantitativas con *SYBR green* de los genes a analizar. En este proyecto planteamos el estudio de genes inmunomoduladores de la respuesta inmunitaria como son ARG1, IDO1 y PD-L1 y genes implicados en la vía Notch como JAG1, JAG2, NOTCH1, NOTCH2, HES1 y HEY1.

Tras obtener el ADNc, se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) para amplificar las secuencias de ADN de los genes que se querían estudiar. Para ello, se emplearon placas de PCR de 96 pocillos (PCR Microplate, PCR-96-AB-C, Axygen) en las que se cargaron triplicados de las muestras para cada pareja de cebadores o *primers* del gen correspondiente. De tal modo, en cada pocillo se mezclaron los reactivos indicados en la **Tabla 5**. Los primers utilizados en este ensayo se indican en la **Tabla 6**. Tras cargar la placa, se centrifugó para descartar cualquier burbuja y se introdujo en el termociclador *ViiA 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) donde se realizó la PCR (siguiendo el programa indicado en la **Tabla 7**). En último lugar, los datos y resultados adquiridos fueron analizados por el *ViiA™ 7 Software* y normalizados en archivos de Excel.

Tabla 5. Lista de reactivos para la PCR

Reactivo	Cantidad
ADNc muestra	2 µl
Primer Forward (10 µM)	0.3 µl
Primer Reverse (10 µM)	0.3 µl
TB Green Premix Ex Taq 2x (SYBR Takara)	5 µl
ROX dye II	0.2 µl
Agua libre de RNAsas	2.2 µl

Tabla 6. Lista de primers utilizados para ensayos de RT-PCR cuantitativa

Gen	Secuencia
h-ACTB-Forward	ACAGAGCCTCGCCTTTGC
h-ACTB-Reverse	CGCGGCGATATCATCATCCA
h_JAG1 Forw	CTGTCATCGGGGGCAACAC
h_JAG1 Rev	CATTACTGGAATCCCACGCCT
h_JAG2 Forw	CGTCATCCCCCTCCAGTTCTG
h_JAG2 Rev	CCTCATTCGGGGTGGTATCG
h_NOTCH1 Forw	GCTCGAGGACGAATGTGAGG
h_NOTCH1 Rev	TCTAGGCATCGGCATTACCC
h_NOTCH2 Forw	GGGGCCAACTATGCTTGTGA
h_NOTCH2 Rev	CACAGTAGGTGCCCGTGAAT
h_HES1 For	CTGGAGAAGGCGGACATTCT
h_HES1 Rev	TACTTCCCCAGCACACTTGG
h_HEY1 For	GAGTGCGGACGAGAATGGAA
h_HEY1 Rev	AATCTGGGAAGATGTAGTTGGGG
h_ARG1 Forw	CCGTGCCCAGATTCTGACTT
h_ARG1 Rev	ACATTCTGGCTCTGTTGGGG
h_IDO1 For	ATGAAGAAGTGGGCTTTGCTCT
h_IDO1 Rev	TTCTCAACTCTTCTCGAAGCTGG
h_PDL1 Forw	CCTACTGGCATTGCTGAACG
h_PDL1 Rev	GACAATTAGTGCAGCCAGGTC

Tabla 7. Condiciones requeridas para la RT-PCR cuantitativa

Programa	Tiempo	Temperatura
Calentamiento	2 minutos	50°C
Desnaturalización	1 minuto	95°C
Amplificación	15 segundos	95°C
40 ciclos	35 segundos	60°C
Melting	15 segundos	95°C
	1 minuto	60°C
	15 segundos	95°C

5.2.2. Metodología para obtención y procesamiento muestras en tejido

Extracción de ARN de tejido parafinado

Antes del procesamiento, las secciones del bloque de tejido desparafinado se han teñido con hematoxilina-eosina y han sido evaluadas por un patólogo para confirmar la idoneidad del contenido de células tumorales. Para el análisis posterior se han utilizado muestras tumorales que contenían al menos 50% de células tumorales después de observación microscópica.

El tejido tumoral fue fijado y embebido en parafina y cortado en láminas de 5-10 μm . Se utilizaron de 3 a 5 láminas para cada extracción de ARN. Para extraer el ARN del tejido parafinado se utilizó el kit de Qiagen RNeasy FFPE Kit. Brevemente, se utiliza la solución de deparaffinización para eliminar completamente la parafina de las secciones de tejido FFPE. Para liberar el ARN de las secciones, las muestras se incuban en un tampón de lisis optimizado que contiene proteinasa K. La incubación breve a una temperatura más alta revierte parcialmente la reticulación de formalina de los ácidos nucleicos liberados, mejorando el rendimiento y la calidad del ARN y mejorando su rendimiento en los ensayos anterógrados enzimáticos. Después de esto, se sigue el tratamiento con ADNasa I, que está diseñado para eliminar el ADN genómico y eliminar los fragmentos de ADN muy pequeños que se encuentran en las muestras FFPE después de una fijación prolongada en formalina o tiempos de almacenamiento prolongados. El lisado se mezcla luego con el buffer RBC. Para crear las condiciones de unión adecuadas para el ARN, se agrega etanol y luego la muestra se aplica a una RNeasy MinElute Spin Column. En este punto, el ARN total se une a la membrana y el lavado elimina los contaminantes de manera efectiva. Luego se extrae el ARN en al menos 14 μl de agua libre de ARNasa.

Niveles de expresión de genes de la vía Notch en tejido parafinado mediante la técnica de Droplet digital PCR (ddPCR)

La ddPCR es una técnica cuantitativa que consiste en fraccionar el ADN a amplificar y los reactivos de la PCR en 20.000 gotas. Por tanto, en cada una de las gotas ocurrirán reacciones de PCR independientes entre sí, de manera que, se consigue una mayor sensibilidad para la detección de eventos poco frecuentes en una muestra de partida. En este estudio se utilizó el kit de RT-ddPCR de un solo paso (Bio-Rad) para realizar la retrotranscripción de ARN a ADNc en un solo paso. La mezcla de los diferentes enzimas está optimizada para permitir la partición de muestras de ARN en las gotas de manera que mantiene las enzimas inactivas hasta que se realiza la reacción de transcripción inversa a 50°C. Esto mejora la especificidad y la eficacia al garantizar la activación completa de la enzima para la conversión del ADNc mediada por el cebador. La mezcla enzimática además contiene un inhibidor de RNasa que protege el ARN durante toda la reacción.

La reacción se llevó a cabo en pocillos de placas de 96 pocillos de PCR, de tal modo que, en cada pocillo se mezclaron los reactivos indicados en la **Tabla 8**. Los *primers* que se utilizan están marcados fluorescentes con la sonda fluorescente HEX o con la sonda fluorescente FAM. El gen normalizador, b-actina (ACTB), irá con la sonda fluorescente HEX y los genes de interés irán marcados con FAM (**Tabla 9**). Para la formación de gotas se empleó el QX200™ *Droplet Generator* (Bio-Rad). Se utilizaron cartuchos en los que se prepararon las muestras en tandas de 8 en 8 (**Figura 20**).

Tabla 8. Lista de reactivos para la ddPCR

Reactivo	Cantidad
RNA muestra	1 µl
Primer-HEX	1 µl
Primer-FAM	1 µl
Supermix	5 µl
Transcriptasa reversa	2 µl
DTT 300mM	1 µl
Agua libre de RNasas	11 µl

Tabla 9. Lista de primers para la ddPCR

Gen	Referencia Bio-Rad	Sonda fluorescente
ACTB	dHsaCPE5190200	HEX
JAG1	dHsaCPE5033718	FAM
HES1	dHsaCPE5034924	FAM
IDO1	dHsaCPE5036376	FAM
PD-L1	dHsaCPE5058502	FAM
ARG1	dHsaCPE5035384	FAM
NOTCH1	dHsaCPE5050282	FAM

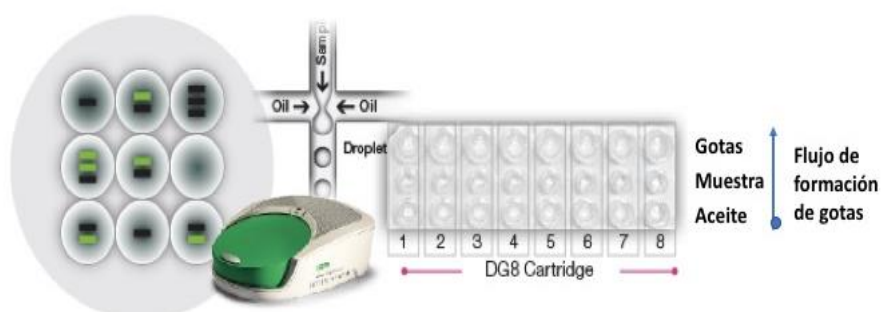


Figura 20. Cartucho empleado para la formación de gotas y orden de los componentes

Adaptada de <https://www.bio-rad.com>.

Los triplicados se realizaron en diferentes cartuchos para asegurarnos de que si algún cartucho fallaba tuviéramos muestra de todos los pacientes. En los pocillos inferiores se colocó el aceite generador de gotas (Bio-Rad), en los intermedios se añadió la muestra y gracias a la presión aplicada al cartucho, el aceite se dirigió hacia las muestras a través de unos capilares que se encuentran en el cartucho, generando micelas que acabarán pasando al pocillo superior formando las gotas de reacción. Las gotas que se han formado en el paso anterior, se trasladan a una placa de 96 pocillos específica para ddPCR (Bio-Rad). La placa se sella con aluminio para evitar que se evaporara la muestra y se somete a las siguientes condiciones (**Tabla 10**).

Tabla 10. Condiciones programa ddPCR

Programa	Tiempo	Temperatura
Inicio	3 minutos	25°C
Transcripción reversa	60 minutos	50°C
Activación de la enzima	10 minutos	95°C
Desnaturalización Amplificación	30 segundos	95°C
40 ciclos	1 minuto	55°C
Desactivación de la enzima	10 minutos	98°C
Mantenimiento	Infinito	4°C

Después de la amplificación de la muestra, se leyó la placa en el QX200 Droplet Reader (Bio-Rad) y se empleó para el análisis y la lectura el software *QuantaSoft™*, con el que se fijaron las condiciones del experimento. Se definió el marcaje de cada una de las sondas (HEX y FAM), se indicó el tipo de SuperMix utilizada y se empleó la opción de RED (Rare Event Detection) para el análisis. La cuantificación se llevó a cabo con el software *QuantaSoft™*. Se descartaron aquellas muestras que no alcanzaron un mínimo de 7.000 eventos o gotas. En el resto de los casos, se fueron ajustando en cada pocillo las poblaciones positivas para FAM y para HEX. A partir de ahí, se extrajeron los datos de concentración para cada una de las sondas y se calculó el ratio de gen interés/actina siguiendo esta ecuación:

$$\frac{\text{Concentración } \left(\frac{\text{copias}}{\text{uL}}\right) \text{ FAM (Gen de interés)}}{\text{Concentración } \left(\frac{\text{copias}}{\text{uL}}\right) \text{ HEX (ACTB)}} \times 1000$$

Se ha evaluado el perfil de expresión a nivel de RNAm de ligandos, receptores y genes diana de la vía Notch, así como, el nivel de expresión de IDO1, ARG1 y PD-L1.

Determinación por inmunohistoquímica: Expresión PD-L1 por TPS en células tumores

Se ha realizado en muestra de tumor parafinado mediante un método IHQ validado (Dako) la expresión de PD-L1 por TPS en célula tumoral. Las muestras se han clasificado según el porcentaje de tinción de las células tumorales en la membrana en <1%, 1-49% y ≥50% en una sección de células con un mínimo de 100 células valorables.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

6.1. Análisis de los datos clínicos

En el **cuaderno de recogida de datos** específico para este estudio, se han incluido los parámetros demográficos, estado basal de la enfermedad, datos de cada ciclo de tratamiento, respuesta al tratamiento y fechas de progresión y/o muerte especificados en el apartado de variables clínicas. Las variables cualitativas se han resumido mediante cálculos de frecuencias absolutas y relativas, expresadas en porcentajes. Para las variables cuantitativas se han calculado las medidas de tendencia central (mediana) y la dispersión (cuartiles, rango). Antes de iniciar el tratamiento, se obtuvo el RNL y RPL dividiendo los recuentos absolutos de neutrófilos y plaquetas, respectivamente, y el recuento de linfocitos en el hemograma basal. Las frecuencias y porcentajes de las poblaciones celulares se recogen en medianas con rango y cuartiles.

La **evaluación de respuesta** se ha realizado de acuerdo con los criterios RECIST 1.1 como RC, RP, EE y PE. La TRO se ha definido como la suma de las RC y RP. Se han clasificado a los pacientes como respondedores o no respondedores en función de la mejor respuesta radiológica que hayan obtenido según criterios RECIST 1.1:

- **Grupo respondedores:** RC, RP o EE > 6 meses como mejor respuesta RECIST.
- **Grupo no respondedores:** PE o EE < 6 meses como mejor respuesta RECIST.

La SG se ha calculado desde la fecha del primer ciclo de tratamiento con ICIs hasta la muerte (evento) o último seguimiento (censurado). La SLP se ha calculado desde la fecha del primer ciclo de tratamiento con ICIs hasta la progresión por RECIST 1.1 o muerte por cualquier causa (evento) o último seguimiento (censurado). La SG y SLP se han estimado con el método de Kaplan-Meier y el log-rank test se ha utilizado para estudiar las diferencias.

6.2. Análisis de las poblaciones celulares y variables génicas en la población de MDSCs

La asociación de la variable independiente (proporción de poblaciones celulares inmunes circulantes o nivel de expresión de genes de la vía Notch en MDSCs) con la variable dependiente (respuesta por RECIST) se ha analizado usando el test Chi-cuadrado. Tanto la proporción de poblaciones celulares inmunes circulantes o nivel de expresión de genes en MDSCs como la respuesta por RECIST se han definido como variables binarias (nivel “high”/“low” en función del punto de corte determinado (mediana) y respuesta/no respuesta respectivamente). La comparación de poblaciones celulares inmunes o nivel de expresión de genes según el nivel *high* o *low* con la SLP y SG se ha evaluado con el test de log-rank.

Los resultados presentan en tablas que reflejan los resultados globales y los obtenidos del sub-análisis realizado según los niveles de MDSCs circulantes estudiados, con el objetivo de identificar y describir posibles grupos de pacientes con una mayor asociación con los resultados obtenidos con las técnicas de biología molecular. Se ha utilizado el modelo de HR proporcionales univariante y multivariante de Cox para estimar el efecto de las poblaciones inmunes circulantes o de la expresión de genes Notch y varios factores pronóstico clínico-patológicos conocidos en cáncer de pulmón (edad, género, ECOG, descriptor M1, expresión de PD-L1 en tumor, RNL, desarrollo de toxicidad inmunomediada) sobre la SLP y SG. Se obtuvo el modelo pronóstico final para SLP y SG al incorporar al modelo multivariante de Cox sólo aquellas variables que mantuvieron la significación estadística en el modelo univariante. El coeficiente de correlación de *Pearson* se ha utilizado para estudiar la asociación entre los niveles de MDSCs totales circulantes y la RNL. Se describen HR ajustados con IC del 95% y se ha considerado una $p < 0,05$ como significativa. Todos los análisis se han llevado a cabo con el software GraphPad Prism 7.0, mediante el cual se obtiene el p-valor para cada gráfica. El análisis de regresión logística se ha realizado con el paquete estadístico SPSS 25.0 (SPSS, Chicago, IL).

7. ASPECTOS ÉTICOS

7.1. Consideraciones Generales

Este estudio se ha conducido de acuerdo con las normas de buena práctica clínica (Directiva 2005/28/CE) y la Declaración de Helsinki y sus modificaciones posteriores. La recogida y almacenamiento de datos se ha realizado de acuerdo con lo estipulado en la Ley Orgánica de Protección de datos de carácter personal (Ley orgánica 3/2018, de 5 de diciembre de protección de datos personales y garantía de los derechos digitales) y siempre respetando el principio de confidencialidad (todos los datos han sido almacenados y analizados tras su anonimización mediante la asignación de un identificador único para el estudio). Previo al inicio del estudio se ha obtenido un informe favorable de los comités éticos y de investigación de los centros involucrados.

7.2. Hoja de Información y Formulario de Consentimiento Informado

A cada sujeto que se le ha propuesto participar en el estudio, se le ha entregado un documento escrito denominado “Hoja de Información al Paciente”, que contiene toda la información relevante y necesaria para el paciente, tal como se presenta en el **Anexo 1** de este documento. Los investigadores participantes en el estudio han informado al sujeto, contestado a sus dudas y preguntas y, de acuerdo con la normativa vigente, han obtenido el consentimiento del sujeto o en su defecto, de un tutor legal

(**Anexo 2**). Los sujetos participantes en el estudio han tenido la oportunidad de revocar en cualquier momento su consentimiento para la utilización de sus datos en el análisis, sin expresión de causa y sin que por ello se derive para ellos responsabilidad ni perjuicio alguno.

7.3. Confidencialidad de los Datos

El contenido del cuaderno de recogida de datos, así como la base de datos donde se ha registrado la información son anónimos, y están protegidos de usos no permitidos por personas ajenas a la investigación y, por tanto, considerados estrictamente confidenciales. Los datos del Investigador y de las muestras del estudio han sido introducidos y tratados en un fichero propiedad de GIDO, que se ha tratado conforme a lo que dispone la Ley Orgánica 3/2018 de 5 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal y garantía de los derechos digitales y el Reglamento (UE) General de Protección de Datos de 2016/679, exclusivamente para el desarrollo y buen fin del estudio. En todo momento se ha seguido la normativa española vigente en cuanto a la obtención, conservación y almacenamiento de las muestras sanguíneas obtenidas, así como el manejo de los datos que se obtengan (Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica).

7.4. Comité Ético de Investigación con medicamentos

El proyecto ha sido evaluado favorablemente por el CEIm del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia con fecha del 29 de marzo de 2017 (**anexo 3**) y por el CEIm del Hospital La Fe (**anexo 4**). Así mismo, el estudio fue clasificado por el departamento de Medicamentos de Uso Humano de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) como un Estudio Posautorización de seguimiento prospectivo con código IIS-NIV-2017-01 con fecha 3 de marzo de 2017 (**anexo 5**). Finalmente, con fecha de 26 de junio de 2017, obtuvo el informe favorable por parte del Comité Autonómico de Estudios Postautorización Observacionales Prospectivos de Medicamentos de la Comunitat Valenciana a la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios (**anexo 6**) por no contravenir las directrices establecidas en el artículo 24 del RD 577/2013, de 26 de julio, del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad por el que se regula la farmacovigilancia de medicamentos de uso humano y el artículo 8 de la Resolución de 16 de junio de 2009, de la Consellería de Sanitat, de regulación de los procedimientos, documentación y plazos a observar en la presentación y modificaciones en procesos relacionados con los ensayos clínicos y estudios post-autorización observacionales de medicamentos en la Comunitat Valenciana.

IV. RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES

Se ha seleccionado un grupo homogéneo de 105 pacientes consecutivos diagnosticados de CPNMa entre marzo de 2018 y noviembre de 2021 en los que se han obtenido muestras de sangre periférica previas al inicio de tratamiento con ICIs (nivolumab, pembrolizumab o atezolizumab) tras progresión, al menos, a una línea de tratamiento con QT basada en platino.

La mediana de edad de la serie ha sido de 63 años (rango 38-80 años) y 77% fueron varones. El 92% de los pacientes tuvieron historia de tabaquismo (activo o exfumadores) y el 36% presentaron antecedentes de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) en cualquiera de sus grados. Un 8,6% de los pacientes tuvieron, al menos, un antecedente de enfermedad con base autoinmune. Sesenta pacientes (57%) tuvieron una histología de adenocarcinoma y 38 (36%) de carcinoma escamoso. El 90% de los pacientes disponían de tejido tumoral de archivo, bien de la biopsia del diagnóstico (62%) o de la rebiopsia previa al inicio de inmunoterapia (38%), para la determinación de la expresión de PD-L1 en célula tumoral por IHQ (Dako clon 22C3). En el 58% de los pacientes la expresión de PD-L1 se determinó en la biopsia del tumor primario, en el 9,5% en adenopatías locorregionales y en el 22% en la biopsia de una lesión metastásica. La expresión de PD-L1 fue clasificada de la siguiente manera: PD-L1 <1% (42%), PD-L1 1-49% (39%), PD-L1 >50% (12%) y PD-L1 no determinado (7%). Dos pacientes presentaron una alteración molecular diana: una mutación de EGFR (19Del) y una mutación de BRAF V600 respectivamente.

El estadio inicial de los pacientes fue III en el 31% y IV en el 54%, presentado el 58% un descriptor M1c y el 32% tres o más localizaciones metastásicas previamente al inicio del tratamiento con inmunoterapia. Todos los pacientes recibieron, al menos, un tratamiento previo con QT basado en doblete de platino en el contexto de un tratamiento neo/adyuvante (11%), concomitante o secuencial con radioterapia (26%) o como esquema de 1ª línea de enfermedad avanzada (80%). El 19% de los pacientes progresaron en los 3 primeros meses desde el inicio de la QT. El 77% de los pacientes recibieron inmunoterapia en el contexto de una 2ª línea de tratamiento con ICIs con nivolumab (n = 37), pembrolizumab (n = 18) o atezolizumab (n = 50). Veinte (19%) de los 105 pacientes tuvieron un ECOG PS 2 y catorce (13%) y veinte (19%) presentaron metástasis cerebrales y hepáticas previas al inicio del tratamiento con inmunoterapia respectivamente. El 14% requirieron dosis de corticoides orales >10 mg de prednisona o equivalente previo al tratamiento con anti-PD1/PD-L1, generalmente en el contexto del tratamiento sintomático de metástasis cerebrales. Las características basales de los pacientes se resumen en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Características basales de los pacientes (N = 105)

Tabla 11.	n = %
Edad, años (mediana, rango)	63 (38-80)
Género	
Varones	81 (77,1%)
Mujeres	24 (22,9%)
Hábito tabáquico	
Fumadores activos	44 (41,9%)
Exfumadores	53 (50,5%)
No fumadores	8 (7,6%)
Historia familiar de cáncer de pulmón	11 (10,5%)
Antecedente de neoplasia	31 (29,5%)
Sincrónica	7 (6,7%)
Metacrónica	22 (21%)
Ambas	2 (1,9%)
Enfermedad autoinmune	9 (8,6%)
Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)	
No	67 (63,8%)
Grado leve	15 (14,3%)
Grado moderado	16 (15,2%)
Grado grave	7 (6,7%)
Enfermedad cardiovascular	27 (25,7%)
Histología	
Adenocarcinoma	60 (57,1%)
Escamosa	38 (36,2%)
Otra	7 (6,7%)
Estadio inicial	
I-II	15 (14,3%)
III	33 (31,4%)
IV	57 (54,3%)
Rebiopsia previa a inicio de inmunoterapia	40 (38,1%)
Tejido en el que se analiza expresión de PD-L1 al diagnóstico	
Tumor primario	61 (58,1%)
Adenopatía regional (N1-N3)	10 (9,5%)
Metástasis	23 (21,9%)
No analizado o desconocido	11 (10,5%)
Expresión PD-L1 (célula tumoral)	
< 1%	44 (41,9%)
1-49%	41 (39%)
≥50%	13 (12,4%)
Desconocida	7 (6,7%)
Biomarcadores (mutaciones)	
EGFR	1/60 (1,6%)
ALK/ROS1	0/60 (0%)
BRAF	1/60 (1,6%)

Descriptor M1 previo a inicio de inmunoterapia	
M0	8 (7,6%)
M1a	20 (19%)
M1b (oligometastásico)	16 (15,2%)
M1c	61 (58,1%)
Nº localizaciones metastásicas previas al inicio inmunoterapia	
0	8 (7,6%)
1	36 (34,3%)
2	27 (25,7%)
≥3	34 (32,4%)
Carga tumoral basal pre-inmunoterapia, mm (n = 87)	
Media	80,29
Mediana	65
Rango	(11-222)
Localizaciones metastásicas previas al inicio inmunoterapia	
Adenopatías no regionales	21 (20%)
Pulmón contralateral	48 (45,7%)
Hígado	20 (19%)
Hueso	40 (38,1%)
Cerebro	14 (13,3%)
Suprarrenal	19 (18,1%)
Pleura/pericardio	30 (28,6%)
Partes blandas	9 (8,6%)
Linfangitis carcinomatosa	7 (6,7%)
ECOG PS previo a tratamiento con inmunoterapia	
0	12 (11,4%)
1	73 (69,5%)
2	20 (19%)
Tratamiento anti-PD1/PD-L1	
Nivolumab	37 (35,2%)
Pembrolizumab	18 (17,1%)
Atezolizumab	50 (47,6%)
Línea de tratamiento anti-PD1/PD-L1	
2ª línea	81 (77,1%)
≥3ª línea	24 (22,9%)
Contexto quimioterapia previa a inmunoterapia	
Neoadyuvancia/adyuvancia	12 (11,4%)
Quimiorradioterapia concomitante radical	15 (14,3%)
Quimiorradioterapia secuencial radical	12 (11,4%)
Quimioterapia paliativa de 1ª línea	84 (80%)
Tratamiento quimioterapia previo	
Platino-pemetrexed	42 (40%)
Carboplatino-paclitaxel	20 (19%)
Platino-vinorelbina	20 (19%)
Platino-gemcitabina	15 (14,3%)
Carboplatino-paclitaxel-bevacizumab	4 (3,8%)

Tiempo a la progresión desde inicio de quimioterapia	
≤ 3 meses	20 (19%)
3-6 meses	29 (27,6%)
6-12 meses	36 (34,3%)
≥ 12 meses	18 (17,1%)
Desconocido	2 (1,9%)
Corticoesteroides orales previos al tratamiento con inmunoterapia	
No	82 (78,1%)
Si (< 10 mg de prednisona o equivalente)	8 (7,6%)
Sí (> 10 mg de prednisona o equivalente)	15 (14,3%)
Antibióticos previos al tratamiento con inmunoterapia (30 días) n = 97	18 (17,1%)

2. DATOS DE EFICACIA

La mediana de seguimiento de la serie fue de 11,7 meses (rango intercuartílico 4,5-22,4 meses). La Tasa de Respuesta Objetiva (TRO) fue del 20%. La tasa de control de enfermedad fue del 49,5%, 31 pacientes (29,5%) alcanzaron una estabilización de la enfermedad como mejor respuesta a inmunoterapia. Nueve pacientes no fueron evaluables por fallecer antes de la primera evaluación de respuesta. El grupo de respondedores incluyó a 8 pacientes con RC (7,6%), a 13 pacientes con RP (12,4%) y a 22 pacientes con EE durante más de 6 meses (20,9%), mientras que, el grupo de no respondedores incluyó a 8 pacientes con EE durante menos de 6 meses (7,6%) y a 44 pacientes con PE como mejor respuesta (41,9%). Un paciente no fue evaluable en esta agrupación por fallecer antes de los 6 meses con EE (**Tabla 12**). La mediana de SLP y SG de los 105 pacientes fue de 3 meses (IC 95% 1,1-4,8) y 12,3 meses (IC 95% 10,3-14) respectivamente (**Figura 21**). La tasa de SLP a los 12, 24 y 36 meses fue del 22,3%, 13,2% y 12,1% y la tasa de SG a los 12, 24 y 36 meses fue del 49,1%, 23,6% y 14,5% respectivamente. La tasa de largos supervivientes fue del 10,2% a los 4 años. En el momento del análisis de los datos (2-Agosto-2022), 6 pacientes estaban todavía en curso de tratamiento sin evidencia de progresión, 8 pacientes no habían progresado pero no continuaban tratamiento con inmunoterapia por toxicidad o por cumplir el plan terapéutico pre-establecido (35 ciclos), 2 estaban vivos tras haber progresado a inmunoterapia y 89 habían fallecido.

Tabla 12. Grupos en función de respuesta RECIST (N = 95)

Tabla 12	RC	RP	EE	EE	PE
			> 6 meses	< 6 meses	
Grupo de respondedores (N= 43)	8/95	13/95	22/95	-	-
Grupo de no respondedores (N = 52)	-	-	-	8/95	44/95

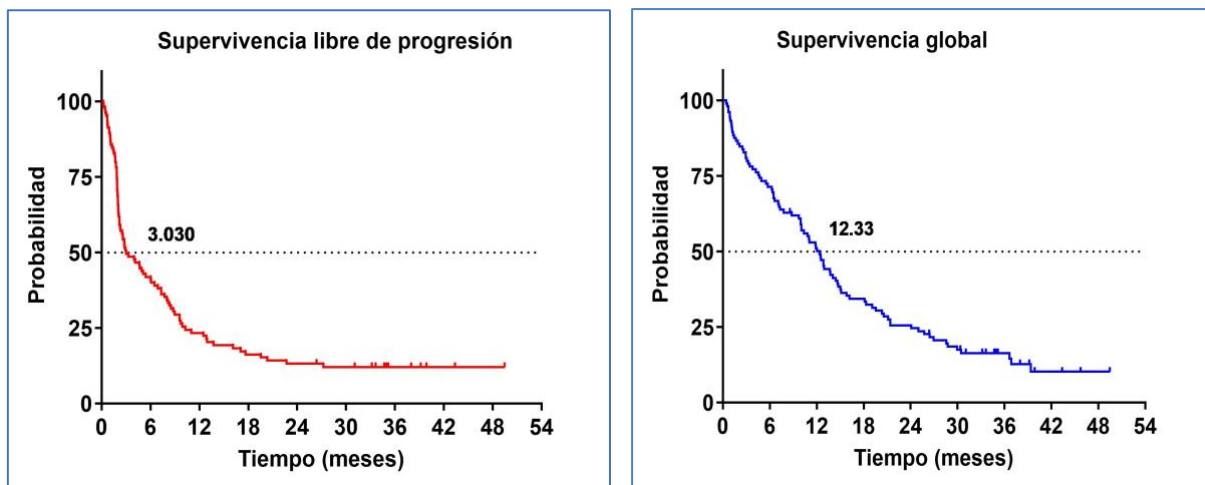


Figura 21. SLP y SG del total de la serie de pacientes (n=105)

3. ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES CLÍNICAS Y SUPERVIVENCIA

Análisis univariante Kaplan-Meier para SLP y SG

La **tabla 13** muestra los resultados del **análisis Kaplan-Meier univariante para SLP y SG en función de variables clínicas**. La **dicotomización de las variables clínicas** introducidas para el análisis univariante en el modelo fue la siguiente: edad (<63 vs ≥63 años (mediana) y <70 vs ≥70 años), género (varón vs mujer), presencia de comorbilidad como EPOC o enfermedad autoinmune (sí vs no), ECOG-PS previo a inmunoterapia (0-1 vs 2), tipo histológico (carcinoma escamoso vs no escamoso), descriptor M1 previo al inicio de inmunoterapia (M0-M1a-M1b vs M1c), número de localizaciones metastásicas (<3 vs ≥3), carga tumoral (< 65 mm vs ≥ 65 mm –mediana–), presencia de metástasis cerebrales o hepáticas previas al inicio de inmunoterapia (sí vs no), estadio inicial (estadio I-II-III vs IV), expresión de PD-L1 (<1% vs ≥1% y <50% vs ≥50%), tiempo a la progresión desde el inicio de la QT de 1ª línea (<3 meses vs ≥3 meses), línea de tratamiento de inmunoterapia (2ª línea vs ≥3ª línea), respuesta objetiva a inmunoterapia (RC o RP vs EE o PE), tipo de respuesta (respondedor vs no respondedor), necesidad de corticoides orales >10 mg de prednisona o equivalente o de antibióticos previos a inicio de inmunoterapia (sí vs no), desarrollo de toxicidad inmunomediada de cualquier grado o grado 3/4 con el tratamiento (sí vs no) y RNL en función de punto de corte del valor de la mediana (<4 vs ≥4).

El **análisis univariante para SLP** mostró una mayor SLP para aquellos pacientes con ECOG-PS 0-1 ($p=0,005$), descriptor M0-M1a-M1b ($p=0,012$), carga tumoral <65 mm ($p=0,043$), PD-L1 $\geq 50\%$ ($p<0,0001$), tiempo a la progresión desde el inicio de quimioterapia de 1ª línea >3 meses ($p=0,023$) y presencia de toxicidad inmunomediada ($p<0,0001$) de forma estadísticamente significativa (**Tabla 13**).

El **análisis univariante para SG** objetivó una mayor SG para aquellos pacientes con ECOG-PS 0-1 ($p<0,0001$), descriptor M0-M1a-M1b ($p=0,014$), carga tumoral <65 mm ($p=0,006$), expresión de PD-L1 $\geq 50\%$ ($p=0,001$), tiempo a la progresión desde el inicio de QT de 1ª línea ≥ 3 meses ($p=0,011$), respuesta objetiva (RC o RP; $p<0,0001$) o paciente respondedor (RC-RP-EE >6 meses; $p<0,0001$), ausencia de toma de antibióticos previo a inmunoterapia ($p=0,04$), desarrollo de toxicidad inmunomediada de cualquier grado ($p<0,0001$) y RNL <4 ($p=0,028$) de forma estadísticamente significativa (**Tabla 13**).

Tabla 13. Asociación entre variables clínicas y resultados de supervivencia

Variables clínicas	mSLP	mSG
Edad mediana (< 63 vs ≥ 63)	2,99 vs 2,89 meses $p=0,556$	12,68 vs 11,72 meses $p=0,264$
Edad 70 años (< 70 vs ≥ 70)	2,59 vs 5,94 meses $p=0,368$	12,68 vs 10,84 meses $p=0,316$
Género (varón vs mujer)	2,76 vs 4,56 meses $p=0,515$	12,15 vs 11,82 meses $p=0,319$
Enfermedad autoinmune (sí vs no)	4,83 vs 2,89 meses $p=0,313$	5,65 vs 12,15 meses $p=0,532$
Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (sí vs no)	2,99 vs 2,89 meses $p=0,862$	11,66 vs 12,64 meses $p=0,66$
ECOG-PS (0-1 vs 2)	4,83 vs 1,87 meses $p=0,005$ HR 2,06 (1,23-3,45) $p=0,006$	13,53 vs 2,89 meses $p<0,0001$ HR 3,31 (1,95-5,6) $p<0,0001$
Histología (escamosa vs no escamosa)	5,32 vs 2,72 meses $p=0,378$	10,87 vs 12,64 meses $p=0,8$
Descriptor M (M0-M1a-M1b vs M1c)	6,4 vs 2,56 meses $p=0,012$ HR 1,71 (1,11-2,63) $p=0,014$	14,78 vs 9,79 meses $p=0,014$ HR 1,7 (1,1-2,61) $p=0,016$
Localizaciones M1 (< 3 vs ≥ 3)	4,83 vs 2 meses $p=0,068$	12,68 vs 6,14 meses $p=0,067$
Carga tumoral (< 65 vs ≥ 65 mm) N=87	6,4 vs 2,79 meses $p=0,043$ HR 1,59 (1,009-2,51) $p=0,046$	14,91 vs 9,88 meses $p=0,006$ HR 1,89 (1,18-3,01) $p=0,007$
Estadio inicial (I-II-III vs IV)	4,6 vs 2,59 meses $p=0,239$	11,82 vs 12,15 meses $p=0,649$

Expresión PD-L1 (< 1% vs ≥ 1%) N=98	2,07 vs 5,02 meses p=0,137	10,67 vs 14,91 meses p=0,09
Expresión PD-L1 (< 50% vs ≥ 50%)	2,56 vs NR meses p<0,0001 HR 0,19 (0,07-0,49) p<0,0001	10,87 vs NR meses p=0,001 HR 0,24 (0,09-0,6) p=0,002
Línea inmunoterapia (2ª línea vs ≥3ª línea)	2,76 vs 4,07 meses p=0,336	11,72 vs 12,68 meses p=0,546
Tiempo a la progresión tras 1ª línea QT (≥ 3 meses vs < 3 meses)	4,6 vs 2,03 meses p=0,023 HR 1,82 (1,07-3,1) p=0,026	12,68 vs 4,6 mese p=0,011 HR 1,95 (1,15-3,31) p=0,013
Metástasis cerebrales (sí vs no)	2,03 vs 3,94 meses p=0,666	7,65 vs 12,28 meses p=0,618
Metástasis hepáticas (sí vs no)	2,49 vs 4,07 meses p=0,231	7,65 vs 12,28 meses p=0,178
Respuesta objetiva (RC o RP vs EE o PE)	-	NR vs 10,87 meses p<0,0001 HR 7,28 (3,28-16,13) p<0,0001
Tipo de respuesta (respondedor vs no respondedor)	-	24,67 vs 7,22 meses p<0,0001 HR 4,11 (2,53-6,67) p<0,0001
Corticoides pre-inmuno (no o < 10 mg prednisona vs ≥ 10 mg prednisona)	3,94 vs 2,26 meses p=0,499	12,35 vs 3,02 meses p=0,102
Antibióticos preinmuno (sí vs no)	1,84 vs 4,56 meses p=0,085	8,67 vs 13,5 meses p=0,04 HR 1,74 (1,01-3,00) p=0,043
Toxicidad inmunomediada (no vs sí)	2,13 vs 9,56 meses p<0,0001 HR 0,33 (0,21-0,53) p<0,0001	9,88 vs 20,27 meses p<0,0001 HR 0,34 (0,21-0,55) p<0,0001
No toxicidad o G1 vs ≥G2	2,59 vs 10,11 meses p<0,0001 HR 0,36 (0,22-0,61) p<0,0001	10,84 vs 20,83 meses p<0,0001 HR 0,37 (0,22-0,62) p<0,0001
Toxicidad grado 3-4 (sí vs no)	7,19 vs 4,07 meses p=0,892	17,84 vs 12,68 meses p=0,616
RNL mediana (< 4,07 vs ≥ 4,07)	5,97 vs 2,13 meses p=0,136	14,55 vs 8,67 meses p=0,028 HR 1,58 (1,04-2,41) p=0,03

4. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS POBLACIONES CELULARES INMUNES

Se llevaron a cabo análisis de las poblaciones celulares circulantes en 14 *Healthy Donors* (HD). La mediana del porcentaje de MDSCs totales para 14 HD fue de 1,97% y para Treg fue de 0,79%. La **mediana de MDSCs totales** con respecto a las PBMCs de nuestra serie fue del 6,6% (rango 0,5-39,8%) siendo la subpoblación predominante las PMN-MDSCs (mediana 3,09%; rango 0,02-38,39%). La mediana de MDSCs totales fue significativamente mayor en los pacientes con CPNM con respecto a los HD, tanto en la población M0 ($p=0,015$) como M1 ($p=0,001$) (**Figura 22**). La población de linfocitos Treg supuso un 1,15% (mediana) respecto a la celularidad total (rango 0,05-4,2%) (**Tabla 14**, **Figura 23**).

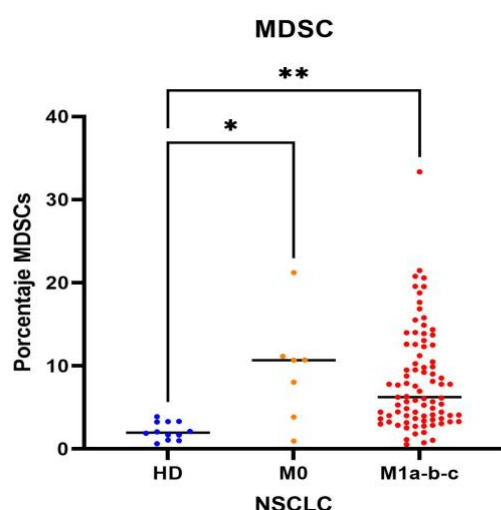


Figura 22. Proporción de MDSCs totales en HD y pacientes con CPNM M0 y M1

Tabla 14. Proporciones de poblaciones celulares inmunes circulantes basales

Población celular	Mediana	Mínimo	Máximo	Desviación estándar	Coefficiente de variación
Monocitos	12,07	2,22	50,74	9,14	63,3%
MDSCs totales	6,64	0,54	39,84	7,39	83,3%
PMN-MDSCs	3,09	0,02	38,39	6,65	125,5%
M-MDSCs	1,48	0,06	10,33	1,82	91,6%
e-MDSCs	1,24	0,06	7,02	1,24	80,1%
Linfocitos CD4+	24,18	0,04	53,95	11,73	47,4%
Linfocitos CD8+	17,56	0,05	46,75	9,44	51,2%
Linfocitos Treg	1,15	0,05	4,2	0,79	60%
Células NK	7,75	0,05	30,08	6,18	69,4%
Células NK-T	1,3	0,01	25,51	5,68	164,9%

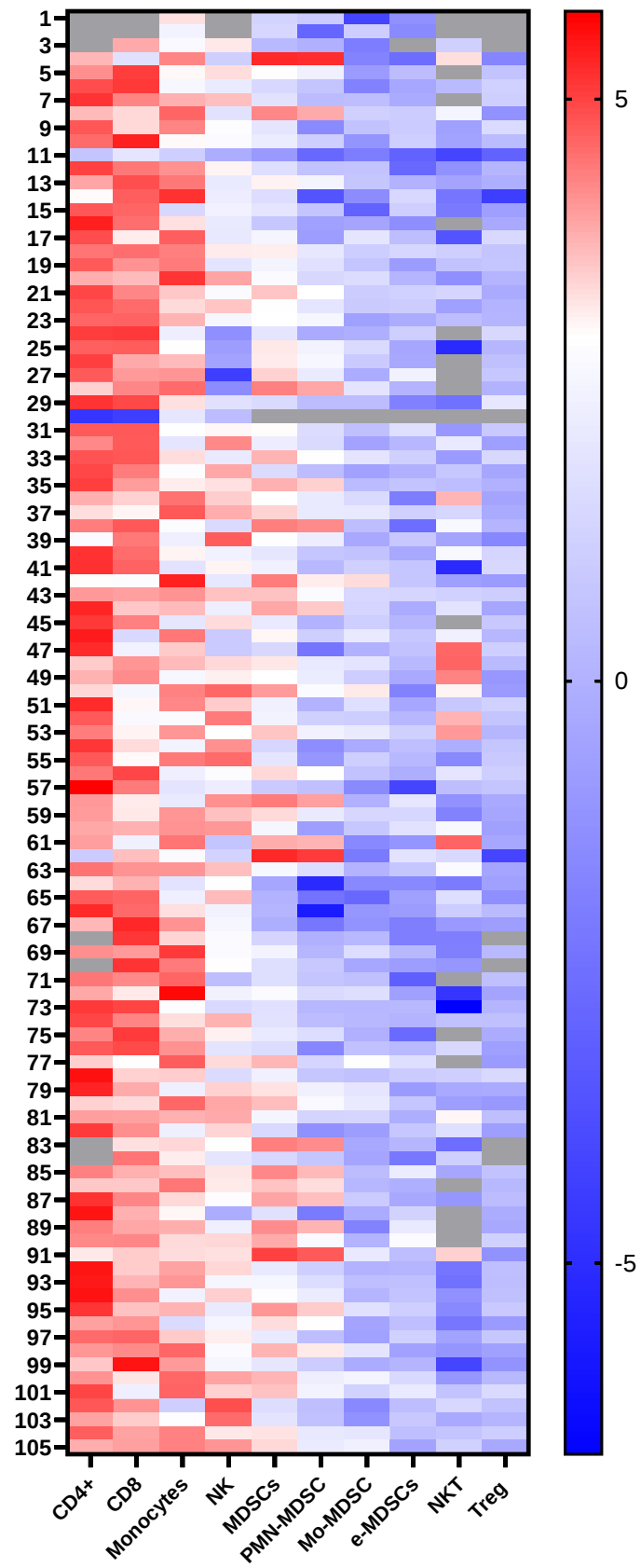


Figura 23. Proporciones de poblaciones celulares inmunes circulantes basales

4.1. Asociación entre poblaciones celulares circulantes y respuesta

No se encontraron diferencias en la proporción de MDSCs totales y subpoblaciones basales entre el grupo de respondedores y el grupo de no respondedores a inmunoterapia (Test Chi-cuadrado, $p=NS$). No se encontraron diferencias en la proporción basal de otras poblaciones celulares circulantes (linfocitos T CD4+, CD8+, Treg, monocitos, células NK y NKT) entre el grupo de respondedores y el grupo de no respondedores a inmunoterapia (Test Chi-cuadrado, $p=NS$).

4.2. Asociación entre poblaciones celulares mieloides circulantes y supervivencia

La **tabla 15** muestra los resultados del **análisis Kaplan-Meier univariante para SLP y SG en función de las poblaciones inmunes circulantes basales**. La proporción de las diferentes poblaciones celulares (MDSCs totales, PMN-MDSCs, M-MDSCs, e-MDSCs, monocitos, Treg, CD4+, CD8+, NK y NT-K) está dicotomizada en función del punto de corte del valor de la mediana del porcentaje de células respecto a la celularidad total ("*high*" vs "*low*", alto vs bajo).

En el **análisis de las poblaciones celulares mieloides (MDSC totales y subpoblaciones)**, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en las medianas de SLP (mSLP) en los pacientes con unos niveles basales totales de MDSCs "*high*" vs "*low*". Sin embargo, sí que observamos una mayor mediana de SG (mSG) en el análisis con test log-rank en los pacientes con una proporción basal de MDSCs totales y PMN-MDSCs "*low*" respecto al grupo de MDSCs totales y PMN-MDSCs "*high*" (MDSCs totales: 14,8 vs 9,6 meses; $p=0,01$) (**Figura 24**) y PMN-MDSCs: 14,2 vs 10,7 meses; $p=0,04$) (**Figura 25**). No encontramos diferencias en las mSG en el resto de subpoblaciones de células mieloides basales (monocitos, M-MDSCs y e-MDSCs).

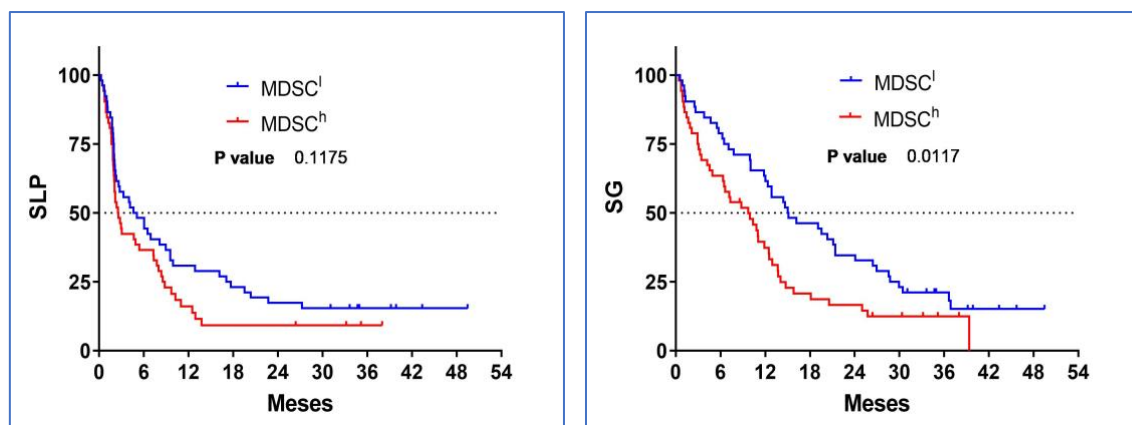


Figura 24. Curvas de SLP y SG en función del % de MDSCs totales circulantes basales

MDSC^l: Proporción MDSCs totales low. **MDSC^h:** Proporción MDSCs totales high.

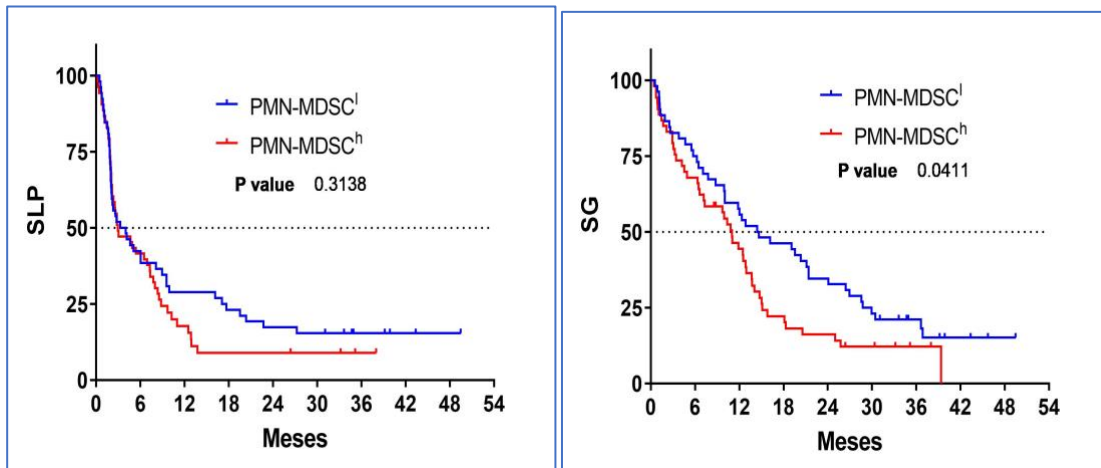


Figura 25. Curvas Kaplan-Meier de SLP y SG en función del porcentaje absoluto de PMN-MDSCs totales circulantes basales

PMN-MDSC^l: Proporción PMN-MDSCs low. PMN-MDSC^h: Proporción PMN-MDSCs high.

4.3. Asociación entre poblaciones celulares linfoides circulantes y supervivencia

En el análisis de las poblaciones celulares linfoides (linfocitos T CD4+, CD8+, Treg, NK y NK-T), no encontramos diferencias estadísticamente significativas en las mSLP en los pacientes con unos niveles basales totales “high” vs “low”. Sin embargo, sí que observamos una mayor mSG en el análisis con test log-rank en los pacientes con una proporción basal de Treg “high” respecto al grupo de Treg “low” (14,8 vs 9,8 meses; $p=0,02$) (Figura 26). No encontramos diferencias en las mSG en el resto de poblaciones de células linfoides basales (CD4+, CD8+, NK y NK-T) (Tabla 15).

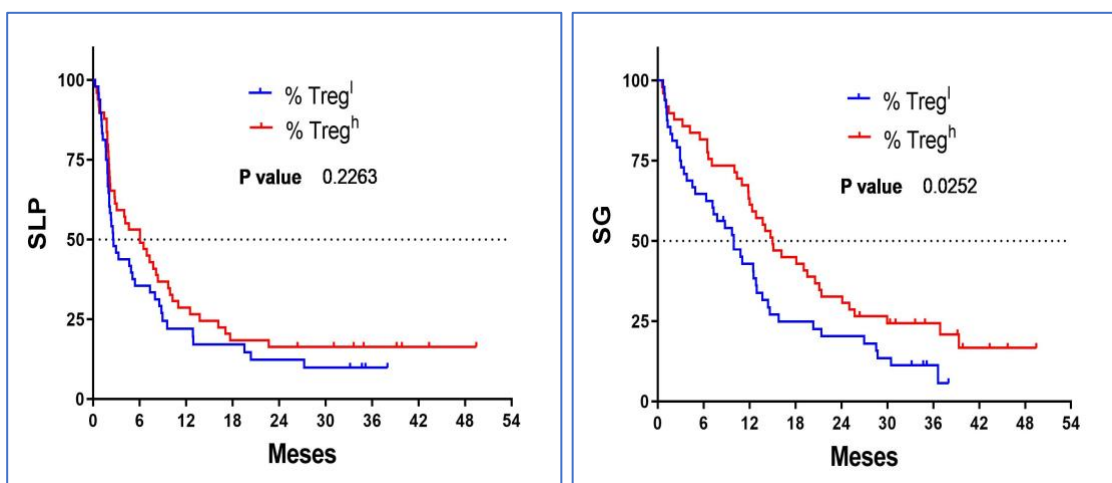


Figura 26. Curvas de SLP y SG en función del porcentaje de Treg circulantes

(%Treg^l: Proporción Treg low. %Treg^h: Proporción Treg high)

Tabla 15. Análisis univariante para SLP y SG de las poblaciones celulares inmunes (N=105)

Poblaciones celulares circulantes basales	mSLP	mSG
MDSCs totales (L: <6,6% vs H: ≥6,6%)	4,56 vs 2,49 meses p=0,119	14,78 vs 9,59 meses p=0,012 HR 1,71 (1,12-2,62) p=0,013
PMN-MDSCs respecto a PBMCs (L: < 3% vs H: ≥ 3%)	3,25 vs 2,89 meses p=0,333	14,22 vs 10,67 meses p=0,041 HR 1,55 (1,01-2,37) p=0,043
e-MDSCs respecto a PBMCs (L: <1,2% vs H: ≥1,2%)	2,56 vs 4,6 meses p=0,603	10,21 vs 12,35 meses p=0,76
M-MDSCs respecto a PMBCs (L: < 1,5% vs H: ≥ 1,5%)	3,94 vs 2,56 meses p=0,252	12,35 vs 10,84 meses p=0,227
Treg respecto a celularidad total (L: < 1,1% vs H: ≥ 1,1%) N=97	2,56 vs 5,97 meses p=0,228	9,79 vs 14,78 meses p=0,025 HR 0,60 (0,38-0,94) p=0,027
NK (L: < 7,7% vs H: ≥ 7,7%) N=103	2,89 vs 3,25 meses p=0,437	11,82 vs 12,35 meses p=0,42
CD4+ (L: < 24,2% vs H: ≥ 24,2%) N=98	2,79 vs 5,94 meses p=0,746	11,66 vs 14,78 meses p=0,274
CD8+ (L: <17,6% vs H: ≥ 17,6%) N=103	2,13 vs 4,6 meses p=0,291	10,67 vs 12,68 meses p=0,319
Monocitos (L: <12% vs H: ≥ 12%)	2,76 vs 4,56 meses p=0,783	12,64 vs 11,72 meses p=0,302

4.4. Análisis multivariante regresión de COX

En el **análisis multivariante de Cox** se confirmó que las únicas variables clínicas que mantenían significación estadística de forma independiente para una mayor **SLP** fueron el desarrollo toxicidad inmunomediada de cualquier grado comparado con la no aparición de toxicidad (HR 0,36; p<0,0001) y la expresión de PD-L1 TPS ≥50% (HR 0,25; p=0,009), mientras que, el descriptor M1c frente a M0-M1a-M1b se asoció de una forma independiente a una menor SLP (HR 1,84; p=0,015) (**Tabla 16**).

En el **análisis multivariante de Cox para SG** se incluyeron en el modelo las variables clínicas y citométricas en las que encontramos diferencias estadísticamente significativas en SG en el análisis univariante. Los únicos factores que mantienen la significación estadística de forma independiente para una menor SG fueron el tipo de respuesta (no respondedor vs respondedor: HR 6,41; $p < 0,0001$), ECOG (2 vs 0-1: HR 6,08; $p < 0,0001$), el descriptor M1 previo a inmunoterapia (M1c vs M0-M1a-M1b: HR 3,04; $p = 0,001$), el RNL (≥ 4 vs < 4 : HR 3,35; $p < 0,01$) y las MDSCs totales circulantes basales ($\geq 6,3\%$ vs $< 6,3\%$: HR 2,18; $p = 0,015$) (**Tabla 17**).

Tabla 16. Resumen análisis multivariante de Cox para SLP de variables clínicas y citométricas

Factor	Comparación	Hazard Ratio	IC 95%	p valor
Toxicidad inmunorelacionada	Sí vs No	0,36	0,21-0,60	<0,0001
Expresión PD-L1	<50% vs $\geq 50\%$	0,25	0,08-0,70	0,009
Descriptor M1	M0-M1a-M1b vs M1c	1,84	1,12-3,02	0,025
ECOG	0-1 vs 2			$p = 0,322$
Tiempo a la progresión desde inicio QT 1ª línea	< 3 vs ≥ 3 meses			$p = 0,169$

Tabla 17. Resumen análisis multivariante de Cox para SG de variables clínicas y citométricas

Factor	Comparación	Hazard Ratio	IC 95%	p valor
Tipo de respuesta	Respondedor vs No respondedor	6,41	3,36-12,21	<0,0001
ECOG	0-1 vs 2	6,08	2,20-16,75	<0,0001
Descriptor M1 previo a inmunoterapia	M0-M1a-M1b vs M1c	3,04	1,59-5,81	0,001
RNL	≤ 4 vs > 4 (punto corte mediana)	2,35	1,22-4,51	0,01
MDSC totales	High vs low	2,18	1,16-4,12	0,015
Antibióticos preinmuno	Sí vs No			0,219
Toxicidad inmunorelacionada	Sí vs No			0,247
Expresión PD-L1	<50% vs $\geq 50\%$			0,051
PMN-MDSCs basales	High vs low			0,645
Treg basales	High vs low			0,492
Tiempo a la progresión desde inicio QT 1ª línea	≤ 3 meses vs > 3 meses			0,598
Carga tumoral	< 65 mm vs ≥ 65 mm			0,098

4.5. Asociación entre MDSCs y RNL

Se disponía del recuento de neutrófilos y linfocitos totales para el cálculo de la RNL previa al inicio de inmunoterapia de los 105 pacientes de nuestra serie. La mediana de RNL fue de 4,07 (rango 1,07-31,09). No encontramos diferencias en las mSLP en función de RNL basal. Sin embargo, en el análisis univariante de supervivencia se objetivó que los pacientes con RNL por encima del punto de corte de la mediana (≥ 4) presentaron una mSG inferior al grupo de pacientes con RNL < 4 de forma estadísticamente significativa (HR 1,58; $p=0,03$) (**Figura 27**).

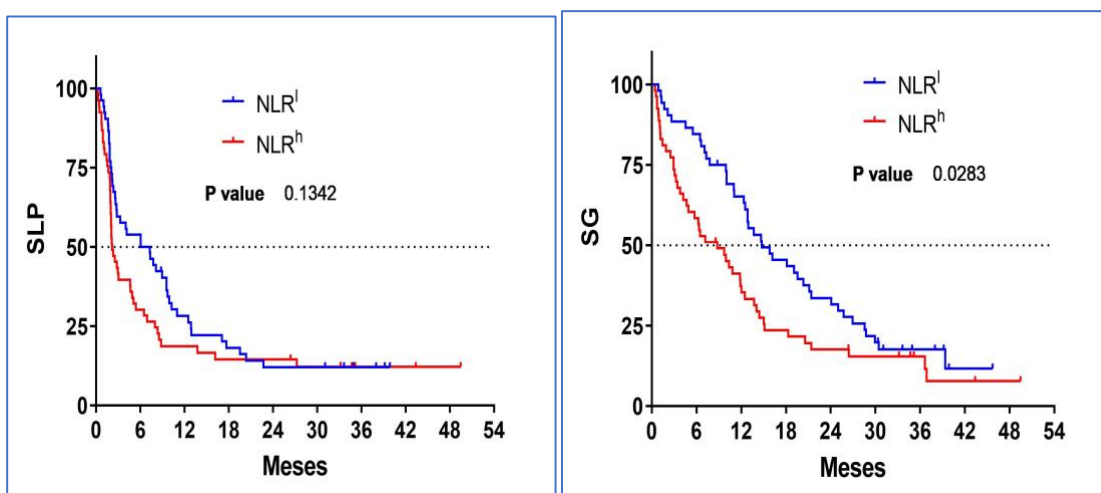


Figura 27. Curvas de supervivencia que muestran el impacto en SLP y SG de RNL basal dicotomizado por el punto de corte de la mediana

(**NLR^l**: Ratio Neutrófilo/Linfocito low. **NLR^h**: Ratio Neutrófilo/Linfocito high).

PMN-MDSCs constituyen la subpoblación mayoritaria de MDSCs en pacientes con CPNMa, podemos observar, una correlación fuerte entre ambas poblaciones celulares en nuestra serie (r de Pearson = 0,88 [IC 95% 0,83-0,92]; $p<0,0001$). Tanto la proporción de MDSC totales (r de Pearson = 0,39 [IC 95% 0,21-0,54]; $p<0,0001$) como de PMN-MDSC basales circulantes (r de Pearson = 0,38 [IC 95% 0,20-0,53]; $p<0,0001$) presentaron una correlación directa con el RNL (**Figura 28**). Los pacientes con una proporción “low” de MDSCs totales tuvieron también valores “low” de RNL ($p=0,0007$) y RPL ($p=0,01$), de esta manera, el 64% de los pacientes con una proporción de MDSCs “low” tuvieron también unos niveles bajos de RNL y RPL (Chi-cuadrado; $p=0,02$) (**Figura 29**).

Si combinamos estas variables (RNL y RPL) con la proporción de MDSCs totales mejoramos considerablemente la capacidad predictiva de supervivencia tras inmunoterapia como podemos observar en la **figura 30**. De esta forma, los pacientes con unos niveles “low” de MDSCs, RNL y RPL alcanzaron mSLP y mSG mayores que aquellos pacientes con niveles “high” para las tres variables (mSLP: 8,9 vs 2,2 meses; $p=0,02$ y mSG: 20,3 vs 7,2 meses; $p=0,0008$). Además, agrupando las tres variables podemos identificar a los pacientes con mayor probabilidad de presentar una supervivencia prolongada tras inmunoterapia, así, el 83% de los pacientes MDSCs, RNL y RPL “low” tuvieron una supervivencia superior a 2 años, mientras que, el 82% de los pacientes con niveles “high” de las 3 variables fallecieron en los 3 primeros meses (Chi-cuadrado; $p=0,003$) (**Figura 31**).

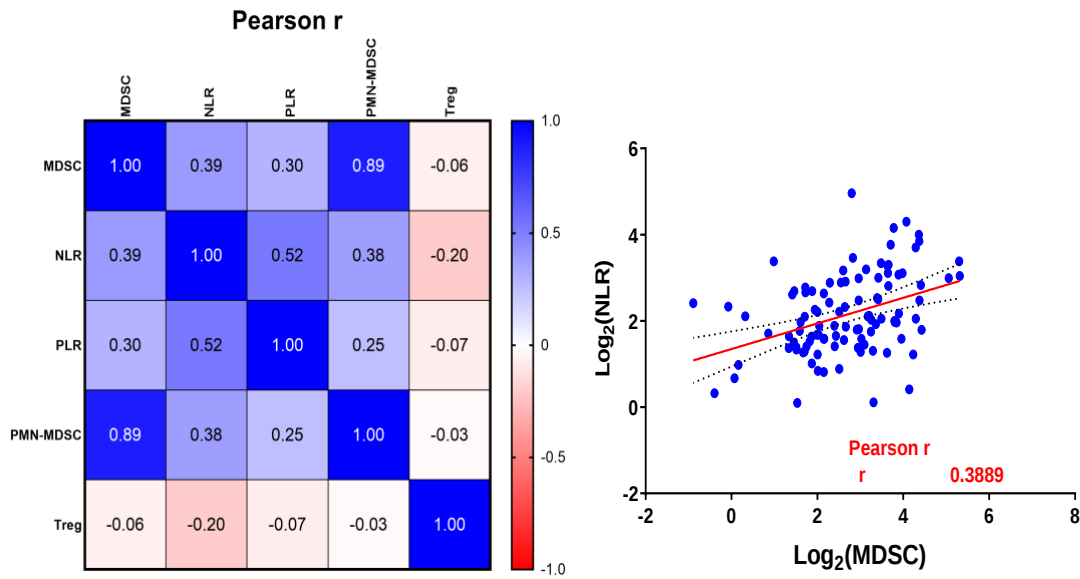


Figura 28. Correlación entre MDSCs y subpoblaciones con RNL/RPL

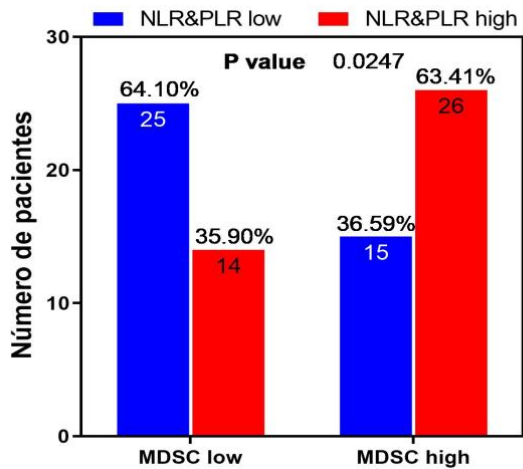


Figura 29. Correlación entre proporción de MDSCs high/low y RNL/RPL high/low

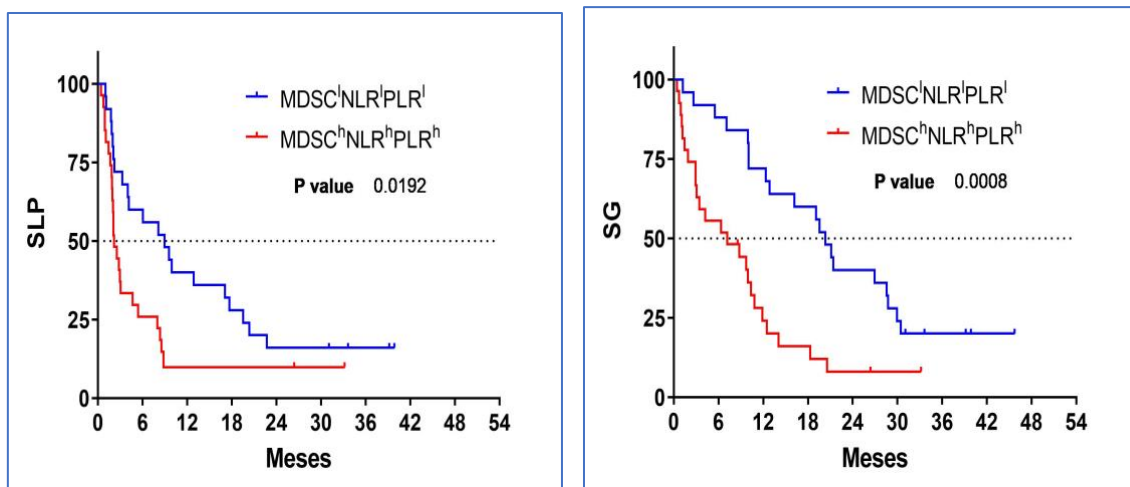


Figura 30. Curvas de SLP y SG en función de proporción de MDSCs y RNL/RPL high vs low

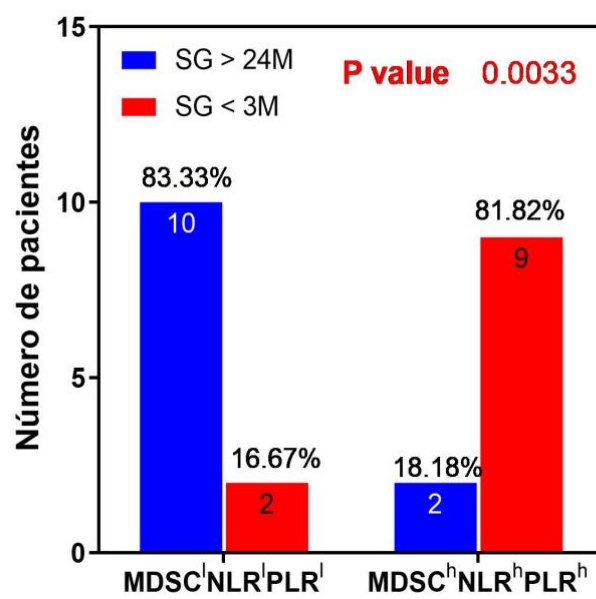


Figura 31. Correlación entre niveles de MDSCs, RNL y RPL high vs low con probabilidad de larga supervivencia (>24 meses) y muerte precoz (<3 meses)

5. RESULTADOS ANÁLISIS DE VARIABLES GÉNICAS EN MDSCs

Se llevó a cabo un análisis de transcriptómica en las MDSCs circulantes aisladas de 14 HD y de 100 pacientes con CPNMa tratados con ICIs. En la **tabla 18** se resumen las medianas de expresión y rangos de los genes de la vía Notch, PD-L1, ARG1 e IDO1 analizados en las MDSCs aisladas de los pacientes de nuestra serie. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de expresión de genes de la vía Notch en MDSCs en los pacientes con CPNMa con respecto a HD (**Figura 32**).

Tabla 18. Medianas de expresión de genes vía Notch, PD-L1, ARG1 e IDO1 en MDSCs

Gen vía Notch	Mediana	Rango
NOTCH1	1,13	<0,0001-7,19
NOTCH2	1,32	0,07-19,65
JAG1	1,31	0,38-19,04
JAG2	0,42	0,008-5,57
HES1	1,03	0,74-46,09
HEY1	1,22	0,07-10,94
PD-L1	1,39	0,021-14,97
ARG1	2,07	0,03-14,95
IDO1	0,44	0,006-11,10

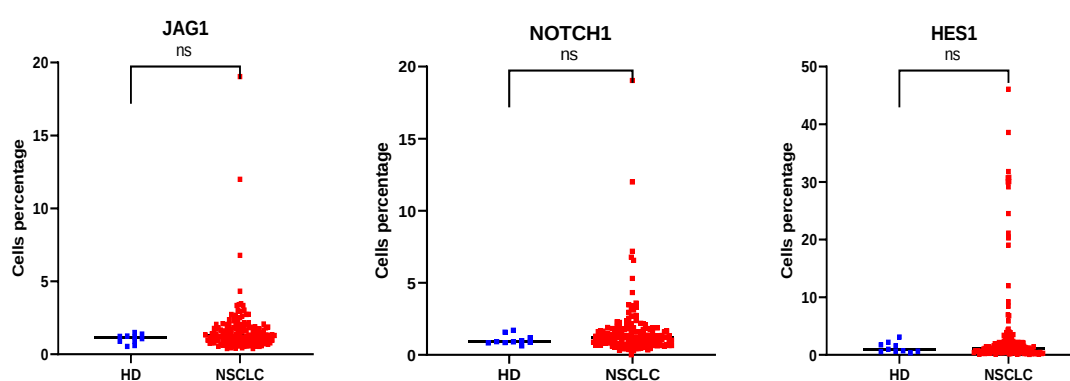


Figura 32. Expresión de genes Notch en MDSCs en HD y pacientes con CPNMa

5.1. Asociación entre expresión de genes en MDSCs y respuesta

No se encontraron diferencias significativas entre el grupo de respondedores y el grupo de no respondedores a inmunoterapia, ni en los genes de la vía Notch (Test Chi-cuadrado, $p=NS$) (**Figura 33**), ni en la expresión de PD-L1, ARG1 e IDO1 en MDSCs circulantes basales (Test Chi-cuadrado, $p=NS$) (**Figura 34**).

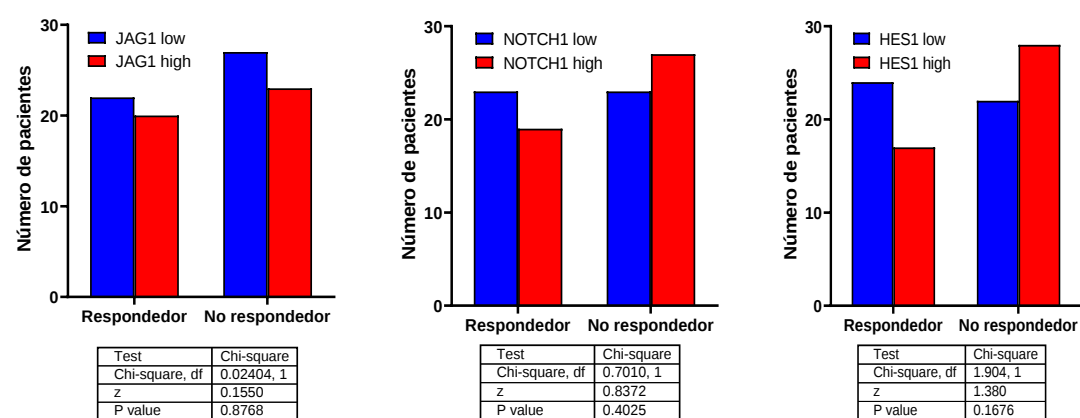


Figura 33. Correlación entre expresión de genes vía Notch en MDSCs y respuesta

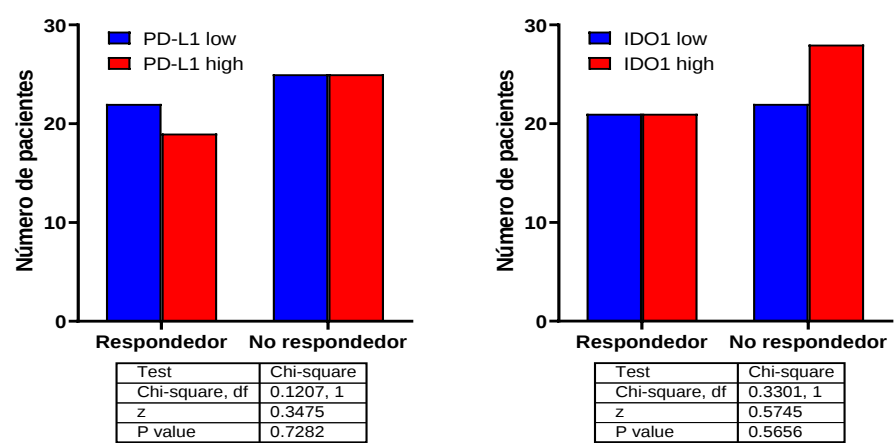


Figura 34. Correlación entre expresión de PD-L1 e IDO1 en MDSCs y respuesta

5.2. Asociación entre expresión de genes en MDSCs y supervivencia

La **tabla 19** muestra los resultados del **análisis Kaplan-Meier univariante para SLP y SG en función de la expresión de genes de la vía Notch en MDSCs circulantes** previas al inicio del tratamiento. La expresión de los diferentes genes de la vía Notch (NOTCH1-2, JAG1-2, HES1, HEY1) está dicotomizada en función del punto de corte del valor de la mediana ("*high*" vs "*low*").

En el **análisis de expresión de genes en función de las mSLP**, encontramos diferencias estadísticamente significativas en los pacientes con unos niveles de expresión de JAG1 y HES1 en MDSCs "*high*" vs "*low*". De esta manera, observamos una mayor mSLP en el análisis con test log-rank en los pacientes con un nivel de expresión de JAG1 y HES1 en MDSCs "*low*" respecto al grupo con un nivel de expresión "*high*" (JAG1: 4,56 vs 2,9 meses; $p=0,03$ y HES1: 5 vs 2,2 meses; $p=0,004$) (**Figura 35**). No encontramos diferencias significativas en las mSLP en la expresión del resto de genes.

En el **análisis de expresión de genes en función de las mSG**, encontramos diferencias estadísticamente significativas en los pacientes con unos niveles de expresión de NOTCH1, PD-L1 y HES1 en MDSCs "*high*" vs "*low*". De esta manera, observamos una mayor mSG en los pacientes con un nivel de expresión de NOTCH1 y PD-L1 en MDSCs "*low*" respecto al grupo con un nivel de expresión "*high*" (NOTCH1: 13,8 vs 11,8 meses; $p=0,04$ y PD-L1: 15,4 vs 11,7 meses; $p=0,01$) (**Figura 36**). Por su parte, los pacientes con un nivel de expresión de IDO1 en MDSCs "*high*" presentaron una mayor mSG respecto al grupo con un nivel de expresión "*low*" (14,2 vs 7 meses; $p=0,05$) (**Figura 37**). No encontramos diferencias en las mSG en la expresión del resto de genes analizados.

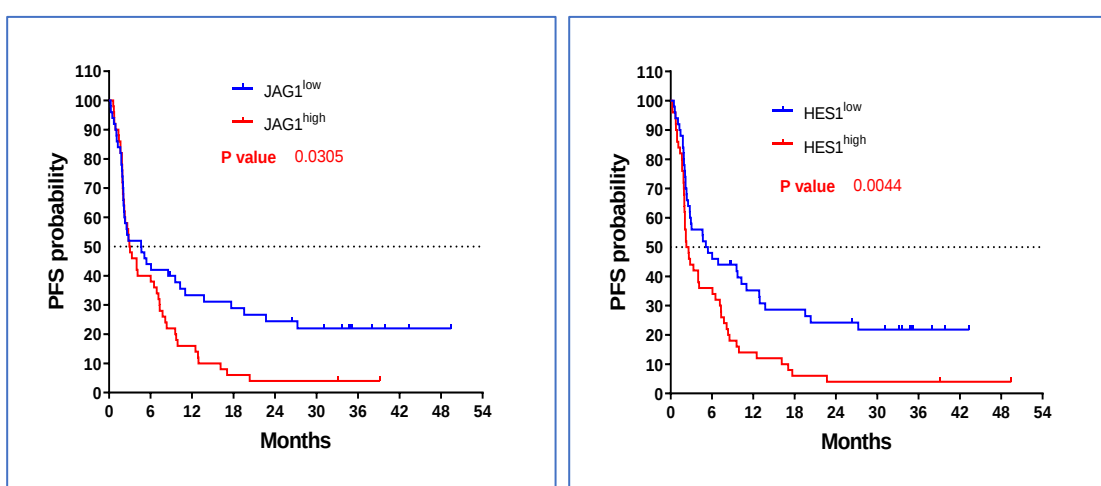


Figura 35. Curvas de SLP en función de expresión de JAG1 y HES1 en MDSCs

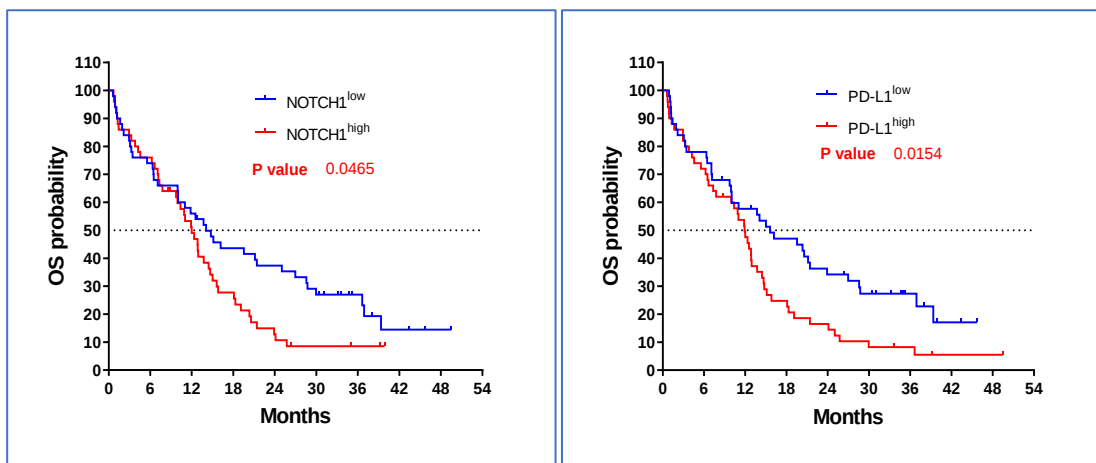


Figura 36. Curvas de SG en función de expresión de NOTCH1 y PD-L1 en MDSCs

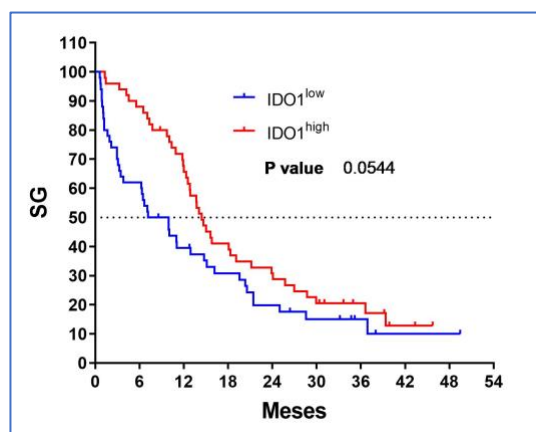


Figura 37. Curvas de SG en función del nivel de expresión de IDO1 en MDSCs

Tabla 19. Análisis univariante Kaplan-Meier para SLP y SG

Gen vía Notch en MDSCs	mSLP	mSG
Expresión NOTCH1 (L: <1,13 vs H: ≥1,13)	5,02 vs 2,76 meses p=0,273	13,86 vs 11,82 meses p=0,047 HR 1,56 (1,00-2,43) p=0,048
Expresión NOTCH2 (L: <1,32 vs H: ≥1,32)	3,25 vs 2,79 meses p=0,870	10,84 vs 13,53 meses p=0,749
Expresión JAG1 (L: <1,31 vs H: ≥1,31)	4,56 vs 2,89 meses p=0,03 HR 1,61 (1,04-2,49) p=0,032	12,35 vs 12,64 meses p=0,094
Expresión JAG2 (L: <0,42 vs H: ≥0,42)	2,89 vs 4,07 meses p=0,961	12,74 vs 12,15 meses p=0,701
Expresión HES1 (L: <1,03 vs H: ≥1,03)	5,02 vs 2,23 meses p=0,004 HR 1,85 (1,2-2,86) p=0,005	12,74 vs 9,88 meses p=0,217
Expresión HEY1 (L: <1,22 vs H: ≥1,22)	4,56 vs 2,23 meses p=0,348	11,82 vs 12,74 meses p=0,831
Expresión PD-L1 (L: <1,39 vs H: ≥1,39)	3,94 vs 2,76 meses p=0,202	15,37 vs 11,72 meses p=0,015 HR 1,71 (1,10-2,65) p=0,017
Expresión ARG1 (L: <2,07 vs H: ≥2,07)	5,97 vs 2,23 meses p=0,067	13,50 vs 11,66 meses p=0,231
Expresión IDO1 (L: <0,44 vs H: ≥0,44)	2,49 vs 3,94 meses p=0,461	7,06 vs 14,22 meses p=0,056 HR 0,65 (0,4-1,01) p=0,056

5.3. Combinación de genes de la vía Notch en MDSCs y supervivencia

Si combinamos la expresión de diferentes genes de la vía Notch en MDSCs podemos mejorar la capacidad predictiva de SLP y SG tras inmunoterapia tal y como observamos en las **figuras 38A, 38B, 38C y 38B**.

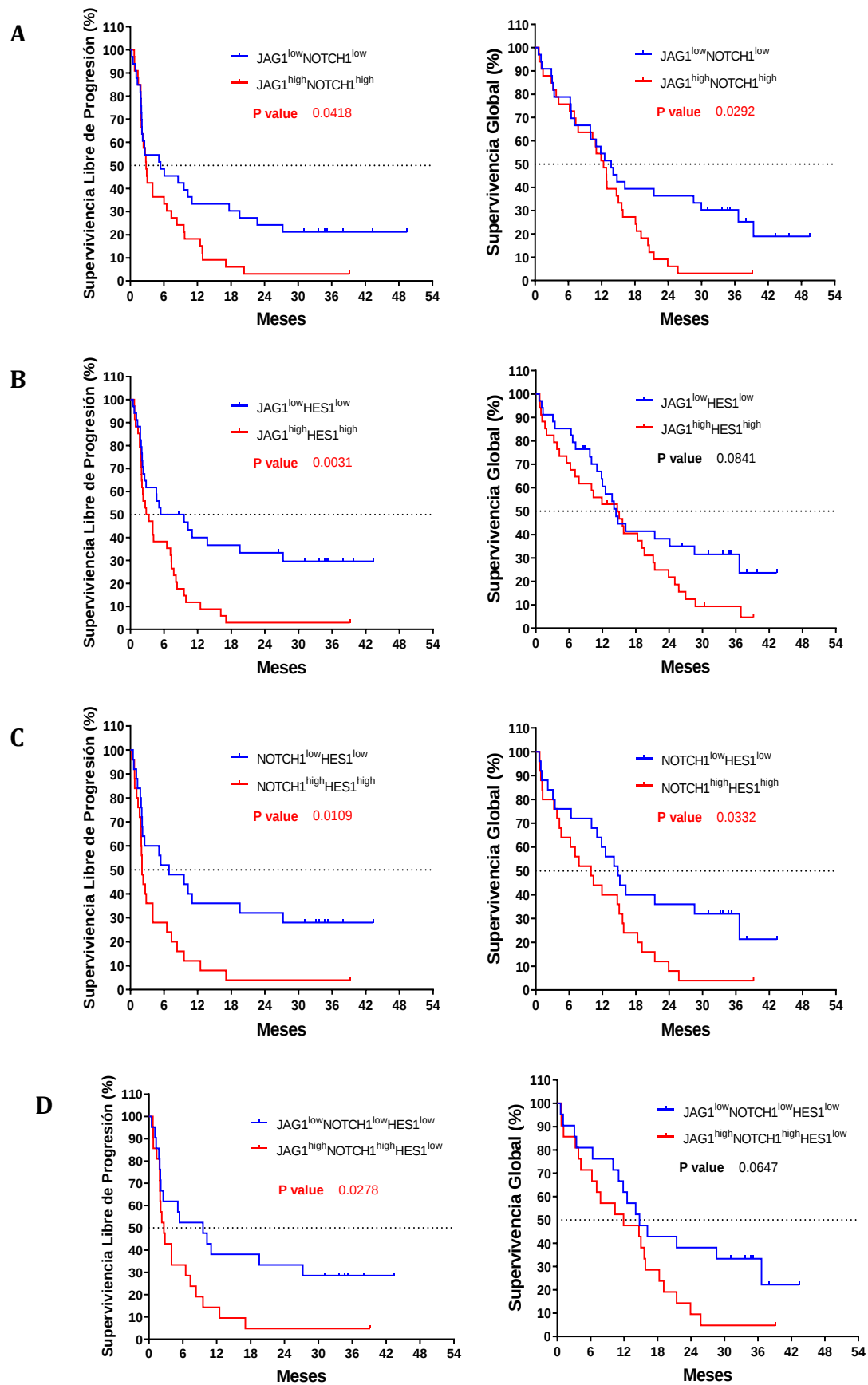


Figura 38. Combinación de expresión entre diferentes genes vía Notch y SLP/SG

5.4. Evolución dinámica expresión de JAG1 en MDSCs y supervivencia

Determinamos los niveles de expresión de JAG1 en MDSCs circulantes previo al inicio del tratamiento con ICIs (basal) y en el momento de la primera evaluación de respuesta (E1) en 19 pacientes con CPNMa en los que disponíamos de datos completos y analizamos si existían diferencias en SLP y SG según unos niveles de expresión “high” o “low” en ambos momentos. De esta manera, la mSLP y la mSG de los pacientes que mantenían una alta expresión de JAG1 en MDSC tanto en el momento basal como en E1 fueron menores que aquellos que mantenían una baja expresión de forma estadísticamente significativa ($p=0,01$ y $p=0,02$, respectivamente) (**Figura 39**).

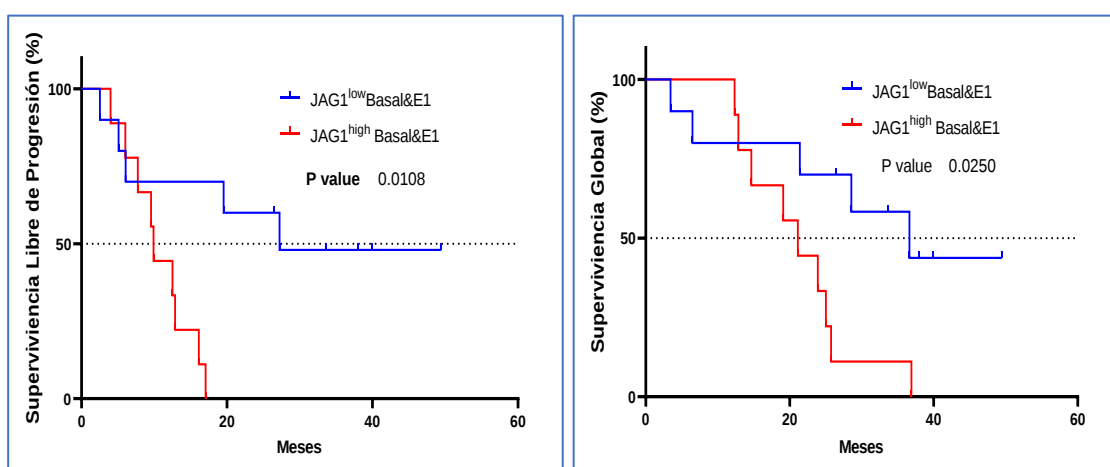


Figura 39. Curvas de SLP y SG en función de expresión de JAG1 en MDSCs en basal y E1

5.5. Análisis multivariante regresión de COX

En el **análisis multivariante de Cox para SLP y SG** se incluyeron en el modelo las variables clínicas y de transcripción de genes de la vía Notch en las que encontramos diferencias estadísticamente significativas en el análisis univariante ($n=100$).

En el **análisis multivariante de Cox**, se confirmó que las únicas variables que mantenían significación estadística de forma independiente para una mayor **SLP** fueron el desarrollo toxicidad inmunomediada de cualquier grado comparado con la no aparición de toxicidad (HR 0,34; $p<0,0001$) y la expresión de PD-L1 $\geq 50\%$ (HR 0,19; $p=0,007$), mientras que, una alta expresión de JAG1 en MDSCs circulantes se asoció de una forma independiente a una menor SLP (HR 1,72; $p=0,03$) (**Tabla 20**).

En el **análisis multivariante de Cox para SG** los únicos factores que mantienen la significación estadística de forma independiente para una menor SG fueron el tipo de respuesta (no respondedor vs respondedor: HR 4,38; $p<0,0001$), el ECOG (2 vs 0-1: HR 3,7; $p=0,003$), el descriptor M1 previo a inmunoterapia (M1c vs M0-M1a-M1b: HR 2,46; $p=0,002$) y un nivel de expresión alto de PD-L1 en MDSCs circulantes (High vs low: HR 2,25; $p=0,004$), mientras que, una alta expresión de IDO1 en MDSCs (High vs low: HR 0,45; $p=0,006$) y el desarrollo de toxicidad inmunomediada (sí vs no: HR 0,49; $p=0,03$) se asoció de forma independiente con una mayor mSG (**Tabla 21**).

Tabla 20. Resumen análisis multivariante del modelo de Cox para SLP

Factor	Comparación	Hazard Ratio	IC 95%	p valor
Toxicidad inmunorelacionada	Sí vs No	0,34	0,20-0,58	<0,0001
Expresión PD-L1	<50% vs ≥50%	0,19	0,05-0,63	0,007
Expresión JAG1	High vs Low	1,72	1,04-2,85	0,035
Expresión HES1	High vs low			0,264
ECOG	0-1 vs 2			0,22
Descriptor M1	M0-M1a-M1b vs M1c			0,054
Tiempo a la progresión desde inicio QT 1ª línea	≤3 meses vs >3 meses			0,078

Tabla 21. Resumen análisis multivariante del modelo de Cox para SG

Factor	Comparación	Hazard Ratio	IC 95%	p valor
Tipo de respuesta	Respondedor vs No respondedor	4,38	2,24-8,56	<0,0001
ECOG	0-1 vs 2	3,7	1,57-8,72	0,003
Descriptor M1 previo a inmunoterapia	M0-M1a-M1b vs M1c	2,46	1,4-4,31	0,002
Expresión PD-L1	High vs low	2,25	1,3-3,89	0,004
Expresión IDO1	High vs low	0,45	0,26-0,79	0,006
Toxicidad inmunorelacionada	Sí vs No	0,49	0,26-0,94	0,032
Expresión PD-L1	<50% vs ≥50%			0,077
Expresión NOTCH1	High vs low			0,574
Tiempo a la progresión desde inicio QT 1ª línea	≤3 meses vs >3 meses			0,686

5.6. Análisis multivariante de COX conjunto: Variables clínicas, citométricas y transcriptómicas

Llevamos a cabo un **análisis multivariante de Cox para SG** en aquellos pacientes en los que disponíamos de datos completos de variables clínicas, citométricas y transcriptómicas (n=100). Los únicos factores que mantienen la significación estadística de forma independiente para una menor SG fueron el tipo de respuesta (no respondedor vs respondedor: HR 4,7; $p<0,0001$), el descriptor M1 previo a inmunoterapia (M1c vs M0-M1a-M1b: HR 3; $p<0,0001$), un nivel de expresión alto de PD-L1 en MDSCs circulantes (High vs low: HR 2,8; $p=0,001$), el ECOG (2 vs 0-1: HR 2,62; $p=0,04$), una proporción alta de MDSCs totales (High vs low: HR 2; $p=0,02$), mientras que, una alta expresión de IDO1 en MDSCs (High vs low: HR 0,52; $p=0,02$) y el desarrollo de toxicidad inmunomediada (sí vs no: HR 0,39; $p=0,009$) se asoció de forma independiente con una mayor mSG (**Tabla 22**).

Tabla 22. Resumen análisis multivariante conjunto del modelo de Cox para SG

Factor	Comparación	Hazard ratio	IC 95%	p valor
Tipo de respuesta	Respondedor vs No respondedor	4,70	2,36-9,34	<0,0001
Descriptor M1 previo a inmunoterapia	M0-M1a-M1b vs M1c	3,03	1,66-5,55	<0,0001
Expresión PD-L1	High vs low	2,79	1,50-5,20	0,001
ECOG	0-1 vs 2	2,62	1,03-6,63	0,042
MDSCs totales basales	High vs low	2,06	1,10-3,85	0,023
Expresión IDO1	High vs low	0,52	0,29-0,93	0,028
Toxicidad inmunorelacionada	Sí vs No	0,39	0,20-0,79	0,009
Expresión PD-L1	<50% vs ≥50%			0,184
Expresión NOTCH1	High vs low			0,460
Tiempo a la progresión desde inicio QT 1ª línea	≤3 meses vs >3 meses			0,708

5.7. Correlación entre genes de la vía Notch, PD-L1, ARG1 e IDO1 en MDSCs

En la **figura 40** se resumen los coeficientes de correlación r de Pearson con su nivel de significación (p-valor) entre los niveles de expresión de los diferentes genes de la vía Notch, PD-L1, ARG1 e IDO1 en MDSCs circulantes aisladas de los pacientes (n=100).

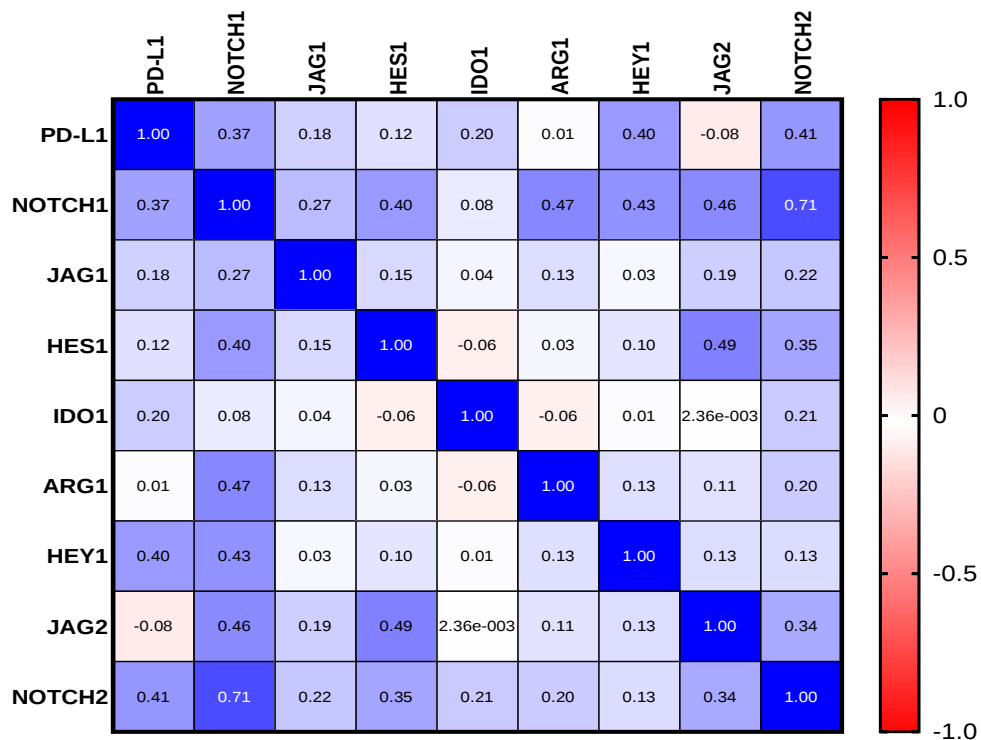


Figura 40. Correlación entre los niveles de expresión de genes vía Notch en MDSCs

6. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS VARIABLES GÉNICAS EN TEJIDO

Llevamos a cabo un análisis de transcriptómica en genes de la vía Notch, PD-L1, ARG1 e IDO1 en muestras de biopsias de tejido tumoral parafinado obtenidas previas al tratamiento con ICIs en un total de 25 pacientes con CPNMa.

6.1. Asociación entre expresión de genes en tejido y respuesta

Encontramos una correlación entre una alta expresión de JAG1, HES1 e IDO1 en tejido tumoral parafinado y ausencia de respuesta a inmunoterapia (Test Chi-cuadrado, JAG1: $p=0,01$; HES1: $p=0,02$; IDO1: $p=0,04$) (**Figura 41**). No encontramos diferencias en la expresión del resto de genes en biopsias tumorales entre el grupo de respondedores y el grupo de no respondedores a inmunoterapia (Test Chi-cuadrado, $p=NS$).

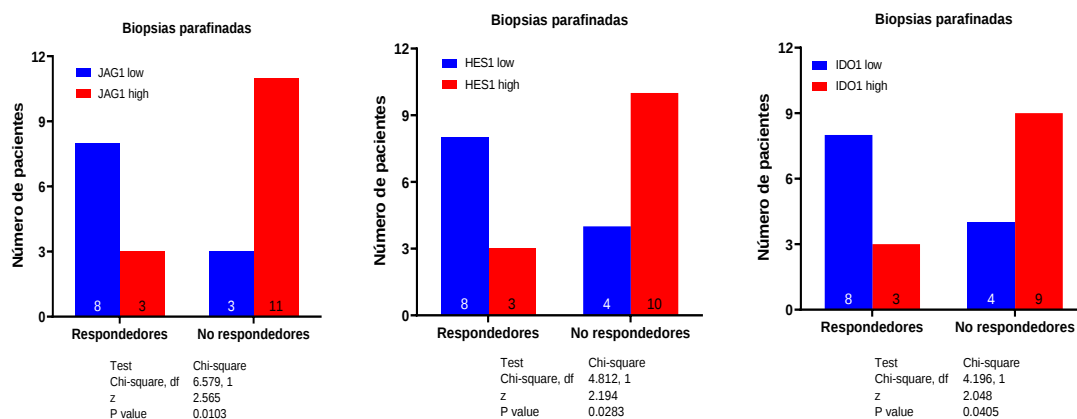


Figura 41. Correlación entre expresión de genes vía Notch e IDO1 en tejido y respuesta

V. DISCUSIÓN

1. ANÁLISIS DE POBLACIONES CELULARES CIRCULANTES

Durante las últimas dos décadas, la inmunoterapia en diferentes modalidades se ha incorporado en el arsenal terapéutico de los pacientes con CPNM alcanzando respuestas profundas y duraderas en algunos casos. Sin embargo, muchos pacientes presentan una resistencia, tanto primaria como adquirida, a estos tratamientos lo que limita enormemente su eficacia. Dadas las limitaciones de los principales biomarcadores predictivos de respuesta a terapia anti-PD1/PD-L1 de los que disponemos en la actualidad (expresión de PD-L1 y TMB), existe un gran interés en la investigación pre-clínica y clínica en identificar marcadores inmunológicos en sangre periférica. En este sentido, se han publicado diferentes trabajos que evalúan la capacidad predictiva de respuesta a ICIs en CPNMa de distintas poblaciones celulares inmunes circulantes, así como, diferentes ratios entre estas poblaciones, entre los que cabe destacar el RNL ⁽²⁵¹⁾. Las células inmunosupresoras, tales como las MDSCs y Treg, interfieren en múltiples puntos de la respuesta inmune antitumoral. De esta manera, la eficacia de diferentes estrategias de inmunoterapia basadas en células T, se correlaciona negativamente con una proporción elevada de MDSCs ^(252, 253). Los ICIs se diseñaron para promover la reactivación de células T anérgicas al interrumpir las interacciones entre receptores inhibidores específicos de estas células y sus ligandos; sin embargo, la diversa gama de funciones inmunosupresoras mediadas por las MDSCs puede impedir la capacidad de estos agentes para inducir un efecto antitumoral ⁽²⁵⁴⁾.

1.1. RNL como biomarcador pronóstico y predictivo a ICIs en CPNMa

La RNL constituye un marcador del grado de inflamación sistémica y su elevación se ha asociado de forma consistente con un pronóstico desfavorable en CPNM, sugiriendo que la **RNL** se podría utilizar como un **potencial biomarcador para predecir la respuesta al tratamiento con anti-PD1/PD-L1**, siendo particularmente ventajoso dada su disponibilidad y naturaleza no invasiva. Esta hipótesis ha sido puesta de manifiesto en un metanálisis de 24 estudios publicado por *Huang et al* ⁽²⁵⁵⁾, en el cual se ha mostrado que una RNL elevada previa al tratamiento con anti-PD1/PD-L1 fue predictor de menor SG (HR=2,17; p<0,001), SLP (HR=1,54; p<0,001) y TRO (HR=0,64; p=0,027) en CPNMa. Además, en un meta-análisis previo de 14 estudios en pacientes con CPNM publicado por *Gu et al* ⁽²⁵⁶⁾, una RNL elevada antes del tratamiento también mostró una peor SG y SLP (SG: HR 1,70; p <0,001 y SLP: HR 1,63; p <0,001). Estos resultados están en línea con los publicados en otros meta-análisis previos aunque con un tamaño muestral relativamente pequeño (≤ 10) y con los obtenidos en nuestro trabajo en el que una RNL elevada (≥ 4) se comportó como un factor pronóstico independiente para una peor SG en el análisis multivariante (HR 2,35; p=0,01).

No obstante, el **valor de la RNL como biomarcador pronóstico y predictivo** no está exento de críticas. En primer lugar, el punto de corte de la RNL varía ampliamente en los diferentes estudios, lo que limita su utilidad clínica ⁽²⁵⁷⁾. Aunque un valor elevado de RNL es claramente perjudicial, no sabemos cuál es el punto de corte óptimo para estimar el pronóstico en los pacientes tratados con ICIs. Además, la RNL es un marcador dinámico que varía a lo largo del tiempo durante el tratamiento de un paciente. Si bien en este trabajo sólo hemos analizado la utilidad pronóstica de los valores basales de RNL, otros estudios también han explorado el cambio en la RNL durante el tratamiento para evaluar tanto su valor pronóstico como predictivo ^(258, 259). Por tanto, todavía no se ha establecido de forma definitiva si una única determinación de RNL o varias a lo largo del tiempo es mejor para estimar el pronóstico en pacientes tratados con ICIs. En segundo lugar, la mayoría de los estudios evaluados fueron de diseño retrospectivo, lo que puede introducir un sesgo inevitable en la selección de pacientes y la recopilación de datos ⁽²⁶⁰⁾.

1.2. MDSCs como biomarcador pronóstico y predictivo a ICIs en CNMPa

Una de las poblaciones circulantes que más interés ha despertado en los últimos años en relación con la terapia anti-PD1/PD-L1 en tumores sólidos y, en particular, en el cáncer de pulmón, es la población de MDSCs. Cada vez hay mayor evidencia disponible del papel clave de las MDSCs en la resistencia al tratamiento con anticuerpos que intervienen en los puntos de control inmunológico. Nuestro estudio mostró que las PMN-MDSCs constituyen la subpoblación mayoritaria dentro de las MDSCs en comparación con M-MDSCs y e-MDSCs. Estos hallazgos están en línea con publicaciones previas en CPNM ⁽²⁶¹⁾.

1.2.1. MDSCs como biomarcador pronóstico

Diferentes estudios han evaluado el **papel pronóstico de las MDSCs circulantes en cáncer**. En nuestro estudio la mediana de MDSCs totales fue significativamente mayor en los pacientes con CPNM con respecto a los HD, tanto en la población M0 como M1. Numerosos estudios muestran que los pacientes con CPNM tienen unos niveles de MDSCs circulantes significativamente más altos respecto a pacientes sanos, y una frecuencia mayor de MDSCs se correlaciona con un estadio más avanzado del cáncer, con una mayor carga metastásica, y con una peor respuesta a la QT ⁽²⁶²⁻²⁶⁷⁾. También existe evidencia de que la monitorización de los niveles de MDSCs puede ser efectiva para evaluar la respuesta a la QT en pacientes con CPNM. En pacientes tratados con QT basada en platino, los niveles de M-MDSCs circulantes varían en función de la respuesta al tratamiento, con una mayor proporción en los pacientes que progresan en relación a aquellos pacientes que presentan RP o EE ⁽²⁶³⁾. Otros estudios han llegado a conclusiones similares y han encontrado que los niveles altos de M-MDSC son un factor pronóstico

independiente para una menor SLP y SG (SLP: HR 2.41; $p=0.002$ y OS: HR 2.35; $p=0.008$) en pacientes tratados con QT ^(265, 266). Por lo tanto, la proporción de MDSCs podría ser útil para detectar la progresión de aquellos pacientes con CPNM que reciben QT estándar. Recientemente se ha publicado un metanálisis de 14 estudios ($n=905$) en el que se analiza el impacto pronóstico de las MDSCs circulantes y sus subpoblaciones en pacientes con CPNMa ⁽²⁶⁸⁾. Unos niveles bajos de MDSCs totales se asociaron a una mejor SLP (HR 1,84) y SG (HR 1,78), mientras que, en el análisis de subpoblaciones de MDSCs, solo alcanzaron significación estadística en SLP y SG la población de M-MDSCs. De esta manera, los pacientes con CPNMa con unos niveles altos de M-MDSCs circulantes presentaron peor pronóstico que aquellos con niveles bajos tanto en términos de SLP como SG.

1.2.2. MDSCs como biomarcador predictivo de respuesta a ICIs en CPNMa

Los datos son mucho mas limitados en cuanto al **papel de las MDSCs circulantes como marcadores predictivos de respuesta a inmunoterapia**. Según la evidencia disponible en la literatura, parece que la **población total de MDSCs** no se asocia con la respuesta a la terapia anti-PD1/PD-L1 ni con la supervivencia en CPNM, tal y como se describe en nuestra serie. Sin embargo, nosotros sí que encontramos diferencias estadísticamente significativas en las mSG en función de los niveles basales totales de MDSCs *low vs high*. De hecho, en el análisis multivariante las MDSCs totales circulantes basales *high* fueron uno de factores que mantienen la significación estadística de forma independiente para una menor SG (HR 2,18; $p=0,015$). Hay 2 trabajos publicados en los que no se encuentra correlación entre la población total de MDSCs, respuesta y supervivencia. *Mazzaschi et al* ⁽²⁶⁹⁾ han publicado un estudio prospectivo con 31 pacientes con diagnóstico de CPNMa tratados con nivolumab en 2ª ó 3ª línea tras progresión a QT basada en platino. No encontraron diferencias en los niveles de linfocitos T, B, Treg y MDSCs totales basales entre el grupo de beneficio clínico y el grupo de no respondedores a nivolumab. Tampoco hubo diferencias en SLP ni SG en función de los niveles basales de linfocitos T, B y MDSCs. Sí que hubo diferencias significativas en SLP y SG en aquellos pacientes con niveles altos de NK basales (SLP $p=0,025$ y SG $p=0,014$) comparado con aquellos pacientes con niveles bajos, así como, en función de los niveles de linfocitos PD1-CD8+ altos o bajos ($p<0,01$). Otro estudio publicado por *Zhuo et al* ⁽²⁷⁰⁾ analiza los niveles de MDSCs totales circulantes en 10 pacientes con CPNMa tratados con atezolizumab en 2ª ó 3ª línea. No se encontró asociación entre los niveles basales de MDSCs totales y la respuesta al tratamiento con atezolizumab, SLP o SG.

Parece que las **subpoblaciones de MDSCs circulantes previas al inicio del tratamiento con anti-PD1/PD-L1** pueden tener mayor interés a la hora de predecir la respuesta y supervivencia a ICIs, aunque los resultados publicados en los estudios son contradictorios. En nuestra serie, no encontramos diferencias en los niveles de subpoblaciones de MDSCs basales (PMN-MDSCs, M-MDSCs y e-MDSCs) entre el grupo de respondedores y el grupo de no respondedores a inmunoterapia ni en el análisis de supervivencia, salvo en el caso de una proporción basal de PMN-MDSCs *high* ($\geq 3\%$) que se asoció con una menor mSG de forma estadísticamente significativa. Sin embargo, ninguna de las subpoblaciones mantuvo la significación estadística como factores independientes de SG en el análisis multivariante de Cox.

Se han publicado otros estudios con un menor número de pacientes incluidos en los que se analizan las **subpoblaciones de PMN y M-MDSCs** presentando, en la mayoría, resultados superponibles a los nuestros en el sentido que una proporción alta de estas poblaciones mieloides se asocia con una peor supervivencia tras el tratamiento con ICIs y viceversa ⁽²⁷¹⁻²⁷³⁾. Así, en el estudio *Koh et al* ⁽²⁷¹⁾ se analizaron las subpoblaciones de MDSCs pre-tratamiento en 83 pacientes con CPNMa tratados con inmunoterapia (nivolumab o pembrolizumab). El análisis mostró que unos niveles bajos de PMN-MDSC, M-MDSC y TAMs se asociaron con una mayor SLP y SG en comparación con unos niveles altos pre-tratamiento. Cuando realizaron un análisis combinado de las tres subpoblaciones inmunes supresoras, los pacientes que tenían una proporción baja de las tres subpoblaciones mostraron una mayor diferencia en SLP (6,7 meses vs 2 meses; $p=0,006$), SG (8,5 meses vs 4,2 meses; $p=0,004$) y tasa de respuesta (94,5% vs 50%) en comparación con pacientes con unos niveles elevados basales. Y en el mismo sentido, el aumento de la proporción de M-MDSCs durante el tratamiento con anti-PD1 se observó en pacientes no respondedores en otros dos estudios ^(274, 275). Sin embargo, también encontramos algunos trabajos en los que se observan resultados opuestos a los nuestros. *Passaro et al* ⁽²⁷⁶⁾ publicaron una serie de 53 pacientes con CPNMa tratados con Nivolumab en 2ª línea en la que analizan las subpoblaciones de MDSCs circulantes pre-tratamiento. En este estudio los niveles basales de PMN-MDSCs se asociaron con la respuesta al tratamiento, de tal manera que, unos niveles altos de PMN-MDSCs se asociaron con una mejor TRO ($p=0,02$). También encontraron una asociación estadísticamente significativa entre valores basales de PMN-MDSC altos, eosinófilos altos, RNL < 3 y neutrófilos bajos y una mayor SLP y SG. En el análisis multivariante las diferencias en SLP y SG se mantuvieron estadísticamente significativas tras ajustar por factores pronóstico en cuanto a las variables basales niveles altos/bajos de PMN-MDSCs. En una población similar de pacientes con CPNMa tratados con pembrolizumab o nivolumab, *Feng et al* ⁽²⁷⁷⁾ encontraron que los pacientes que experimentaban una RP a inmunoterapia tenían niveles basales más altos de M-MDSCs.

Otros estudios han investigado el **ratio de subpoblaciones de MDSCs con otras poblaciones inmunes circulantes (NK, Treg)** como marcadores predictivos de respuesta a inmunoterapia en CPNMa ^(278, 279). El grupo de *Kim et al* ⁽²⁷⁹⁾, publicaron un estudio prospectivo con 34 pacientes con CPNMa tratados con Nivolumab en 2ª línea. Analizaron las subpoblaciones de MDSCs y determinaron la expresión de Lox-1+ (Lecitin-type oxidized LDL receptor-1) en PMN-MDSCs para distinguir las PMN-MDSCs de los neutrófilos. No encontraron diferencias significativas en la proporción de Lox-1+ PMN-MDSCs y M-MDSCs entre los grupos de respondedores y no respondedores. Evaluaron también la ratio Treg/Lox1+ PMN-MDSCs entre respondedores y no respondedores tras el tratamiento con nivolumab. La ratio identificó mejor al grupo de respondedores y no respondedores que la proporción de Treg y MDSCs por sí solas, utilizando el punto de corte de 0,39 con una capacidad de sensibilidad y especificidad para predecir respuesta del 87,5% y 72,2%, respectivamente. Validaron los resultados en una cohorte de pacientes independiente y el VPP y VPN en la cohorte global (n=63) fue del 69,2% y 91,8%, respectivamente. Los pacientes con una ratio Treg/PMN-MDSCs >0,39 tuvieron una SLP mayor de forma significativa con respecto a los pacientes con ratio <0,39 (103 vs 35 días; p=0,007). No se describe en el artículo asociación entre la subpoblación de M-MDSCs y supervivencia.

Existen todavía menos datos publicados en relación al potencial **papel predictivo de respuesta a inmunoterapia de las e-MDSCs**. *Delaunay et al* ⁽²⁷³⁾ comunicaron un estudio prospectivo con 54 pacientes con CPNM tratados con nivolumab. Analizaron los niveles basales de 3 subpoblaciones de MDSCs y los correlacionaron con supervivencia. Unos niveles basales pre-nivolumab altos de M-MDSCs se asociaron a una peor SLP y SG. Sin embargo, los niveles basales de e-MDSCs y PMN-MDSCs no se asociaron con supervivencia. También se han comunicado datos sobre el papel predictor de respuesta a agentes anti-PD1/PD-L1 en CPNMa de otra población inmune en estadio temprano, los **neutrófilos inmaduros**. *Mezquita et al* ⁽²⁸⁰⁾ analizaron una serie de 58 pacientes con CPNMa tratados con ICIs y evaluaron la proporción de neutrófilos inmaduros circulantes (CD15+ CD244- CD16^{low}) pre-tratamiento. Una proporción de neutrófilos inmaduros circulantes >0,22% se asoció con una peor SLP (p=0,0004), SG (p=0,0007) y mayor tasa de muerte precoz antes de 12 semanas.

Uno de los **hallazgos más importantes en nuestro estudio** fue que niveles altos de MDSCs (HR 2,18; p=0,015) y NLR (HR 2,35; p=0,01) se comportaron como factores pronóstico independientes para SG en el análisis multivariante. Estos hallazgos enfatizan la necesidad de una mayor validación y exploración del papel de MDSCs circulantes en CPNMa como biomarcadores pronósticos y predictivos de respuesta a terapia anti-PD1/PD-L1.

1.3. Correlación entre RNL y MDSCs

Los **mecanismos por los cuales una RNL elevada se asocia con un pronóstico pobre** no se comprenden bien, sin embargo, las MDSCs podrían proporcionar una explicación para este fenómeno. Además de darnos una idea global de la inflamación asociada al tumor, es probable que la RNL sea también un marcador subrogado de la proporción y actividad de las MDSCs. El valor pronóstico de la RNL en los pacientes tratados con ICIs podría ser atribuido a la relación existente entre neutrófilos/linfocitos y MDSCs con la vía PD-1/PD-L1. Se han comunicado trabajos en los que se muestra que la expansión de neutrófilos circulantes se correlaciona con un aumento de la infiltración de neutrófilos intra-tumorales en pacientes con CPNM resecados. Este aumento de neutrófilos circulantes se asoció con un incremento en los niveles de citoquinas progranulopoyéticas (IL-1b, IL-17, TNFalfa, IL-6) circulantes y, a nivel del MAT, con una reducción de la infiltración de linfocitos T CD8+ intra-tumorales, así como, una menor expresión de genes de citotoxicidad mediada por célula T y de genes relacionados con IFN gamma ⁽²⁸¹⁾. Entre estas citoquinas, el G-CSF tumoral promueve un aumento de la mielopoyesis que conduce a neutrofilia ⁽²⁸²⁾ y a un aumento de MDSCs e induce la expresión de PD-L1 en ambas poblaciones celulares ⁽²⁸³⁾. Los neutrófilos activados y MDSCs podrían inhibir la proliferación y actividad citotóxica de las células T en el MAT a través de la interacción de PD-L1 de su superficie con los receptores PD-1 del linfocito T y, por lo tanto, limitando el número de linfocitos circulantes, favoreciendo la inmunoevasión y crecimiento tumoral y, finalmente, conduciendo a una menor supervivencia de los pacientes con cáncer. En conjunto, estos procesos elevan el numerador y reducen el denominador de la ratio para aumentar el valor de RNL. De esta manera, tanto un valor alto de la RNL como de MDSCs circulantes se correlacionarían con un mal pronóstico, tal como encontramos en el análisis multivariante para SG de nuestro trabajo (RNL ≤ 4 vs > 4 : HR 2,35; $p=0,01$ y MDSCs totales high vs low: HR 2,18; $p=0,015$).

En nuestro estudio investigamos la **correlación entre las subpoblaciones de MDSCs y la RNL**. Encontramos una asociación directa entre la RNL y las MDSC totales y PMN-MDSC basales circulantes. Los pacientes con una proporción baja de MDSCs totales tuvieron también valores bajos de RNL ($p=0,0007$) y RPL ($p=0,01$). Si combinamos estas variables (RNL y RPL) con la proporción de MDSCs totales mejoramos considerablemente la capacidad predictiva de supervivencia. Agrupando las tres variables podemos identificar a los pacientes con mayor probabilidad de presentar una supervivencia prolongada tras inmunoterapia, así, el 83% de los pacientes MDSCs, RNL y RPL bajos tuvieron una supervivencia superior a 2 años, mientras que, el 82% de los pacientes con niveles elevados de las 3 variables fallecieron en los 3 primeros meses ($p=0,003$).

Hasta el momento, pocos estudios han evaluado la **relación entre RNL y MDSCs circulantes en cáncer de pulmón**. En un estudio de 58 pacientes con CPNM sometidos a cirugía del tumor primario ⁽²⁶⁷⁾, los pacientes con cáncer presentaron recuentos de neutrófilos más altos ($p < 0,001$), menor cantidad de linfocitos T CD4+ *naive* ($p < 0,001$) y, por tanto, RNL más altas (3,1 frente a 1,95; $p < 0,001$), así como, frecuencias más altas de M-MDSCs ($p < 0,001$) comparados con el grupo control de voluntarios sanos. Aunque este estudio no evaluó la relación directa entre MDSCs y RNL, sí que observó una correlación positiva entre MDSCs y el recuento de neutrófilos ($r = 0,434$; $p < 0,001$) y una correlación negativa entre MDSCs y células T CD4+ *naive* ($r = -0,248$; $p = 0,01$). Además, una mayor frecuencia de M-MDSCs ($> 3\%$) se asoció con una menor SG (HR 8.3; $p = 0.046$), y el mismo comportamiento se observó con un menor número de células T CD4+ ($p = 0.037$) y CD8+ *naive* ($p = 0.041$). En línea con estos hallazgos, otros autores han observado recuentos absolutos de neutrófilos más bajos en pacientes con respuestas objetivas frente a aquellos pacientes con EE o PE ($p = 0,01$) y una correlación inversa entre MDSCs y linfocitos T CD8+ ($r^2 = -0,31$; $p = 0,03$) y CD4+ ($r^2 = -0,3$; $p = 0,006$) ^(265, 266, 287). En un trabajo publicado por *Sheng et al* ⁽²⁸⁸⁾, sí que se estudia específicamente la correlación entre las MDSCs circulantes y la RNL en una serie de 76 pacientes con carcinoma urotelial avanzado. Estos autores encuentran una asociación significativa inversa entre la ratio e-MDSC/PMN-MDSCs y la RNL ($\rho = -0,28$; $p = 0,02$) y una menor supervivencia en aquellos pacientes con niveles más altos de e-MDSCs en sangre (HR 3,78; $p = 0,002$) y una mayor RNL (HR 2,6; $p = 0,017$).

Por tanto, la **RNL podría ser un reflejo de la proporción de MDSCs circulantes y, específicamente de PMN-MDSCs** que constituyen la subpoblación mayoritaria de MDSCs en CPNMa (47% en nuestra serie). Una RNL elevada implicaría de una forma indirecta una mayor proporción de MDSCs circulantes que tendría un efecto crítico en la evasión del sistema de inmuno-vigilancia en el MAT implicando, por tanto, un peor pronóstico y respuesta a ICIs. Diferentes estudios han mostrado que una mayor carga tumoral se asocia con niveles más altos de PMN-MDSCs, una RNL mayor y una SG menor ⁽²⁸⁴⁻²⁸⁸⁾. En nuestro trabajo encontramos una mayor proporción de MDSCs totales y PMN-MDSCs entre los pacientes con una RNL elevada y también con una mayor carga tumoral (< 3 vs ≥ 3 localizaciones metastásicas).

1.4. Treg como biomarcador pronóstico y predictivo a ICIs en CPNMa

Las células Treg juegan un papel clave en la inmunosupresión en el MAT al promover la diferenciación, proliferación y secreción de factores inmunosupresores, de tal manera que, la **infiltración de células Treg intra-tumorales** se asocia, en diferentes tipos tumores, con un mal pronóstico. En CPNMa una alta proporción de células Treg *naïve* circulantes se ha asociado también a un peor pronóstico ⁽²⁸⁹⁾. Sin embargo, en otros tipos de cáncer una **alta proporción de células Treg circulantes o en el MAT** puede tener un significado opuesto. Se han comunicado resultados en este sentido, así, *Lukesova et al* ⁽²⁹⁰⁾ demostraron que una alta proporción de células Treg podría utilizarse como un marcador pronóstico favorable en pacientes con carcinomas escamosos de cavidad oral y orofaringe HPV positivos, y *Correale et al* ⁽²⁹¹⁾ obtuvieron resultados similares en pacientes con cáncer de colon avanzado sometidos a QT y QT-IO. Además, las Treg que infiltraban el tumor se asociaron con respuestas inmunitarias citotóxicas y una supervivencia prolongada en pacientes con cáncer de mama RE negativo ⁽²⁹²⁾. Por tanto, mientras que las células Treg se consideran predominantemente mediadores de la inmunosupresión, ejercen efectos tanto negativos como positivos sobre el sistema inmunológico ^(293, 294).

Si nos centramos en el **efecto de la terapia con ICIs en las Tregs circulantes en pacientes con CPNM** los datos son controvertidos. Encontramos estudios, en los que la **proporción de células Treg aumenta en pacientes en progresión de la enfermedad**. De esta manera, en pacientes con CPNM tratados con ICIs, la proporción de Tregs previa al tratamiento fue mayor en pacientes no respondedores a inmunoterapia, mientras que, el recuento de Treg circulantes, especialmente la subpoblación de Treg PD1+, disminuyó 1 semana tras el tratamiento con anti-PD1/PD-L1 sólo en los pacientes respondedores ^(295, 296). Sin embargo, en otros trabajos, unos **niveles elevados de células Treg se asociaron, de manera consistente, con una supervivencia prolongada**. En este sentido, *Kim et al* ⁽²⁷⁹⁾ encontraron que un aumento de ratio Treg/PMN-MDSC en sangre periférica a expensas de una proporción mayor de células Treg en pacientes con CPNM tratados con nivolumab se correlacionaba mejor con los resultados clínicos (respondedores vs no respondedores) y se asociaba con una mayor SLP de forma significativa. En otro trabajo, *Koh et al* ⁽²⁷¹⁾, mostraron que, una alta proporción de células Treg efectoras una semana después de la inmunoterapia (nivolumab o pembrolizumab) en 83 pacientes con CPNM avanzado se asoció a una SLP y SG prolongadas en comparación con pacientes con una frecuencia baja de células Treg. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo van en la misma línea, una proporción alta de células Treg circulantes basales se asoció con una tendencia, no estadísticamente significativa, a una mayor SLP y una mayor SG en el análisis univariante (HR 0,6; p=0,02), aunque no se mantuvo como variable pronóstica independiente en el análisis multivariante para SG (p=0,49).

Una **explicación de los resultados favorables asociados con niveles altos de células Treg** podría tener que ver con la función específica que tienen las células Treg para prevenir la autoinmunidad y atenuar una respuesta inmune sobre-activada potencialmente peligrosa después de reacciones inmunes prolongadas. La expansión de las células Treg depende estrictamente de los niveles de IL-2 producidos por linfocitos efectores activados por antígenos, ya sean células T CD4+ o CD8+ ^(297, 298). En base a estos hallazgos, se podría plantear la hipótesis de que la infiltración de células Treg en el MAT, así como un nivel elevado de células Treg circulantes, podrían ser un indicador indirecto de una respuesta inmune antitumoral potente para prevenir una reacción inmune inespecífica prolongada una vez que el sistema inmune está activado. De esta manera, las células Treg circulantes podrían proporcionar información dinámica del estado del MAT cuando no se dispone de una biopsia tumoral. Por lo tanto, los **niveles de las células Treg podrían usarse como biomarcadores no invasivos para predecir la respuesta de inmunoterapia anti-PD-1/PD-L1 en pacientes con CPNMa**.

1.5. IrAEs como factor predictivo de respuesta a ICIs en CPNMa

En nuestro estudio, encontramos que el **desarrollo de irAEs se asoció significativamente con un mejor resultado clínico en pacientes con CPNMa tratados con ICIs**. Los pacientes que experimentaron al menos un irAE tuvieron una SLP y SG significativamente más prolongada en comparación con el grupo sin irAEs (SLP: HR 0,33; $p < 0,0001$ y SG: HR 0,34; $p < 0,0001$). Es importante destacar que el desarrollo de irAEs se comportó como un factor independiente de SLP y SG en el análisis multivariable lo que indica que los irEAs relacionados con el tratamiento representan un predictor independiente de la eficacia de agentes anti-PD1/PD-L1. Nuestros resultados van en el mismo sentido que un metanálisis de 30 estudios que incluye a 4971 pacientes con diferentes tipos de neoplasias, fundamentalmente CPNM y melanoma, tratados con ICIs publicado por *Zhou et al* ⁽²⁹⁹⁾. Los pacientes con cáncer que desarrollaron irAEs experimentaron un aumento significativo de la SLP y SG en comparación con los pacientes que no desarrollaron irAEs (SLP: HR 0,52; $p < 0,001$ y SG: HR 0,54; $p < 0,001$). Los mecanismos subyacentes a la asociación entre los irAE y el impacto en supervivencia no se han dilucidado por completo. Sin embargo, los datos disponibles parecen sugerir un posible mimetismo molecular antigénico entre las células neoplásicas y los tejidos implicados en los irAEs. Estudios preclínicos han identificado múltiples epítomos que se comparten tanto en el melanoma como en los melanocitos normales ⁽³⁰⁰⁾. La liberación de antígenos compartidos mediante la terapia con ICIs podría dar lugar a la activación de una respuesta inmune secundaria a los antígenos del huésped, lo que ha sido respaldado por el hallazgo de clones de células T que se infiltraban en las lesiones asociadas a irAEs y los tumores que se superponía de forma significativa entre los pacientes tratados con ICIs con melanoma y CPNM ⁽³⁰¹⁾.

2. ANÁLISIS DE VARIABLES GÉNICAS EN MDSCs

Los ICIs han supuesto una auténtica revolución en el tratamiento del cáncer y, en particular, han cambiando el **escenario terapéutico del CPNMa**. La EMA ha aprobado hasta el momento 6 agentes **ICIs para su uso en el tratamiento del CPNMa en la práctica clínica** que incluyen anticuerpos monoclonales anti-CTLA4 (ipilimumab), anti-PD1 (pembrolizumab, nivolumab y cemiplimab) y anti-PD-L1 (atezolizumab y durvalumab), en monoterapia o como terapia combinada con QT. El principio básico de estas terapias es mejorar la función de los componentes del sistema inmune o neutralizar las señales inmunosupresoras producidas por las células tumorales o por otras células del MAT. Cuanto estas terapias funcionan logran alcanzar supervivencias prolongadas no vistas hasta ahora en pacientes con CPNMa ⁽³⁰²⁾. Sin embargo, estas respuestas duraderas sólo se observan en su subgrupo de pacientes y, con el tiempo, se pueden desarrollar resistencias adquiridas a los ICIs. Este fenómeno puede ser atribuido a la gran heterogeneidad del microambiente inmune entre individuos ^(303, 304). Por tanto, es fundamental conocer en profundidad los mecanismos que regulan el MAT para poder desarrollar estrategias que permitan optimizar los resultados de la terapia con ICIs en CPNMa.

La **señalización alterada de la vía Notch** está implicada en muchos aspectos de la biología tumoral, desde la angiogénesis hasta el mantenimiento de las CSCs y la inmunidad tumoral. El papel de Notch en el desarrollo y modulación de la respuesta inmune es complejo e involucra a una intrincada red de interacciones entre CPAs, subpoblaciones de células T, células tumorales y otros componentes del MAT. Hemos revisado numerosos trabajos que demuestran que las alteraciones (activación o inhibición) en la señalización de Notch de las células tumorales o de las células estromales influyen en las funciones efectoras de las células inmunitarias en el MAT, permitiendo la evasión de la respuesta inmune anti-tumoral y, por tanto, constituyendo una importante barrera para la eficacia de terapias basadas en ICIs ⁽³⁰⁵⁾. Globalmente los **principales hallazgos en la parte del análisis transcripcional de las MDSCs circulantes y del tejido tumoral** que hemos encontrado en nuestro trabajo se resumen en 4 apartados:

- 2.1. La expresión de ligandos de Notch Jagged en MDSCs circulantes y en el MAT predicen resistencia al tratamiento con ICIs en CPNMa.
- 2.2. La activación de la vía Notch en MDSCs circulantes y en el MAT predicen resistencia al tratamiento con ICIs y peor supervivencia.
- 2.3. La expresión de IDO1 en MDSCs circulantes y en el MAT se asocia con la respuesta y supervivencia a terapia basada en ICIs.
- 2.4. Posibles aplicaciones terapéuticas de la modulación de la vía Notch en inmunoterapia.

2.1. LA EXPRESIÓN DE LIGANDOS DE NOTCH JAGGED EN MDSCs CIRCULANTES Y EN EL MAT PREDICEN RESISTENCIA A INMUNOTERAPIA EN CPNMa

La principal hipótesis de esta tesis doctoral se basa en que la expresión diferencial de ligandos de Notch en MDSCs circulantes pone en marcha mecanismos de inmuno-evasión implicados en la resistencia a la terapia con ICIs en CPNMa. En el análisis de transcriptómica en la población de MDSCs circulantes, una alta expresión de JAG1 previa al tratamiento con ICIs se asoció con una menor SLP de forma significativa con respecto al grupo de baja expresión y, este efecto, se mantiene tras ajustar por variables clínicas pronóstico en un modelo de regresión multivariante (HR 1,72; $p=0,03$). Los pacientes que mantienen una alta expresión de JAG1 en MDSC tanto en el momento basal como en la primera evaluación de respuesta presentan una mSLP y mSG significativamente menor que aquellos con una baja expresión. Este efecto deletéreo de la expresión de Jag1 en MDSCs circulantes también podemos observarlo en el MAT. En la misma línea, el análisis de transcriptómica en tejido tumoral evidencia que una alta expresión de JAG1 basal se correlaciona con menor probabilidad de respuesta al tratamiento con ICIs ($p = 0,01$).

2.1.1. Expresión de Jagged1 en MAT y pronóstico

La **expresión de JAG1** se correlaciona con un **pronóstico desfavorable en múltiples tipos de cáncer** ⁽³⁰⁶⁻³¹²⁾. En el caso del CPNM disponemos de datos de **expresión de RNAm de JAG1 en muestras de adenocarcinoma** procedentes de la base de datos del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) y podemos observar una supervivencia claramente inferior en el grupo de alta expresión de JAG1 (*JAG1 high vs low*; $p=0,0009$). Además, la expresión de JAG1 en 517 muestras de adenocarcinoma de pulmón tiende a correlacionarse con la proporción de MDSCs en sangre (Rho Spearman = 0,1; $p=0,02$) ⁽³¹³⁾. Sin embargo, esta correlación entre la expresión de JAG1 en tejido y la proporción MDSCs circulantes no la encontramos en nuestro estudio ($n=14$; $p=NS$).

2.1.2. Expresión de JAG1 e inmuno-evasión en el MAT

La mayoría de la evidencia de la que disponemos hasta la fecha avala el **papel pro-oncogénico de la señalización canónica JAG1/NOTCH** mediante mecanismos que implican la **evasión del sistema inmune**. La **alta expresión de JAG1** estaría implicada en la acumulación y activación de MDSCs, la polarización de la respuesta inmune mediada por células T CD4+ hacia una respuesta tipo Th2/Treg, la polarización de los TAMs hacia fenotipo M2, promoción de angiogénesis tumoral mediada por activación de TANs y CAFs, la activación del proceso de TEM, invasión y diseminación metastásica, supervivencia de CTCs, mantenimiento de CSCs, así como, resistencia a inmunoterapia (**Figura 42**). En cuanto a los mecanismos de señalización mediada por JAG1 en células tumorales, parecen estar involucrados muchos factores y vías de señalización pro-oncogénicas, incluyendo citoquinas, vía Hippo, Wnt/ β -catenina y NF- κ B ⁽³¹⁴⁾.

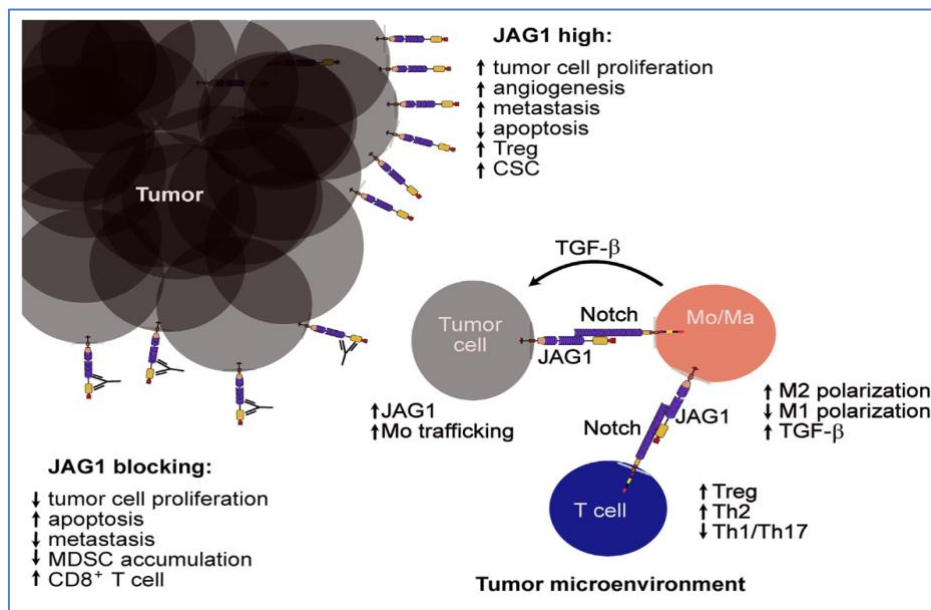


Figura 42. Implicación de Jag1 en mecanismos de inmuno-evasión en cáncer

Advances in Medical Sciences, 2022 (Adaptada de *Pancewicz et al*).

2.1.2.1. Acumulación y activación de MDSCs

Ya se ha comentado con anterioridad que la señalización a través de la vía Notch está suprimida en los linfocitos T CD8⁺ del MAT y esa inhibición parece estar mediada por la **expresión diferencial de ligandos de Notch en el estroma tumoral**. Podemos destacar en este sentido, el **papel de las MDSCs en la generación de un microambiente inmunosupresor** mediante la alta expresión de ligandos Jagged-1 y 2 ⁽¹⁶⁹⁾. Existe **evidencia pre-clínica del papel del ligando de Notch JAG1 en la generación de MDSCs en la médula ósea**, bloqueando la diferenciación de HSCs e induciendo la acumulación de células mieloides inmaduras ⁽¹⁶²⁾. **A nivel del MAT, la expresión de JAG1 y 2** fue mayor en tumores subcutáneos implantados en ratones comparada con las células tumorales cultivadas, a expensas fundamentalmente de las 2 poblaciones celulares mayoritariamente aisladas (células tumorales y MDSCs) en un modelo de carcinoma de pulmón. Además, las MDSCs que infiltran el tumor sobreexpresan ligandos JAG1 en mayor medida que las MDSCs periféricas circulantes aisladas del bazo. Este fenómeno parece estar mediado por una expresión nuclear aumentada de NF-kB-p65 en MDSCs del MAT con respecto a las MDSCs circulantes. NF-kB-p65 actúa como un factor de transcripción que regula la expresión de Jagged al unirse a su región promotora ⁽¹⁶⁹⁾. Los investigadores observaron una importante actividad terapéutica *in vivo* al utilizar anticuerpos anti-Jagged 1/2 en varios modelos tumorales de ratón, entre ellos, el modelo 3LL

de carcinoma de pulmón, al aumentar la infiltración de linfocitos T CD8+ intra-tumorales, inducir muerte celular inmunogénica y retrasar el crecimiento tumoral. Observaron que el bloqueo de Jagged reprogramó a las MDSCs hacia un fenotipo menos inmunosupresor que presentaban una menor capacidad de bloquear la proliferación de células T, así como, una menor expresión de marcadores inmunosupresores de MDSCs (iNOS y Arg1) comparado con las MDSCs de controles ⁽¹⁷⁰⁾.

2.1.2.2. Polarización de la respuesta inmune hacia fenotipo Th2/Treg

En este sentido, de nuevo, la **expresión diferencial de los ligandos de Notch** puede ser clave en la **homeostasis de la población de Treg en el MAT**. Durante la activación de la célula T, el tipo de ligando de Notch presentado en la superficie de las CDs puede determinar la diferenciación y polarización de la célula T CD4+. De esta manera, las CDs con alta expresión de ligandos JAG2 y baja expresión de ligandos DLL1 y 4 promueven el desarrollo de respuestas inmunes de tipo Th2 o Th17, mientras que, aquellas con una alta expresión de ligandos JAG1 pueden inducir la polarización de las células T CD4+ hacia un fenotipo T regulador ⁽²⁰³⁾. Esta hipótesis se pone de manifiesto en varios trabajos pre-clínicos en los que la expresión de ligandos tipo Jagged en células del microambiente, tales como CPAs, HSCs, células *stem* mesenquimales del estroma o MDSCs, pueden determinar una activación de la señalización de la vía Notch y conducir a una acumulación y activación de Treg a partir de células T CD4+ *naive* o expandiendo células Treg pre-existentes ⁽²⁰⁴⁻²⁰⁸⁾. De esta manera, el bloqueo farmacológico del ligando JAG1 inhibió el crecimiento tumoral y se acompañó de una reducción de la infiltración de Treg y MDSCs en el MAT ⁽²⁰⁹⁾. Estos datos identifican a la señalización de JAG1 como un factor clave en la inmunosupresión mediada por Treg y MDSCs.

2.1.2.3. Polarización de TAMs hacia fenotipo M2

En este sentido tenemos varios trabajos en diferentes tumores sólidos en los que la **expresión de JAG1 en el estroma tumoral** estaría asociada con una **mayor infiltración tumoral de TAMs con fenotipo M2**. En estos trabajos la expresión de JAG1 medida por RNAm o IHQ se correlaciona con tumores de mayor tamaño e índice proliferativo, así como, con una mayor infiltración de TAMs tipo M2 y peor pronóstico ⁽¹⁷⁶⁻¹⁸²⁾.

2.1.2.4. Promoción de angiogénesis tumoral mediada por CAFs y TANs

La **expresión de ligandos Jagged en el MAT tiene un rol pro-angiogénico**. Tenemos evidencia de estudios pre-clínicos en cáncer de pulmón, entre otros, de que la sobre-expresión de JAG1 en células tumorales o en el endotelio promueve la formación de una red vascular aberrante que favorece la infiltración de células tumorales y pro-tumorales como TANs tipo N2 ^(210, 216, 219). En este sentido parecen jugar un papel clave en la promoción de la angiogénesis tumoral dos poblaciones celulares del estroma: CAFs y TANs. La interacción célula-célula entre CAFs y células tumorales, mediado por la señalización JAG1/NOTCH2, indujo la formación de vasos aberrantes en un modelo de cáncer de pulmón ⁽²¹⁰⁾, mientras que, la expresión de JAG2 en TANs, mediada por IL-8, se asoció a disfunción de células T CD8+ y peor pronóstico en un modelo de cáncer de ovario ⁽²¹⁶⁾. En las células tumorales de carcinoma escamoso de cabeza y cuello la expresión de JAG1 estimula a las células endoteliales, promoviendo la angiogénesis y el crecimiento tumoral ⁽²¹⁹⁾.

2.1.2.5. Transición epitelio-mesénquima y desarrollo de metástasis

Varios estudios pre-clínicos demuestran el papel que puede tener la **expresión de ligandos Jagged en la activación del proceso de TEM en la célula tumoral**. La expresión de ligandos JAG1 y la activación de NOTCH1 es responsable de la TEM en modelos de cáncer de mama. Este proceso, parece estar dirigido por uno de los genes diana de Notch, SLUG, que actuaría como un represor transcripcional de E-cadherina y conduciría a la activación de b-catenina ⁽²²²⁾. La implicación de JAG1 en el proceso de TEM se ha descrito también en otros tumores sólidos como cáncer de cérvix ⁽²²³⁾, hepatocarcinoma ⁽²²⁴⁾ y cáncer de páncreas ⁽²²⁵⁾. **JAG1 también está implicado en la capacidad de migración y metástasis de la célula tumoral**. De esta manera, JAG1 puede incrementar la capacidad migratoria e invasividad de la célula tumoral mediante la inducción de uroquinasa activadora de plasminógeno (uPA), un marcador de recaída y metástasis en cáncer ⁽²²⁶⁾. Además, la expresión de JAG1 estaría implicada en la especificidad de tejido en la diseminación del cáncer de mama, teniendo un papel importante en el desarrollo de metástasis en cerebro y hueso ^(227, 228). En otros tumores sólidos, como cáncer de próstata y colon, la alta expresión de JAG1 también se ha asociado con migración celular y desarrollo de metástasis ^(229, 230).

2.1.2.6. *Expresión de JAG1 en MDSCs circulantes y supervivencia de CTCs*

La **expresión de JAG1 se correlacionó con mayor riesgo de recaída metastásica** en un estudio en el que se analizó su expresión por IHQ en muestras tumorales de cáncer de mama. Además, en este trabajo, se obtuvieron muestras de sangre periférica de pacientes metastásicas y se aislaron las CTCs. Más del 85% de las CTCs expresaban JAG1 y se asociaron a una SLP más corta ⁽¹⁷⁶⁾, lo que sugiere de nuevo la implicación de Notch en la capacidad metastásica y supervivencia de las CTCs. Disponemos de más evidencia de que la **expresión de ligandos Jagged en MDSCs circulantes puede promover la supervivencia de las CTCs**. Las MDSCs circulantes pueden interactuar directamente con las CTCs y promover su supervivencia y potencial metastásico a través de la interacción Jagged1-Notch1 en los clusters CTCs/PMN-MDSCs aislados de muestras de sangre periférica de pacientes con melanoma y cáncer de mama. Los estudios de co-cultivo *in vitro* demostraron una producción aumentada de ROS y una alta expresión de JAG1 en las MDSCs de los clusters que condicionaba la sobre-expresión del receptor NOTCH1 en CTCs. La expresión de JAG1 en PMN-MDSCs contribuye a la activación de Notch en CTCs, y a su vez, las CTCs promueven las funciones pro-tumorales de las MDSCs. De tal forma que, la inhibición de la producción de ROS bloqueaba las interacciones CTC/MDSCs y conducía a una reducción de la proliferación y supervivencia de las CTCs ⁽¹⁷¹⁾.

2.1.2.7. *Mantenimiento de CSCs*

La **expresión de JAG1 es un importante inductor del fenotipo “stem cell”** en diferentes tipos de cáncer. Específicamente en cáncer de mama, una alta expresión de JAG1 promocionó la auto-renovación de las CSCs y la formación de mamíferas *in vitro* ⁽³¹⁵⁾. En la misma línea, se han confirmado estos hallazgos en un modelo de ratón con delección de Lfng, una N-acetilglucosamina transferasa que previene la activación de Notch por ligandos Jagged. Una alta actividad de JAG1 en células tumorales aumentó la proliferación de CSCs ⁽³¹⁶⁾. La expresión de JAG1 está implicada en el mantenimiento de CSCs también en otros tipos tumorales ^(317, 318).

2.1.3. *Expresión de JAG1 en células tumorales y resistencia a antineoplásicos*

Quimioterapia

JAG1 está implicado en la regulación de la muerte celular y hay varios estudios que indican que este ligando de Notch ejerce funciones anti-apoptóticas. De esta manera, JAG1 puede prevenir tanto la apoptosis espontánea, en cáncer de próstata ⁽³¹⁹⁾, como la muerte celular inducida por la QT, como se ha mostrado en modelos de linfoma tratados con doxorrubicina ⁽³²⁰⁾, de cáncer de ovario tratados con taxanos ⁽³²¹⁾ y de cáncer de páncreas tratados con gemcitabina ⁽²²⁵⁾.

Inmunoterapia basada en ICIs

En este sentido, tenemos **evidencia pre-clínica** de la asociación entre la **expresión de ligandos JAG1 en CDs y la expresión de PD-1 en células T memoria efectoras que mediaría una inhibición de la respuesta anti-tumoral** previniendo las respuestas duraderas de células T. Esto se ha puesto de manifiesto en modelos murinos, en los que se co-cultivaron CDs y células T *in vitro*, y se observó que el bloqueo de JAG1 condujo a una disminución de la frecuencia de células T memoria que, además, presentaban una disminución significativa de la expresión de PD-1 ⁽³²³⁾.

A **nivel clínico**, también existe evidencia que la **expresión de JAG1 se puede comportar como un marcador de resistencia a inmunoterapia basada en ICIs**. *He et al* ⁽³²²⁾, analizaron un panel de 36 genes relacionados con angiogénesis en pacientes con adenocarcinoma de pulmón de la base de datos del TCGA identificando 2 subgrupos angiogénicos con pronóstico diferente (AGS1 y AGS2, del inglés *Angiogenesis-associated subtypes*). El subgrupo AGS2 se asoció a un peor pronóstico. Analizaron diferentes firmas de genes relacionados con la inmunidad y encontraron que el subgrupo AGS2 presentaba un fenotipo inmune “frío” con menor activación de linfocitos T CD8+, mayor respuesta inmunosupresora mediada por TGF- β y mayor expresión de genes relacionados con MDSCs. Posteriormente, realizaron un análisis de regresión multivariante con los 11 genes que se expresaban diferencialmente entre los dos grupos y encontraron que el gen que tenía más impacto en el pronóstico era JAG1 (HR 1,20, $p=0,02$). La expresión alta de JAG1 se asoció a una peor supervivencia y se correlacionó negativamente con el grado de infiltración inmune y positivamente con la vía de TGF- β y con marcadores de TEM. Finalmente, realizaron un análisis utilizando el transcriptoma celular del atlas de adenocarcinoma de pulmón de GSE131907. Encontraron que las células JAG+ se distribuían principalmente en células epiteliales, endotelio, fibroblastos y células mieloides y presentaban un enriquecimiento de células Treg en el subgrupo JAG+. Estos autores exploraron también el papel de JAG1 en tejido como biomarcador predictivo de respuesta al tratamiento con inmunoterapia. Utilizaron 2 bases de datos de pacientes tratados con anti-PD1/PD-L1 en monoterapia y compararon el nivel de expresión de JAG1 entre pacientes sensibles y resistentes al tratamiento. Los pacientes con alta expresión de JAG1 se asociaron con resistencia al tratamiento con anti-PD1/PD-L1 y, además, se correlacionaron con una expresión alta de PD-L1 y CTLA-4. Estos resultados indicarían que los pacientes con alta expresión de JAG1 presentan un fenotipo inmunosupresor en el MAT que implica resistencia a inmunoterapia. Estos hallazgos están en línea a lo observado en nuestro trabajo de investigación donde el análisis de transcriptómica en tejido parafinado evidencia que una **alta expresión de JAG1 basal se correlaciona con menor probabilidad de respuesta al tratamiento con ICIs** de forma significativa (respondedores vs no respondedores; $p=0,01$). Sin embargo, nosotros no encontramos una correlación significativa entre la expresión alta de JAG1 y

una expresión alta de moléculas de control inmune negativas como PD-L1 en MDSCs circulantes. Hay que tener en cuenta que la expresión de todas estas moléculas se puede modificar de forma significativa cuando las MDSCs se activan en el MAT, tal y como describe *Sierra et al* ⁽¹⁶⁹⁾ en su trabajo, en el cual las MDSCs que infiltran el tumor sobre-expresan ligandos JAG1 en mayor medida que las MDSCs periféricas circulantes. Tampoco encontramos correlación entre una expresión elevada de JAG1 en tejido tumoral y una proporción alta de MDSCs y Treg circulantes aunque, en este caso, el número de pacientes con datos disponibles fue muy pequeño (n=14) y probablemente insuficiente para detectar diferencias significativas.

2.2. LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA NOTCH EN MDSCs CIRCULANTES Y EN EL MAT PREDICEN RESISTENCIA AL TRATAMIENTO CON ICIs Y PEOR SUPERVIVENCIA

En nuestro trabajo encontramos una **correlación entre la expresión de NOTCH1 y de HES1 en MDSCs circulantes**. Esta activación de la señalización de la vía Notch en MDSCs circulantes mediada por una **alta expresión de NOTCH1 y HES1 se asocia con peores resultados en supervivencia tras el tratamiento con ICIs**. De esta manera, una alta expresión de NOTCH1 se asocia a una peor SG ($p=0,046$), mientras que, una alta expresión de Hes1 se asocia a una peor SLP ($p=0,004$). Cuando agrupamos a los pacientes con **activación de la señalización Notch con alta expresión de NOTCH1 y HES1** (*NOTCH1 high/HES1 high*) en MDSCs encontramos diferencias tanto en SLP como SG con respecto al grupo de baja expresión. No encontramos diferencias entre la expresión de NOTCH1 y HES1 en MDSCs circulantes entre el grupo de respondedores y no respondedores, pero, en el análisis de transcriptómica en tejido paraafinado, una **alta expresión de HES1 basal se correlaciona con menor probabilidad de respuesta al tratamiento con ICIs** de forma significativa ($p=0,02$). Tampoco encontramos correlación entre una expresión elevada de HES1 en tejido tumoral y una proporción alta de MDSCs y Treg circulantes.

2.2.1. La activación de la señalización Notch en MDSCs en cáncer se asocia a un fenotipo M-MDSCs con mayor capacidad de inmunosupresión

En el contexto tumoral existen trabajos que demuestran que la **inhibición de la señalización de Notch en HSCs, MDSCs y CDs está directamente implicada en la diferenciación anormal de las células mieloides**. *Cheng et al* ⁽¹⁵⁵⁾ evaluaron el papel de la señalización de la vía Notch en la diferenciación de las células mieloides en cáncer en un modelo murino. Observaron que la expresión de genes diana de Notch (*HES1* y *HES5*) estaba reducida significativamente en las poblaciones celulares mieloides comparada con los controles no tumorales. La expresión de HES1 en las PMN-MDSCs obtenidas de sangre de pacientes con cáncer renal fue significativamente más baja que la procedente

de donantes sanos. Este efecto parece estar mediado por una fosforilación del DICN, dependiente de una serin/treonina quinasa CK2, que conlleva a una alteración en la interacción del DICN y su represor transcripcional CSL, impidiendo la transcripción de sus genes diana ⁽¹⁵⁵⁾. El grupo de *Wang et al* ⁽¹⁵⁸⁾ también confirmó en un modelo tumoral murino que la señalización de Notch está inhibida en las MDSCs. Aislaron MDSCs periféricas de los bazo de ratones y encontraron que tanto la expresión de receptores, ligandos y genes diana (HES1 y 5 y HEY1 y 2) de la vía Notch estaba suprimida de forma significativa en este modelo tumoral. Además, también observaron que si se modulaba la señalización a través de la vía Notch se podía influir en el proceso de diferenciación y en la capacidad inmunosupresora de las MDSCs. De esta forma, bloquearon la señalización a través de la vía Notch en HSCs de la médula ósea *in vitro* y en un modelo tumoral murino *in vivo*. Observaron una reducción en la proporción de M-MDSCs a expensas de una mayor proliferación, expansión y acumulación de PMN-MDSCs en órganos linfoides y MAT, las cuales presentaron una menor capacidad inmunosupresora sobre las células T que se traducía además en un menor crecimiento tumoral en comparación con los controles con MDSCs sin supresión de la señalización de Notch. Estos investigadores también observaron que la señalización a través de la vía Notch juega un papel clave en destino de las MDSCs hacia una diferenciación monocítica o polimorfonuclear MDSC. Analizaron la expresión de genes diana de Notch (HES/HEY) en las dos subpoblaciones de MDSCs y encontraron que los niveles de expresión de estos genes fueron mucho mayores en M-MDSCs que en PMN-MDSCs. Además, testaron la capacidad inmunosupresora de ambas poblaciones observando que las M-MDSCs ejercían una inhibición más potente sobre la proliferación de células T y una mayor supresión de marcadores de activación de células T con respecto a las PMN-MDSC. Por último, utilizaron un modelo *in vitro* de activación de Notch a través de células OP9-DLL1 en médula ósea que produjo un importante incremento de M-MDSCs en detrimento de la población de PMN-MDSCs. Parece que la vía de Notch puede regular la diferenciación y capacidad inmunosupresora de las MDSCs a través de la modulación de la vía IL-6-STAT3.

Por tanto, la **señalización de la vía Notch parece estar inhibida en las MDSCs en pacientes con cáncer** si los comparamos con controles sanos. Nosotros no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de expresión de genes de la vía Notch en MDSCs circulantes en los pacientes con CPNMa con respecto a los HD, probablemente por el número limitado de donantes sanos de nuestra serie (n=14). La **modulación de la señalización de Notch en modelos murinos determina la diferenciación hacia un fenotipo PMN-MDSCs vs M-MDSCs**, así como, la capacidad de las MDSCs de inhibir la proliferación y activación de los linfocitos T. De tal manera que, la **activación de la señalización de la vía favorecería la diferenciación hacia M-MDSCs con mayor capacidad inmunosupresora**, mientras que, la **inhibición promovería la diferenciación hacia un fenotipo PMN-MDSCs con menor capacidad inmunosupresora**.

Esto podría explicar los resultados de nuestro trabajo en los que los pacientes con una activación de la vía Notch mediada por una alta expresión de NOTCH1 y HES1 presentan una menor SLP y SG tras el tratamiento con ICIs, lo que podría ser un reflejo del reclutamiento tanto en órganos linfoides como en el MAT de MDSCs con una mayor capacidad de inducir inmunosupresión a las células T y resistencia al tratamiento basado en ICIs.

2.2.2. La activación de la señalización Notch en el MAT se asocia a infiltración de células inmunosupresoras y progresión tumoral

En el contexto tumoral, tenemos evidencia de varios estudios pre-clínicos y clínicos que demuestra que una **activación de la señalización de Notch en el MAT modula positivamente el número y función de poblaciones celulares inmunosupresoras como MDSCs, Treg y TAMs** tanto en el MAT como en sangre periférica, conllevando a progresión tumoral y peor pronóstico. *Yang et al* ⁽³²⁴⁾, en un modelo murino de melanoma metastásico, demostró que la sobreexpresión de NOTCH1 en células tumorales aceleró la progresión del tumor y promovió la inmunosupresión tumoral mediante la regulación positiva de TGF- β 1. Específicamente, forzó una alta expresión de NOTCH1 en las células tumorales que disminuyó la infiltración de células T CD8+ y células NK, así como, la liberación de IFN- γ en el MAT, al tiempo que aumentó la infiltración de células Treg y MDSC *in vivo*. También observó que tras la activación de la vía Notch, la expresión de PD-1 en células T CD4+ y CD8+ se reguló positivamente, induciendo el agotamiento de las células T. *Mao et al* ⁽³²⁵⁾ utilizaron un modelo murino de carcinoma escamoso de cabeza y cuello para modular la señalización de Notch y evaluar su efecto en las poblaciones inmunes circulantes y en el MAT a través de su análisis por citometría de flujo. Este modelo presentaba una activación constitutiva de NOTCH1-HES1. La inhibición de la vía Notch usando un iGS redujo las poblaciones de MDSCs, TAMs y Treg en el bazo, ganglios linfáticos y MAT, así como, disminuyó la expresión de moléculas de los puntos de control inmune (PD-1, CTLA-4, TIM-3 y LAG-3) en linfocitos T circulantes y del MAT. En la misma línea, *Jaiswal et al* ⁽³²⁶⁾, utilizaron un modelo de cáncer de mama triple negativo con pérdida de función de la peptidasa específica de ubiquitina ligada a 9x (USP9x) en células tumorales para inhibir la señalización del DICN. La inhibición de la vía Notch disminuyó la producción de citoquinas pro-tumorales y la infiltración de Treg y TAMs en el MAT. El bloqueo de la vía Notch tuvo como consecuencia una promoción de la respuesta inmune antitumoral mediante el aumento de la infiltración de células T CD8+, suprimiendo el crecimiento de células tumorales *in vivo*. Además de los tumores sólidos, la expresión anormal de la señalización de Notch en células tumorales de neoplasias hematológicas también puede determinar la infiltración de células inmunes, como vemos en modelos de linfoma difuso de célula grande B, en los que la activación de la señalización de Notch aceleró la progresión tumoral mediante el reclutamiento de células Treg y TAMs tipo M2 ⁽³²⁷⁾. También disponemos de **estudios clínicos** que avalan esta hipótesis. Así, en otro estudio con 18 muestras de sangre periférica y tejido de pacientes con neoplasias pancreáticas

mucinosas se puso de manifiesto que el aumento de las células Treg circulantes se correlacionaba con una expresión elevada por IHQ de NOTCH1 y 2 en tejido ⁽³²⁸⁾. En pacientes con cáncer gástrico, tanto el tejido tumoral como la sangre periférica mostraron una expresión significativamente mayor del ARNm del receptor NOTCH1 y 2 que el tejido gástrico humano normal, y también tenían proporciones más altas de células Treg y células Th17 ⁽³²⁹⁾. Otro grupo también encontró que la expresión alta del receptor NOTCH3 era un factor de mal pronóstico en pacientes con cáncer gástrico y se asoció con una menor infiltración de células T CD8+ activadas y una mayor infiltración de células inmunosupresoras (células Treg y TAMs M2) ⁽³³⁰⁾.

Sin embargo, también disponemos de trabajos en los que la **inhibición de la señalización de Notch en el MAT se asocia a un peor pronóstico**. *Parmigiani et al* ⁽³³¹⁾, observaron en un modelo de glioma que las células tumorales escapan a la vigilancia inmune y aumentan la invasividad al reducir la señalización de Notch. Específicamente, la pérdida de la señalización de Notch suprimió la expresión del CMH tipo I y citoquinas como CXCL9 e IL-15 que redujo el reclutamiento de células T CD8+, al tiempo que promovió la infiltración de microglía y TAMs pro-tumorales. A nivel clínico, en otro trabajo publicado por *Ortiz-Martínez et al* ⁽³³²⁾ se analizaron muestras de carcinoma de mama en cuanto a la expresión de genes de la vía Notch y de Foxp3. Se encontró que unos niveles disminuidos de RNAm de NOTCH1 se asociaban a una mayor infiltración de Treg tumorales, tumores con fenotipo basal-like y a una peor supervivencia en el análisis multivariante. Un estudio de *Zhao et al* ⁽³³³⁾ demostró que la activación de la señalización de Notch en células mieloides murinas inhibía significativamente la progresión tumoral.

Parece por tanto, que la **activación de la señalización de la vía Notch mediada por la expresión de receptores de Notch o sus genes diana está asociada a un microambiente más inmunosupresor secundario a un mayor reclutamiento y activación de poblaciones celulares inmunosupresoras como MDSCs, Treg y TAMs**, así como, una **mayor expresión de moléculas inhibitorias de los puntos de control inmune**. Esta activación de la vía Notch en el MAT favorecería la progresión tumoral y conllevaría, por tanto, una **mayor resistencia a terapia basada en ICIs**. Nuestros resultados ponen de manifiesto esta hipótesis dado que encontramos una correlación significativa entre el grupo de no respondedores a inmunoterapia y una alta expresión de HES1 en tejido tumoral previo al tratamiento ($p=0.02$). Además, también encontramos una correlación entre la alta expresión tanto de genes de receptores (NOTCH1: Pearson 0,36; $p<0,0001$ y NOTCH2: Pearson 0,4; $p<0,0001$, respectivamente) como de genes diana de la vía Notch (HEY: Pearson 0,4; $p<0,0001$) y la expresión de moléculas inhibitorias como PD-L1 en las MDSCs circulantes. Sin embargo, no encontramos una clara correlación entre una alta expresión de NOTCH1 o HES1 en tejido tumoral y una mayor proporción de MDSCs o Treg en sangre periférica aunque el tamaño muestral en este caso fue muy pequeño ($n=14$) para poder encontrar diferencias significativas.

En conjunto, estos estudios resaltan las funciones complejas de la señalización de Notch que, como vemos, tiene un **papel pleiotrópico en la regulación de las respuestas inmunitarias**, ya que la señalización de Notch puede modular las funciones de las células inmunitarias anti-tumorales o pro-tumorales. Probablemente, en función del contexto del MAT, la señalización de Notch puede desempeñar diferentes funciones en la inmunidad tumoral mediada por MDSCs. Así, tenemos modelos en los que la activación de la señalización promueve la inmunosupresión mediada por MDSCs y facilita la progresión tumoral y, en otros modelos, la activación de la señalización de Notch en las células mieloides promueve la diferenciación de MDSCs en TAMs tipo M1 y, por lo tanto, inhibe la progresión del tumor. Por su parte, en las células T, la activación de la señalización de Notch mejora su capacidad antitumoral, pero la señalización de Notch también puede promover el agotamiento de las células T al regular positivamente la expresión de PD-1.

2.2.3. La activación de la vía Notch en MAT y respuesta a ICIs en cáncer

Dado su papel clave en la inmunidad anti-tumoral, se ha evaluado la **señalización a través de la vía Notch en el MAT y la respuesta a la inmunoterapia basada en ICIs en cáncer** tanto en estudios pre-clínicos como clínicos. En el momento de esta revisión no hemos encontrado evidencia del papel de la activación de la vía Notch en MDSCs circulantes y la respuesta a ICIs en CPNMa.

Tenemos **evidencia pre-clínica que apunta a la activación de la vía Notch en el MAT como un mecanismo de resistencia a terapia basada en ICIs**, así como, que la **inhibición de la señalización se asociaría a una mejor respuesta al tratamiento**. En un modelo murino de resistencia adquirida a ICIs en cáncer de colon, *Bernardo et al* ⁽³³⁴⁾ realizaron un análisis de expresión génica para estudiar los mecanismos de resistencia. Los tumores resistentes a anti-PD-1 presentaron una expresión reducida de genes relacionados con la respuesta inmune, así como, una menor infiltración de células inmunes (células T y NK). Encontraron una activación de TGF- β y de la señalización de la vía Notch en los tumores resistentes que se asoció a una peor supervivencia. En un ámbito clínico, *Han et al* ⁽³³⁵⁾ analizaron la expresión de ARNm de genes de la vía Notch en la base de datos de TCGA e identificaron tres grupos con diferentes pronóstico y características moleculares en cáncer renal de células claras avanzado. Elaboraron un *score* de Notch, asociado con la activación de la vía Notch, la angiogénesis, la actividad PI3K-AKT-mTOR y sensibilidad a los inhibidores de VEGFR/mTOR. Un *score* Notch alto se relacionó con un perfil inmunosupresor con infiltrado inmunitario anti-inflamatorio, vías inmunitarias inactivadas y escasa respuesta a terapias basadas en ICIs sobre los inhibidores de VEGFR/mTOR en los ensayos JAVELIN Renal 101 (avelumab más axitinib versus sunitinib) y CheckMate-009/010/025 (nivolumab versus everolimus). En la misma línea, *Wang et al* ⁽³³⁶⁾ encontraron que mutaciones con pérdida de función en la vía Notch (NOTCH1-4 y FBXW7) se asociaron con una activación de la respuesta inmune en

cáncer de colon, especialmente, en aquellos pacientes con inestabilidad de microsatélites. La pérdida de la señalización de Notch incrementó la expresión de quimioquinas (CXCL1 y CX3CL1) que promovieron el reclutamiento de células inmunes en el MAT y se correlacionó con una mayor SG ($p=0,003$) en los pacientes tratados con terapia basada en ICIs.

Sin embargo, también encontramos trabajos en los que las **mutaciones en la vía Notch se asocian a una mejor respuesta al tratamiento con ICIs** aunque no queda claro en todos los casos que estas mutaciones impliquen una activación de la señalización a través de la vía Notch en el MAT. De esta manera, el número de mutaciones no sinónimas en la vía Notch se correlaciona con la respuesta a terapia con ICIs en CPNM⁽³³⁷⁾. En este sentido, tenemos también evidencia de que la concurrencia de mutaciones en Notch y en genes de vías de reparación del DNA se correlaciona con una mayor supervivencia en pacientes con CPNM tratados con ICIs^(338, 339). En particular, las mutaciones en NOTCH4 también se han asociado con un incremento de inmunogenicidad en el MAT mediado por un incremento en la infiltración por células T CD8+ y una mejor respuesta a ICIs en varios tipos de cáncer⁽³⁴⁰⁾. En la misma línea, *Sun et al*⁽³⁴¹⁾ utilizaron una firma de 6 genes de la vía Notch para estratificar en 2 grupos de riesgo, encontrando diferencias en el estado inmune del MAT y en la supervivencia a inmunoterapia en pacientes con cáncer de vejiga.

2.3. LA EXPRESIÓN DE IDO1 EN MDSCs CIRCULANTES Y EN EL MAT SE ASOCIA CON LA RESPUESTA Y SUPERVIVENCIA A TERAPIA BASADA EN ICIs

En nuestro trabajo encontramos una **correlación entre la expresión de IDO1 y la expresión de PD-L1 en MDSCs circulantes**. En el análisis de transcriptómica en la población de MDSCs circulantes, una **alta expresión de IDO1 previa al tratamiento con ICIs se asoció con una mayor SG** de forma significativa con respecto al grupo de baja expresión ($p=0,01$) y, este efecto, se mantiene tras ajustar por variables clínicas con valor pronóstico en un modelo multivariante (Expresión IDO1 *high vs low*: HR 0,36; $p=0,001$). De hecho, al incorporar las variables clínicas, citométricas y transcriptómicas en el análisis multivariante, la expresión de IDO1 en MDSCs sigue manteniendo su valor pronóstico independiente en el modelo (Expresión IDO1 *high vs low* ($n = 100$): HR 0,52; $p=0,02$). No encontramos diferencias entre la expresión de IDO1 en MDSCs circulantes entre el grupo de respondedores y no respondedores, pero, en el análisis de transcriptómica en **tejido tumoral**, una **alta expresión de IDO1 basal se correlaciona con menor probabilidad de respuesta al tratamiento con ICIs** ($p=0,04$), de forma opuesta a lo que observamos en MDSCs en sangre periférica.

2.3.1. Expresión de IDO1 en MAT y pronóstico

2,3-Dioxigenasa Indolamina (IDO) es un enzima intracelular que ejerce un efecto inmunosupresor al catabolizar el aminoácido triptófano hasta quinurenina y sus derivados. La expresión de IDO se ha descrito en una diversidad de células inmunes y estromales, sobre todo en CDs, y regula de forma fisiológica la respuesta inmune innata y adaptativa favoreciendo la inmuno-tolerancia. IDO se expresa en muchos tipos de tumores humanos y su alta expresión se asocia con un estadio avanzado de la enfermedad, desarrollo de metástasis y peor pronóstico ^(342, 343). En el caso del CPNM disponemos de datos de la expresión de RNAm de IDO1 en muestras de adenocarcinoma procedentes de la base de datos del TCGA y podemos observar una tendencia a una supervivencia superior en el grupo de alta expresión de IDO1 aunque no llega a alcanzar la significación estadística (IDO1_exp *high vs low*; $p=0,11$), en línea con nuestros hallazgos en MDSCs en sangre periférica. Además, en esta base de datos la expresión de IDO1 en 517 muestras de adenocarcinoma de pulmón se correlaciona con la proporción de MDSCs en sangre (Rho Spearman = 0,46; $p<0,001$) ⁽³¹³⁾. Sin embargo, esta correlación entre la expresión de IDO1 en tejido tumoral y la proporción MDSCs circulantes no la encontramos en nuestro estudio, aunque en este caso, el número de pacientes con datos disponibles fue muy bajo ($n=14$) y probablemente insuficiente para detectar diferencias significativas.

2.3.2. Expresión de IDO1 en MAT e inmuno-evasión

IDO puede expresarse directamente por las propias células tumorales o inducirse, indirectamente por la presencia del tumor, en las CPAs, MDSCs y otras células inmunes y estromales. La **sobre-expresión de IDO genera un MAT inmunosupresor** mediante diferentes mecanismos: inhibe la activación de los linfocitos T efectores mediante el agotamiento de triptófano y promueve la diferenciación y activación de las células Treg mediante la producción de quinurenina ⁽³⁴⁴⁾. Se ha demostrado en diferentes modelos animales que la **expresión de IDO está implicada en la resistencia a inmunoterapia basada en ICIs** a través de mecanismos como el reclutamiento y activación de MDSCs y de células Treg en el MAT. Además, la expresión tumoral de IDO se ha correlacionado con otras moléculas de co-inhibición tales como PD-1/PD-L1 ^(345, 346). Los principales inductores de la expresión de IDO en el MAT son los interferones de tipo I y, especialmente, de tipo II como IFN γ producidos por los TILs que regulan positivamente IDO a través de STAT-1 y NF- κ B como una señal de retroalimentación negativa, contribuyendo a la evasión inmune. Por tanto, el IFN γ producido por células T CD8+ activadas es un factor necesario para la expresión de IDO y PD-L1 en MAT de tumores “inflamados”, siendo la expresión de PD-L1 un factor predictivo de respuesta a inmunoterapia con anti-PD1/PD-L1 ⁽³⁴²⁾. Nosotros encontramos **correlación entre la expresión de IDO1 y la expresión de PD-L1 en MDSCs circulantes** en nuestro trabajo. Esta expresión de IDO dependiente de linfocitos T CD8+ e IFN γ en tumores “inflamados”

podría ser una de las explicaciones por la que se observa un pronóstico favorable en diferentes tipos cáncer con alta expresión de IDO en el MAT y, está en línea, con lo observado en nuestro trabajo donde la alta expresión de IDO1 en MDSCs circulantes se asocia a una mayor SG tras inmunoterapia con ICIs en el análisis multivariante.

En el contexto tumoral, las **MDSCs son también una de las fuentes de IDO en el MAT** y numerosos estudios han puesto de manifiesto su **valor pronóstico**. En un modelo murino de cáncer de pulmón, se identificó a las M-MDSCs como la principal fuente de expresión de IDO ⁽³⁴⁷⁾, mientras que, en otro modelo las MDSCs IDO+ indujeron la expresión de moléculas de co-inhibición como PD-1, CTLA-4, LAG-3 y TIM-3 en las células T CD8+ generando un fenotipo exhausto ⁽³⁴⁸⁾. Los mecanismos moleculares que subyacen a la expresión aberrante de IDO en MDSCs no son muy conocidos. En MDSCs derivadas de cáncer de mama, la expresión de IDO aumentó a través de la vía IL-6/STAT-3, que activó la vía no canónica de NF-κB, lo que resultó en una mayor actividad transcripcional del promotor de IDO ⁽³⁴⁹⁾. En un modelo tumoral murino de melanoma con sobreexpresión de IDO se observó un aumento de la población de MDSCs tanto en tumor como en bazo. Sin embargo, las MDSCs periféricas aisladas del bazo presentaron niveles bajos de Arg1 e iNOS y no mostraron actividad supresora *in vitro* ⁽³⁵⁰⁾. En cáncer de ovario, el nivel de M-MDSCs y PMN-MDSCs IDO+ fue significativamente mayor en sangre periférica en comparación con el MAT ⁽³⁵¹⁾. Por tanto, la **activación de las funciones inmunosupresoras de MDSCs mediadas por IDO** parecen adquirirse una vez se reclutan en el MAT. Los mecanismos por los cuales se activan las funciones de las MDSCs dentro del MAT no están del todo claros, pero implican a citoquinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento liberados por las células tumorales en su microambiente. Estos cambios probablemente expliquen porqué la expresión de IDO en MDSCs circulantes tenga un significado diferente al que podemos observar en el MAT.

2.3.3. Expresión de IDO en células inmunes circulantes y respuesta a ICIs

En el microambiente tumoral, la expresión de CTLA-4 en células Treg modula positivamente IDO en las CD8 y MDSCs, lo que promueve recíprocamente la activación de Treg. Esta interacción de puntos de control inmune también se evidencia en sangre periférica. La frecuencia de MDSCs IDO+ por citometría se correlacionó con la infiltración de Treg en tejido por IHQ y tuvo un impacto negativo en la supervivencia en pacientes con cáncer de mama tratadas con QT neoadyuvante en un modelo multivariante ⁽³⁵²⁾. Sin embargo, hay muy pocos estudios que analicen el **impacto de la expresión de IDO en células inmunes en sangre periférica en la terapia basada en ICIs**. A nivel clínico la expresión de IDO en MDSCs circulantes se ha determinado en 72 pacientes con melanoma estadio I a IV. La expresión de IDO se detectó predominantemente en pCDs CD123+ y M-MDSCs y, en mucha menor medida, en Treg y PMN-MDSCs. La actividad de IDO en sangre periférica se correlacionó positivamente con los niveles de células T CD8+ PD-L1+ y Treg CTLA4+, lo que remarca la estrecha interconexión entre estos marcadores

inmunosupresores en células inmunes circulantes. En pacientes en estadio IV se encontraron frecuencias más altas de M-MDSCs IDO+ y PMN-MDSCs IDO+ en comparación con los pacientes en estadio I-III. Sin embargo, esto no tuvo impacto en la SG ni SLP ⁽³⁵³⁾. En pacientes con CPNM, cáncer renal y melanoma, la actividad de IDO medida indirectamente por el índice Quinurenina/Triptófano (Kyn/Trp) en suero o plasma durante el tratamiento con inmunoterapia basada en ICIs se asoció con resistencia al tratamiento y menor SLP ⁽³⁵⁴⁻³⁵⁷⁾. En modelos pre-clínicos se ha demostrado que el bloqueo de IDO es eficaz como parte de una terapia combinada que incluye tratamiento con ICIs ^(358, 359). Sin embargo, cuando estos inhibidores (epacadostat) han pasado a la fase de ensayos clínicos no han logrado demostrar un beneficio en supervivencia con la combinación con pembrolizumab en melanoma avanzado ⁽³⁶⁰⁾.

2.4. POSIBLES APLICACIONES TERAPÉUTICAS DE LA MODULACIÓN DE LA VÍA NOTCH EN IMUNOTERAPIA

El análisis transcripcional de las MDSCs circulantes y del tejido tumoral en nuestra investigación pone de manifiesto dos **mecanismos de resistencia al tratamiento con ICIs en CPNM** que parecen clave en la respuesta a esta terapia y que implican a la **expresión de ligandos Jagged y a la activación de la vía Notch en MDSCs circulantes y en el MAT**. Por tanto, parece evidente que una de las aplicaciones potenciales de estos hallazgos sea el desarrollo de estrategias de tratamiento dirigidas a contrarrestar estos mecanismos de resistencia mediados por las funciones inmunosupresoras de las MDSCs, como pueden ser, la generación de **anticuerpos monoclonales anti-Jagged** o **fármacos inhibidores de la señalización de Notch** combinados con terapia basada en ICIs.

2.4.1. Anticuerpos anti-Jagged

Ya hemos revisado en profundidad el papel pro-oncogénico de la señalización Jag1/Notch mediante mecanismos que implican la evasión del sistema inmune. Todos estos mecanismos hacen de la **vía Jag1/Notch en MDSCs una diana terapéutica de especial interés en el CPNM**. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales anti-Jag1 humanos y murinos capaces de bloquear la señalización de Notch *in vitro* en varias líneas celulares, tales como, 15D11, J1-65D y CTX014 ^(361, 362, 170). Aunque los resultados son prometedores, todavía no se han comunicado datos de la eficacia y seguridad de estos anticuerpos anti-JAG1 en el contexto de ensayos clínicos. Disponemos de **evidencia pre-clínica** de la actividad terapéutica *in vivo* de **anticuerpos anti-Jagged1/2** (CTX014) en varios modelos tumorales de ratón, entre ellos, el modelo 3LL de carcinoma de pulmón ⁽¹⁷⁰⁾. Los resultados mostraron que el tratamiento con CTX014 superó la tolerancia de las células T inducida por el tumor, aumentó la infiltración de células T CD8+ reactivadas

en los tumores y mejoró la eficacia de la inmunoterapia basada en células T. El bloqueo de Jagged aumentó la proliferación de linfocitos T CD8+, así como, la señalización a través de la vía Notch en estas células con unos mayores niveles de NOTCH1 y genes diana como HES1. De hecho, en un modelo tumoral de linfoma, los anticuerpos anti-Jagged mejoraron el efecto antitumoral de la terapia de células T adoptivas. Además, los investigadores describieron que la terapia anti-Jagged inducía la acumulación de células MDSC-like que presentaban una menor capacidad de bloquear la proliferación de células T y producción de INF γ , así como, una menor expresión de marcadores inmunosupresores de MDSCs como iNOS y ARG1 comparado con las MDSCs de controles. La depleción de MDSC-like con anti-Gr1+ prevenía la expansión y activación de células T CD8+ mediada por los anticuerpos anti-Jagged en el tumor. Por tanto, la terapia anti-Jagged podría inducir la acumulación de MDSC-like potencialmente antitumorales a través de la activación de células T CD8+. No queda claro el mecanismo exacto por el cual la terapia anti-Jagged produce este efecto, podría estar mediado por los ligandos DLL al activar Notch con una cinética diferente o probablemente al interferir en la inhibición *cis* de los receptores de Notch de las MDSCs por los ligandos Jagged expresados en las mismas células. Sin embargo, estos hallazgos proporcionan evidencias preclínicas del uso de anticuerpos anti-Jagged1/2 para reprogramar la supresión de las células T mediadas por MDSCs y mejorar la eficacia de la inmunoterapia antitumoral.

Jagged1 es un ligando que tiene una serie de **características que lo convierten en una diana atractiva para la terapia antineoplásica** frente a otros ligandos o receptores de la vía Notch. El bloqueo de JAG1 no presenta fenómeno de haplo-insuficiencia como ocurre con otros ligandos de Notch ^(363, 364). Esto permite una mayor ventana terapéutica para interferir en la actividad de la vía Notch sin inducir una toxicidad significativa. Además, mientras que, en el contexto tumoral, los ligandos DLL ejercen sus funciones fundamentalmente en la angiogénesis, los ligandos Jagged tienen un papel más amplio en angiogénesis, regulación de células inmunosupresoras, células tumorales y *stem cells*. Por tanto, interferir en la señalización de JAG1, tanto en el estroma como en las células tumorales, podría inducir efectos sinérgicos, tal y como, se puede observar en modelos de cáncer de ovario ⁽³⁶⁵⁾. La interconexión entre Notch y otras vías de señalización como Wnt, Hedgehog y VEGF, así como, con el sistema immune, hacen de la terapia basada en los ligandos de Notch muy atractiva para desarrollar estrategias de tratamientos combinados con ICIs. Un ejemplo, lo encontramos con navicixizumab (OMP-305B83), un anticuerpo biespecífico que inhibe la señalización de Notch a nivel del ligando DLL4 y VEGF. Un ensayo fase I ha mostrado datos preliminares de la actividad anti-tumoral en múltiples tipos tumorales, que parecen especialmente interesantes en cáncer de ovario ⁽³⁶⁶⁾.

2.4.2. Inhibidores de la señalización Notch en MDSCs

Ya se ha revisado en profundidad que la **activación de la señalización Notch en MDSCs en cáncer** se asocia a un **fenotipo de MDSCs con una mayor capacidad de inducir inmunosupresión** a las células T y **resistencia al tratamiento basado en ICIs**. Además, la activación de la señalización de la vía Notch en el MAT está asociada a un microambiente más inmunosupresor secundario a un mayor reclutamiento y activación de poblaciones celulares inmunosupresoras, así como, una mayor expresión de moléculas inhibitorias de los puntos de control inmune. Esta activación de la vía Notch en el MAT favorecería la progresión tumoral y conllevaría, por tanto, una mayor resistencia a terapia basada en ICIs.

En el momento de esta revisión no hemos encontrado evidencia del **papel de la activación de la vía Notch en MDSCs circulantes y la respuesta a ICIs en CPNMa**. Sin embargo, tenemos evidencia que apunta a la activación de la vía Notch en el MAT como un mecanismo de resistencia a terapia basada en ICIs, así como, que la inhibición de la señalización se asociaría a una mejor respuesta al tratamiento. En un modelo murino de resistencia adquirida a ICIs en cáncer de colon, *Bernardo et al*⁽³³⁴⁾ realizaron un análisis de expresión génica para estudiar los mecanismos de resistencia. Encontraron una activación de TGF- β y de la señalización de la vía Notch en los tumores resistentes que se asoció a una peor supervivencia. La inhibición de TGF- β y Notch en combinación con anticuerpos anti-PD-1 disminuyó el crecimiento tumoral y re-sensibilizó a los tumores al tratamiento con ICIs. Por tanto, **inhibir la señalización de Notch podría revertir la resistencia a la terapia con ICIs** al actuar sobre poblaciones celulares inmunosupresoras como MDSCs. Las **terapias de combinación de fármacos inhibidores de la señalización de Notch e ICIs** parecen, por tanto, prometedoras en este sentido desde el punto de vista teórico. A nivel pre-clínico, tenemos más evidencia de la sinergia de este tratamiento combinado. En un modelo de cáncer de mama la combinación de anti-PD1 con un iGS redujo la tasa de crecimiento tumoral *in vivo* en mucha mayor medida que ambos tratamientos por separado⁽³⁶⁷⁾. Además, como hemos visto, la **inhibición o activación de la señalización de Notch en células tumorales puede modular la expresión de moléculas de los puntos de control inmune**. También tenemos evidencia que, en las células T, la activación de la señalización de Notch mejora su citotoxicidad pero promueve la expresión de PD-1, lo que potencialmente induciría el agotamiento de las células T. Por lo tanto, es probable que debamos adoptar diferentes estrategias terapéuticas sinérgicas en diferentes contextos. Para un MAT en el que la inhibición de la señalización de Notch induce la expresión de PD-1, teóricamente podríamos combinar inhibidores de la señalización de Notch con ICIs para intentar obtener efectos antitumorales sinérgicos. AL101 y foscicliprox son dos inhibidores de la vía Notch de los que se ha presentado resultados preliminares en ensayos clínicos fase I-II en tumores sólidos en ASCO 2022.

2.5. Fortalezas y limitaciones del estudio

Entre las **fortalezas del estudio** podemos destacar su naturaleza prospectiva y multicéntrica incluyendo una población homogénea de 105 pacientes con CPNMa tratados con ICIs en $\geq 2^{\text{a}}$ línea, una de las mayores series comunicadas hasta el momento con datos de poblaciones celulares inmunosupresoras circulantes. También cabe destacar la recolección de muestras frescas, no criopreservadas, puesto que, la criopreservación puede alterar el aislamiento de las poblaciones de MDSCs y el procesamiento homogéneo de las mismas. Por último, el impacto pronóstico de las diferentes poblaciones celulares y genes analizados se ajustó en un análisis multivariante con otras variables pronóstico conocidas en cáncer de pulmón.

Aunque nuestro estudio apoya la idea de que los niveles de MDSCs pueden usarse como marcador pronóstico en CPNM, también plantea preguntas importantes sobre la biología de las MDSCs y las funciones específicas de las diferentes subpoblaciones de MDSCs en la promoción de la progresión tumoral. Una de las **principales limitaciones** es que no evaluamos las poblaciones de células inmunosupresores en el tejido tumoral, pudiendo ser éstas más representativas que las poblaciones celulares circulantes en sangre periférica. De hecho, *Yamauchi et al* ⁽²⁶¹⁾ han comunicado que la proporción de las subpoblaciones de MDSCs son mayores en el tejido tumoral que en sangre periférica, aunque sólo los niveles de MDSCs circulantes fueron capaces de predecir recaídas tras la cirugía. Además, hay que tener en cuenta recientes publicaciones que muestran importantes diferencias funcionales entre las MDSCs circulantes e intra-tumorales ⁽³⁶⁸⁻³⁷⁰⁾. Por lo tanto, se necesita una mejor caracterización fenotípica y funcional de las MDSCs antes de que se pueda explicar completamente su potencial como biomarcador predictivo. Otra de las limitaciones reside en que no realizamos ensayos funcionales en muestras de sangre periférica de pacientes con MDSCs circulantes y linfocitos T en co-cultivo para evaluar la actividad inmunosupresora de las mismas. La distinción entre PMN-MDSCs y neutrófilos también supone una limitación a la hora de su similitud desde el punto de vista citométrico en cuanto a su fenotipo y morfología. El método que hemos utilizado en nuestro estudio para la separación de neutrófilos de las PMN-MDSCs es el gradiente de Ficoll. Las PMN-MDSCs están enriquecidas en la fracción de baja densidad, pero esta fracción no solo contiene MDSCs sino también neutrófilos activados ⁽³⁷¹⁾. Otros autores utilizan marcadores de superficie como *lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1* (Lox-1) para distinguir la población de PMN-MDSCs de los neutrófilos ⁽²⁷⁹⁾.

Aunque la evidencia disponible hasta el momento, sobre el potencial papel como biomarcador de las MDSCs y Treg es limitado, nuestros hallazgos confirman que los niveles de MDSCs circulantes previos al inicio de tratamiento con ICIs se correlacionan con la RNL y podrían identificar a los pacientes que tienen más riesgo de progresar y fallecer precozmente tras el inicio del tratamiento. El papel de las MDSCs como biomarcadores predictivos de respuesta a inmunoterapia debería, no obstante, validarse en estudios prospectivos con un mayor número de pacientes y mayor seguimiento.

VI. CONCLUSIONES

I. Análisis de las poblaciones celulares inmunes

1. **Identificamos una asociación significativa entre una proporción elevada de MDSCs circulantes basales y una menor supervivencia tras el tratamiento con ICIs en pacientes con CPNMa.** En la actualidad existen estrategias terapéuticas dirigidas a contrarrestar a la población de MDSCs con la finalidad de mejorar la eficacia clínica y revertir la resistencia a la inmunoterapia basada en ICIs.
2. **Una proporción alta de Treg circulantes basales, se asocia con una mayor SG tras terapia con ICIs en CPNMa,** aunque no se mantuvo como variable independiente en el análisis multivariante.
3. **Identificamos una asociación significativa entre una RNL pre-tratamiento elevada y una menor supervivencia tras el tratamiento con ICIs en pacientes con CPNMa.**
4. **Encontramos una correlación directa entre los niveles de MDSCs circulantes (MDSCs totales y PMN-MDSCs) y la RNL.** Agrupando MDSCs, RNL y RPL identificamos a los pacientes con mayor probabilidad de presentar una supervivencia prolongada o una muerte precoz tras inmunoterapia. Por tanto, la RNL podría ser un reflejo de la proporción de MDSCs circulantes en CPNMa.

II. Análisis de la expresión de genes en MDSCs y tejido

1. **La expresión de ligandos de Notch Jagged en MDSCs circulantes y en el tejido tumoral predicen resistencia al tratamiento con ICIs en CPNMa.**
2. **La activación de la vía Notch mediada por una alta expresión de NOTCH1 y HES1 en MDSCs circulantes y en el tejido tumoral predicen resistencia al tratamiento con ICIs y peor supervivencia.**
3. **La expresión de IDO1 en MDSCs circulantes y en el MAT se asocia con la respuesta y supervivencia a terapia basada en ICIs.** Una alta expresión de IDO1 en MDSCs previa al tratamiento con ICIs se asoció con una mayor SG en el modelo de regresión multivariante. En tejido tumoral, una alta expresión de IDO1 se correlaciona con menor probabilidad de respuesta a ICIs, de forma opuesta a lo que observamos en MDSCs en sangre periférica.

4. **Posibles aplicaciones terapéuticas de la modulación de la vía Notch en inmunoterapia.** El análisis transcripcional de las MDSCs circulantes y del tejido tumoral en nuestra investigación pone de manifiesto dos **mecanismos de resistencia al tratamiento con ICIs en CPNMa** que parecen clave en la respuesta a esta terapia y que implican a la **expresión de ligandos Jagged** y a la **activación de la vía Notch en MDSCs circulantes y en el MAT**. Por tanto, parece evidente que una de las aplicaciones potenciales de estos hallazgos sea el desarrollo de estrategias de tratamiento dirigidas a contrarrestar estos mecanismos, como pueden ser, la **generación de anticuerpos monoclonales anti-Jagged o fármacos inhibidores de la señalización de Notch combinados con terapia basada en ICIs**.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Bray F H, Laversanne M, Sung H, et al. Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* (2024) 74:209-263.
2. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): Analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet* (2018) 391, 1023–1075.
3. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* (2015) 10:1243–1260.
4. Ruiz-Patiño A, Arrieta O, Cardona AF, et al. Immunotherapy at any line of treatment improves survival in patients with advanced metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC) compared with chemotherapy (Quijote-CLICaP). *Thorac Cancer* (2020) 11:353–361.
5. Peterson JJ, Steele-Moses SK. Update on New Therapies With Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin J Oncol Nurs* (2016) 20:405–410.
6. Pennock GK, Chow LQM. The Evolving Role of Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Treatment. *Oncologist* (2015) 20:812–822.
7. Valecha GK, Vennepureddy A, Ibrahim U, et al. Anti-PD-1/PD-L1 antibodies in non-small cell lung cancer: The era of immunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther*. (2017) 17:47–59.
8. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* (2015) 373:123–135.
9. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* (2015) 373:1627–1639.
10. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): A phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet* (2017) 389:255–265.
11. Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet* (2015) 387:1540–1550.
12. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* (2016) 375:1823–1833.
13. Herbst RS, Giaccone G, de Marinis F, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1–Selected Patients with NSCLC. *N Engl J Med* (2020) 383:1328–1339.
14. Sezer A, Kilickap S, Gumus M, et al. Cemiplimab monotherapy for first-line treatment of advanced non-small-cell Lung cancer with PD-L1 of at least 50%: a multicentre, open-label, global, phase 3, randomised, controlled trial. *Lancet* (2021) 397(10274):592.
15. Luo Q, Zhang L, Luo C. et al. Emerging strategies in cancer therapy combining chemotherapy with immunotherapy. *Cancer Lett* (2019) 454:191–203.
16. Garassino M, Gadgeel S, Speranza G, et al. KEYNOTE-189 5-year update: First-line pembrolizumab (pembro) + pemetrexed (pem) and platinum vs placebo (pbo) + pem and platinum for metastatic nonsquamous NSCLC. *Ann Oncol* (2022) 33

17. Novello S, Kowalski D, Luft A, et al. 5-year update from KEYNOTE-407: Pembrolizumab plus chemotherapy in squamous non-small cell lung cancer (NSCLC). *Ann Oncol* (2022) 33 (Suppl. S7): S448–S554.
18. Gogishvili M, Melkadze T, Makharadze T, et al. Cemiplimab plus chemotherapy versus chemotherapy alone in non-small cell lung cancer: A randomized, controlled, double-blind phase 3 trial. *Nat Med* (2022) 28:2374–2380.
19. West H, McCleod M, Hussein M, et al. 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. *Lancet Oncol* (2019) 20:924–937.
20. Ready N, Hellmann MD, Awad MM, et al. First-Line Nivolumab Plus Ipilimumab in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer (CheckMate 568): Outcomes by Programmed Death Ligand 1 and Tumor Mutational Burden as Biomarkers. *J Clin Oncol* (2019) 37:992–1000.
21. Hellmann MD, Paz-Ares L, Bernabe Caro R, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* (2019) 381:2020–2031.
22. Paz-Ares L, Ciuleanu TE, Cobo M, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): An international, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* (2021) 22:198–211.
23. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* (2017) 541:321–330.
24. Fundytus A, Booth C, Tannock I. How low can you go? PD-L1 expression as a biomarker in trials of cancer immunotherapy. *Ann Oncol* (2021) 32:833–836.
25. Brody R, Zhang Y, Ballas M, et al. PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. *Lung Cancer* (2017) 112:200–215.
26. Xu Y, Wan B, Chen X, et al. The association of PD-L1 expression with the efficacy of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy and survival of non-small cell lung cancer patients: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Transl Lung Cancer Res* (2019) 8:413–428.
27. Davis AA, Patel VG. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: An analysis of all US Food and Drug Administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer* (2019) 7:278.
28. Shklovskaya E, Rizos H. Spatial and Temporal Changes in PD-L1 Expression in Cancer: The Role of Genetic Drivers, Tumor Microenvironment and Resistance to Therapy. *Int J Mol Sci* (2020) 21:7139.
29. Prince SS, Bubendorf L. Predictive potential and need for standardization of PD-L1 immunohistochemistry. *Virchows Arch* (2018) 474:475–484.
30. Schumacher TN. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* (2015) 348:69–74.
31. Nan Z, Guoqing W, Xiaoxu Y, et al. The Predictive Efficacy of Tumor Mutation Burden (TMB) on Non-small Cell Lung Cancer Treated by Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Res Int* (2021) 2021: 1780860.
32. Galvano A, Gristina V, Malapelle U, et al. The prognostic impact of tumor mutational burden (TMB) in the first-line management of advanced non-oncogene addicted non-small-cell lung cancer (NSCLC): A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *ESMO Open* (2021) 6:100124.

33. Merino DM, McShane LM, Fabrizio D, et al. Establishing guidelines to harmonize tumor mutational burden (TMB): In silico assessment of variation in TMB quantification across diagnostic platforms: Phase I of the Friends of Cancer Research TMB Harmonization Project. *J Immunother Cancer* (2020) 8:e000147.
34. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med* (2017) 9:34.
35. Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* (2017) 357:409–413.
36. Uryvaev A, Passhak M, Hershkovits D, et al. The role of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) as a predictive biomarker of response to anti-PD1 therapy in patients with metastatic non-small cell lung cancer or metastatic melanoma. *Med Oncol* (2018) 35:25.
37. Vareki SM. High and low mutational burden tumors versus immunologically hot and cold tumors and response to immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer* (2018) 6:157.
38. Donnem T, Kilvaer TK, Andersen S, et al. Strategies for clinical implementation of TNM-Immunoscore in resected non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* (2016) 27:225–232.
39. Russano M, Napolitano A, Ribelli G, et al. Liquid biopsy and tumor heterogeneity in metastatic solid tumors: The potentiality of blood samples. *J Exp Clin Cancer Res* (2020) 39:95, Erratum in *J Exp Clin Cancer Res* (2020) 39:120.
40. Li S, et al. Emerging Blood-Based Biomarkers for Predicting Response to Checkpoint Immunotherapy in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front Immunol* (2020) 11:603157.
41. Jiang T, Bai Y, et al. Clinical value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in patients with non-small-cell lung cancer treated with PD-1/PD-L1 inhibitors. *Lung Cancer* (2019) 130:76–83.
42. Cao D, Xu H, Xu X, et al. A reliable and feasible way to predict the benefits of Nivolumab in patients with non-small cell lung cancer: A pooled analysis of 14 retrospective studies. *Oncoimmunology* (2018) 7:e1507262.
43. Kim CG, Hong MH, Kim KH, et al. Dynamic changes in circulating PD-1+CD8+ T lymphocytes for predicting treatment response to PD-1 blockade in patients with non-small-cell lung cancer. *Eur J Cancer* (2020) 143:113–126.
44. Hao Z, Li R, Wang Y, et al. Landscape of Myeloid-derived Suppressor Cell in Tumor Immunotherapy. *Biomark Res* (2021) 9:77.
45. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* (2011) 11(6):426–437.
46. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discovery* (2016) 6(5):479–491.
47. Zhu X, Lang J. Soluble PD-1 and PD-L1: Predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget* (2017) 8:97671–97682.
48. Zhang J, Gao J, et al. Circulating PD-L 1 in NSCLC patients and the correlation between the level of PD-L1 expression and the clinical characteristics. *Thorac Cancer* (2015) 6:534–538.
49. Yang Q, Chen M, Gu J, et al. Novel Biomarkers of Dynamic Blood PD-L1 Expression for Immune Checkpoint Inhibitors in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Front Immunol* (2021) 12:665133.

50. Augustus E, Zwaenepoel K, Siozopoulou V, et al. Prognostic and Predictive Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer Patients on Immunotherapy—The Role of Liquid Biopsy in Unraveling the Puzzle. *Cancers* (2021) 3:1675.
51. Moding EJ, Nabet BY, Alizadeh AA, Diehn M. Detecting Liquid Remnants of Solid Tumors: Circulating Tumor DNA Minimal Residual Disease. *Cancer Discovery* (2021) 11(12):2968-2986.
52. Pasini L. Extracellular Vesicles in Non-Small-Cell Lung Cancer: Functional Role and Involvement in Resistance to Targeted Treatment and Immunotherapy. *Cancers* (2019) 12:40.
53. Syn N, Wang L, Sethi G, et al. Exosome-Mediated Metastasis: From Epithelial-Mesenchymal Transition to Escape from Immunosurveillance. *Trends Pharmacol Sci* (2016) 37:606–617.
54. Niveditha D, Jasoria M, Narayan J, et al. Common and Unique microRNAs in Multiple Carcinomas Regulate Similar Network of Pathways to Mediate Cancer Progression. *Sci Rep* (2020) 10:2331.
55. Jia Y. Modulators of miRNA Function in the Immune System. *Int J Mol Sci* (2020) 21:2357.
56. Fan J, Yin Z, Xu J, et al. Circulating microRNAs predict the response to anti-PD-1 therapy in non-small cell lung cancer. *Genomics* (2019) 112:2063–2071.
57. Boeri M, Milione M, Proto C, et al. Circulating miRNAs and PD-L1 Tumor Expression Are Associated with Survival in Advanced NSCLC Patients Treated with Immunotherapy: A Prospective Study. *Clin Cancer Res* (2019) 25:2166-2173.
58. Pantano F, Zalfa F, Iuliani M, et al. Large-Scale Profiling of Extracellular Vesicles Identified miR-625-5p as a Novel Biomarker of Immunotherapy Response in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Patients. *Cancers* (2022) 14:2435.
59. Peng XX, Yu R, Wu X, et al. Correlation of plasma exosomal microRNAs with the efficacy of immunotherapy in EGFR/ALK wild-type advanced non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer* (2020) 8:e000376.
60. Maddi A, Sabharwal A, Violante T, et al. The microbiome and lung cancer. *J Thorac Dis* (2019) 11:280–291.
61. Chen J, Domingue JC, Sears CL. Microbiota dysbiosis in select human cancers: Evidence of association and causality. *Semin Immunol* (2017) 32:25–34.
62. Budden KF, Gellatly SL, Wood DLA, et al. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut–lung axis. *Nat Rev Microbiol* (2017) 15:55-63.
63. Hakoziaki T, Richard C, Elkrief A, et al. The Gut Microbiome Associates with Immune Checkpoint Inhibition Outcomes in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Immunol Res* (2020) 8:1243-1250.
64. Derosa L, Routy B, Thomas AM, et al. Intestinal *Akkermansia muciniphila* predicts clinical response to PD-1 blockade in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Nat Med* (2022) 28:315-324.
65. Jin Y, Dong H, Xia L, et al. The Diversity of Gut Microbiome is Associated With Favorable Responses to Anti-Programmed Death 1 Immunotherapy in Chinese Patients With NSCLC. *J Thorac Oncol* (2019) 14:1378-1389.
66. Metz CW, Bridges CB. Incompatibility of mutant races in drosophila. *Proc Natl Acad Sci United States America*. (1917) 3:673-8.

67. Kidd S, Kelley MR, Young MW. Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Mol. Cell Biol.* (1986) 6:3094-3108.
68. Aggarwal V, Tuli HS, Varol M, et al. Notch signaling: journey of an evolutionarily conserved pathway in driving tumor progression and its modulation as a therapeutic target. *Crit Rev oncology/hematol.* (2021) 164:103403.
69. Bray SJ. Notch signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2016) 17:722–35.
70. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* (1999) 284:770-6.
71. Zhou B, Lin W, Long Y, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal transduction targeted Ther.* (2022) 7:95.
72. Li L et al. Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat. Genet.* (1997) 16:243–251.
73. Li X, Yan X, Wang Y et al. The notch signaling pathway: A potential target for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* (2023) 16:45.
74. Kovall RA, Gebelein B, Sprinzak D, et al. The canonical notch signaling pathway: structural and biochemical insights into shape, sugar, and force. *Dev Cell.* (2017) 41:228-41.
75. Kopan R, Ilagan MX. The canonical notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell.* (2009) 137:216-33.
76. Garis M, Garrett-Sinha LA. Notch signaling in B cell immune responses. *Front Immunol.* (2020) 11:609324.
77. Nandagopal N, Santat LA, Elowitz MB. Activation in the Notch signaling pathway. *eLife.* (2019) 8:e37880.
78. Bian W, Jiang H, Yao L, et al. A spatially defined human notch receptor interaction network reveals notch intracellular storage and ataxin-2-mediated fast recycling. *Cell Rep.* (2023) 42:112819.
79. Stanley P. Regulation of notch signaling by glycosylation. *Curr Opin Struct Biol.* (2007) 17:530-5.
80. Kakuda S, Haltiwanger RS. Deciphering the Fringe-Mediated Notch Code: Identification of Activating and Inhibiting Sites Allowing Discrimination between Ligands. *Dev Cell.* (2017) 40(2):193-201.
81. Fiúza UM, Arias M. Cell and molecular biology of Notch. *Journal of Endocrinology.* (2007) 194:459-474.
82. Groot AJ, Vooijs MA. The role of Adams in Notch signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* (2012) 727:15-36.
83. Bray SJ. Notch signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2016) 17:722–735.
84. Conner, S. D. Regulation of notch signaling through intracellular transport. *Int Rev. Cell Mol. Biol.* (2016) 323:107-127.
85. Heitzler P. Biodiversity and Notch signaling. *Curr Top Dev Biol* (2010) 92:457-81.
86. Gentle ME, Rose A, Bugeon L, et al. Noncanonical Notch signaling modulates cytokine responses of dendritic cells to inflammatory stimuli. *J. Immunol.* (2012). 189: 1274-1284.
87. Pelullo M, et al. Kras/ADAM17-dependent Jag1-ICD reverse signaling sustains colorectal cancer progression and chemoresistance. *Cancer Res.* (2019) 79: 5575-5586.
88. Palermo R, Checquolo S, Bellavia D, et al. The molecular basis of Notch signaling regulation: a complex simplicity. *Curr Mol Med* (2014) 14:34-44.

89. Wang H, Zang C, Liu XS, et al. The role of Notch receptors in transcriptional regulation. *J Cell Physiol* (2015) 230:982-8.
90. Nandagopal N, Santat LA, LeBon L, et al. Dynamic ligand discrimination in the Notch signaling pathway. *Cell* (2018) 172(4):869-80.
91. Aster JC, Pear WS, Blacklow SC. The varied roles of Notch in cancer. *Annu Rev Pathol* (2017) 12:245–75.
92. Radtke F, Fasnacht N, MacDonald HR. Notch signaling in the immune system. *Immunity*. (2010). 32:14-27.
93. Bigas A, Robert-Moreno A, Espinosa L. The Notch pathway in the developing hematopoietic system. *Int J Dev Biol*. (2010) 54:1175-1188.
94. Milner LA, Bigas A. Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation. *Blood* 1999; 93:2431-2448.
95. Cheng P, Zhou J, Gabrilovich D. Regulation of dendritic cell differentiation and function by Notch and Wnt pathways. *Immunol Rev* (2010) 234:105-19.
96. Varum-Finney B, et al. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med*. (2000) 6:1278-1281.
97. Calvi LM, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. (2003) 425:841-846.
98. Henning K, et al. Notch1 activation reduces proliferation in the multipotent hematopoietic progenitor cell line FDCP-mix through a p53-dependent pathway but Notch1 effects on myeloid and erythroid differentiation are independent of p53. *Cell Death Differ*. (2008) 15:398-407.
99. Schroeder T, Just U. Notch signalling via RBP-J promotes myeloid differentiation. *EMBO J* (2000) 19:2558–2568.
100. Palucka K, Ueno H, Fay J, et al. Dendritic cells and immunity against cancer. *J Intern Med*. (2011) 269:64-73.
101. Sathe P, Wu L. The network of cytokines, receptors and transcription factors governing the development of dendritic cell subsets. *Protein Cell*. (2011) 2:620-630
102. Cheng P, Gabrilovich D. Notch signaling in differentiation and function of dendritic cells. *Immunol Res*. (2008) 41:1-14.
103. Ohishi K, Varum-Finney B, Serda RE, et al. The Notch ligand, Delta-1, inhibits the differentiation of monocytes into macrophages but permits their differentiation into dendritic cells. *Blood*. (2001) 98:1402-1407.
104. Radtke F, Ferrero I, Wilson A, et al. Notch1 deficiency dissociates the intrathymic development of dendritic cells and T cells. *J Exp Med*. (2000) 191:1085-1094.
105. Cheng P, Nefedova Y, Miele L, et al. Notch signaling is necessary but not sufficient for differentiation of dendritic cells. *Blood*. (2003) 102:3980-8.
106. Gentle ME, Rose A, et al. Noncanonical Notch Signaling Modulates Cytokine Responses of Dendritic Cells to Inflammatory Stimuli. *J Immunol*. (2012) 189 (3): 1274-1284.
107. Wang YC, Hu XB, He F, et al. Lipopolysaccharide-induced maturation of bone marrow-derived dendritic cells is regulated by notch signaling through the up-regulation of CXCR4. *J Biol Chem*. (2009) 284:15993-16003.
108. Amsen D, Antov A, Flavell RA. The different faces of notch in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. (2009) 9:116-24.

109. Amsen D, Blander JM, Lee GR, et al. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell*. (2004) 117:515-26.
110. Laky K, Evans S, Perez-Diez A, et al. Notch signaling regulates antigen sensitivity of naive CD4+ T cells by tuning co-stimulation. *Immunity*. (2015) 42(1):80-94.
111. Tchekneva EE, Goruganthu MU, Uzhachenko RV, et al. Determinant roles of dendritic cell-expressed Notch Delta-like and Jagged ligands on anti-tumor T cell immunity. *J Immunother*. (2019) 7: 1-17.
112. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* (2018).
113. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *Prime Rep* (2014) 6:13.
114. Palaga T, Wongchana W and Kueanjinda P. Notch Signaling in Macrophages in the Context of Cancer Immunity. *Front Immunol*. (2018) 9:652.
115. Palaga T, Buranaruk C, Rengpipat S, et al. Notch signaling is activated by TLR stimulation and regulates macrophage functions. *Eur J Immunol* (2008) 38(1):174-83.
116. Xu H, Zhu J, Smith S, et al. NotchRBPJ signaling regulates the transcription factor IRF8 to promote inflammatory macrophage polarization. *Nat Immunol* (2012) 13(7):642-50.
117. Foldi J, Shang Y, et al. RBPJ is required for M2 macrophage polarization in response to chitin and mediates expression of a subset of M2 genes. *Protein Cell* (2016) 7(3):201-9.
118. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, et al. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* (2006) 80(6):1298-307.
119. Foldi J, Chung AY, Xu H, et al. Autoamplification of Notch signaling in macrophages by TLR induced and RBPJ dependent induction of Jagged1. *J Immunol*. (2010) 185(9):5023-31.
120. Chiplunkar SV, Gogoi D. The multifaceted role of Notch signal in regulating T cell fate. *Immunology Letters*. (2019) 206:59-64.
121. Radtke F, MacDonald HR, Tacchini-Cottier F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat Rev Immunol*. (2013) 13(6):427-37.
122. Amsen D, Helbig C, Backer RA. Notch in T cell differentiation: all things considered. *Trends Immunol*. (2015) 36(12):802-14.
123. García-León MJ, Fuentes P, de la Pompa JL, et al. Dynamic regulation of NOTCH1 activation and Notch ligand expression in human thymus development. *Development* (2018) 145 (16): dev165597.
124. Vanderbeck A, Maillard I. Notch signaling at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol*. (2021) 109 (3):535-548.
125. Pagala T, Miele L, et al. TCR-Mediated Notch Signaling Regulates Proliferation and IFN- γ Production in Peripheral T Cells. *J Immunol* (2003) 171 (6): 3019-3024.
126. Tsukumo SI, Yasutomo K. Regulation of CD8+ T Cells and Antitumor Immunity by Notch Signaling. *Front Immunol*. (2018) 9:101.
127. Maekawa Y, Minato Y, Ishifune C, et al. Notch2 integrates signaling by the transcription factors RBP-J and CREB1 to promote T cell cytotoxicity. *Nat Immunol* (2008) 9(10):1140-7.
128. Palaga T, Miele L, Golde TE, et al. TCR-mediated Notch signaling regulates proliferation and IFN-production in peripheral T cells. *J Immunol* (2003) 171(6):3019-24.
129. Sauma D, Ramirez A, Alvarez K, et al. Notch signalling regulates cytokine production by CD8+ and CD4+ T cells. *Scand J Immunol* (2012) 75(4):389-400.

130. Sierra RA, Thevenot P, Raber PL, et al. Rescue of notch1 signaling in antigen-specific CD8 β T cells overcomes tumor-induced T-cell suppression and enhances immunotherapy in cancer. *Cancer Immunol Res* (2014) 2:800-11.
131. Huang Y, Lin L, Shanker A, et al. Resuscitating cancer immunosurveillance: selective stimulation of DLL1-Notch signaling in T cells rescues T-cell function and inhibits tumor growth. *Cancer Res* (2011) 71:6122-31.
132. Kijima M, Iwata A, Maekawa Y, et al. Jagged1 suppresses collagen-induced arthritis by indirectly providing a negative signal in CD8 β T cells. *J Immunol.* (2009) 182:3566-72.
133. Backer RA, Helbig C, Gentek R, et al. A central role for Notch in effector CD8(+) T cell differentiation. *Nat Immunol.* (2014) 15(12):1143-51.
134. Garis M, Garrett-Sinha LA. Notch signaling in B cell immune responses. *Front Immunol.* (2021) 11:609324.
135. Benne C, Lelievre JD, Balbo M, et al. Notch increases T/NK potential of human hematopoietic progenitors and inhibits B cell differentiation at a pro-B stage. *Stem Cells* (2009) 27(7):1676-85.
136. Saito T, Chiba S, et al. Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for marginal zone B lineage development. *Immunity* (2003) 18(5):675-85.
137. Beck RC, Padival M, Yeh D, et al. The Notch ligands Jagged2, Delta1, and Delta4 induce differentiation and expansion of functional human NK cells from CD34⁺ cord blood hematopoietic progenitor cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* (2009) 15(9):1026-37.
138. Felices M, Ankarlo DE, Lenvik TR, et al. Notch signaling at later stages of NK cell development enhances KIR expression and functional maturation. *J Immunol.* (2014) 193(7):3344-54.
139. Kijima M, Yamaguchi T, Ishifune C, et al. Dendritic cell-mediated NK cell activation is controlled by Jagged2–Notch interaction. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2008) 105(19):7010–5.
140. Zakiryanova GK, Kustova E, Urazalieva NT, et al. Notch signaling defects in NK cells in patients with cancer. *Cancer Immunol Immunother.* (2021) 70(4):981-8.
141. Kyoizumi S, Kubo Y, Kajimura J, et al. Fate decision between group 3 innate lymphoid and conventional NK cell lineages by notch signaling in human circulating hematopoietic progenitors. *J Immunol.* (2017) 199(8):2777-93.
142. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* (2002) 3:991-998.
143. Wang M, Yu F, Zhang Y, et al. Novel insights into Notch signaling in tumor immunity: potential targets for cancer immunotherapy. *Front Immunol.* (2024) 15:1352484.
144. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol.* (2012) 12:253-68.
145. Lasser SA, Ozbay FG, Arkhypov I, et al. Myeloid-derived suppressor cells in cancer and cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology.* (2024) 21:147-164.
146. Groth C. et al. Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells during tumour progression. *Br J Cancer.* (2019) 120:16-25.
147. Ma T. et al. Myeloid-derived suppressor cells in solid tumors. *Cells* (2022) 11:310.
148. Safarzadeh E, Orangi M, Mohammadi H, et al. Myeloid-derived suppressor cells: important contributors to tumor progression and metastasis. *J Cell Physiol.* (2018) 233: 3024-3036.

149. Li T, et al. Targeting MDSC for immune-checkpoint blockade in cancer immunotherapy: current progress and new prospects. *Clin Med Insights Oncol.* (2021) 15: 11795549211035540.
150. Bronte V, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun.* (2016) 7: 12150.
151. Dumitru CA, Moses K, Trellakis S, et al. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol Immunother.* (2012) 61:1155-1167.
152. Veglia F, Sanseviero E, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nat Rev Immunol.* (2021) 21:485-498.
153. Condamine T, Gabrilovich DI. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* (2011) 32:19-25.
154. Grazioli P, Felli MP, Screpanti I, et al. The mazy case of Notch and immunoregulatory cells. *J Leukoc Biol* (2017) 102:361-8.
155. Cheng P, Kumar V, Liu H, et al. Effects of Notch signaling on regulation of myeloid cell differentiation in cancer. *Cancer Res* (2014) 74:141-52.
156. Saleem SJ, et al. Hematopoietic cytokine-induced transcriptional regulation and Notch signaling as modulators of MDSC expansion. *Int Immunopharmacol* (2011) 11:808-15.
157. Gibb DR, Saleem SJ, et al. ADAM10 overexpression shifts lympho- and myelopoiesis by dysregulating site 2/site 3 cleavage products of Notch. *J Immunol* (2011) 186:4244-52.
158. Wang SH, Lu QY, Guo YH, et al. The blockage of notch signalling promoted the generation of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells with lower immunosuppression. *Eur J Cancer.* (2016) 68:90-105.
159. Grazioli P, et al. Notch-signaling deregulation induces myeloid-derived suppressor cells in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Front Immunol.* (2022) 13:809261.
160. Liu Q, Zhang M, Jiang X, et al. miR-223 suppresses differentiation of tumor-induced CD11b(+) Gr1(+) myeloid-derived suppressor cells from bone marrow cells. *Int J Cancer* (2011) 129:2662-73.
161. Ogando J, Tardaguila M, Diaz-Alderete A, et al. Notch-regulated miR-223 targets the aryl hydrocarbon receptor pathway and increases cytokine production in macrophages from rheumatoid arthritis patients. *Sci Rep* (2016) 6:20223.
162. Liu H, Zhou J, Cheng P, et al. Regulation of dendritic cell differentiation in bone marrow during emergency myelopoiesis. *J Immunol* (2013) 191:1916-26.
163. Clara JA, Monge C, Yang Yingzi. Targeting signalling pathways and the immune microenvironment of cancer stem cells — a clinical update. *Nature reviews clinical oncology.* (2020) 17(4):204-232.
164. Welte T, Kim IS, Tian L, et al. Oncogenic mTOR signalling recruits myeloid-derived suppressor cells to promote tumour initiation. *Nat Cell Biol* (2016) 18:632-644.
165. Peng D, et al. Myeloid-derived suppressor cells endow stem-like qualities to breast cancer cells through IL6/STAT3 and NO/Notch cross-talk signaling. *Cancer Res* (2016) 76:3156-65.
166. Yumimoto K, Akiyoshi S, Ueo H, et al. F-box protein FBXW7 inhibits cancer metastasis in a non-cell-autonomous manner. *J Clin Invest* (2015) 125:621-35.
167. Otani Y, Yoo JY, et al. Notch-induced MDSC recruitment after ohsv virotherapy in CNS cancer models modulates antitumor immunotherapy. *Clin Cancer Res.* (2022) 28:1460-73.

168. Huang K, et al. Notch3 signaling promotes colorectal tumor growth by enhancing immunosuppressive cells infiltration in the microenvironment. *BMC Cancer*. (2023) 23:55.
169. Sierra RA, Thevenot P, Raber PL, Cui Y, Parsons C, Ochoa AC, et al. Rescue of Notch-1 signaling in antigen-specific CD8+ T cells overcomes tumor-induced T-cell suppression and enhances immunotherapy in cancer. *Cancer Immunol Res*. (2014) 2:800-11.
170. Sierra RA, Trillo-Tinoco J, Mohamed E, et al. Anti-Jagged immunotherapy inhibits MDSCs and overcomes tumor-induced tolerance. *Cancer Res* (2017) 77:5628-38.
171. Sprouse ML, Welte T, Boral D, Liu HN, Yin W, Vishnoi M, et al. PMN-MDSCs enhance CTC metastatic properties through reciprocal interactions via ROS/Notch/Nodal signaling. *Int J Mol Sci*. (2019) 20:1916.
172. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, et al. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol* (2017) 14:399-416.
173. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* (2010) 141:39–51.
174. Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, et al. Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. *J Clin Pathol* (2012) 65:159-63.
175. Wang YC, He F, et al. Notch signaling determines the M1 versus M2 polarization of macrophages in antitumor immune responses. *Cancer Res* (2010) 70:4840-9.
176. Liu H, Wang J, Liu Z, Wang L, et al. Jagged1 modulated tumor associated macrophage differentiation predicts poor prognosis in patients with invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Medicine* (2017) 96:e6663.
177. Liu H, Wang J, Zhang M, et al. Jagged1 promotes aromatase inhibitor resistance by modulating tumor-associated macrophage differentiation in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* (2017) 166:95-107.
178. Tao S, Chen Q, Lin C, et al. Linc00514 promotes breast cancer metastasis and M2 polarization of tumor-associated macrophages via jagged1-mediated notch signaling pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. (2020) 39:191.
179. Yin JZ, Shi XQ, Wang MD, et al. Arsenic trioxide elicits anti-tumor activity by inhibiting polarization of M2-like tumor-associated macrophages via notch signaling pathway in lung adenocarcinoma. *Int Immunopharmacol*. (2023) 117:109899.
180. Geng Y, Fan J, Chen L, et al. A Notch-dependent inflammatory feedback circuit between macrophages and cancer cells regulates pancreatic cancer metastasis. *Cancer Res*. (2021) 81(1):64-76.
181. Otani Y, Yoo JY, Lewis CT, et al. NOTCH-induced MDSC recruitment after oHSV virotherapy in CNS cancer models modulates antitumor immunotherapy. *Clin Cancer Res*. (2022) 28(7):1460-73.
182. Franklin RA, Liao W, Sarkar A, et al. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science* (2014) 344(6186): 921–5.
183. Huang F, Zhao JL, Wang L, et al. miR-148a-3p mediates Notch signaling to promote the differentiation and M1 activation of macrophages. *Front Immunol* (2017) 8:1327.
184. Zhao JL, Huang F, He F, et al. Forced activation of Notch in macrophages represses tumor growth by up regulating miR-125 and disabling tumor-associated macrophages. *Cancer Res* (2016) 76:1403–15.
185. Franklin RA, Liao W, Sarkar A, et al. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science* (2014) 344(6186):921–5.

186. Marini W, Wilson BE, Reedijk M. Targeting Notch-driven cytokine secretion: novel therapies for triple negative breast cancer. *DNA Cell Biol.* (2023) 42:73-81.
187. Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Ann Rev Immunol.* (2012) 30:531–64.
188. Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: a focus on T-regulatory cells. *Immunol Cell Biol.* (2018) 96:21–33.
189. Shang B, Liu Y, Jiang S-j, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* (2015) 5:15179.
190. Campese AF, Grazioli P, Colantoni S, et al. Notch3 and pTalpha/pre-TCR sustain the in vivo function of naturally occurring regulatory T cells. *Int Immunol.* (2009) 21:727-743.
191. Barbarulo A, Grazioli P, Campese, et al. Notch3 and canonical NF-kappaB signaling pathways cooperatively regulate foxp3 transcription. *J Immunol.* (2011) 186:6199-6206.
192. Ou-Yang HF, Zhang HW, Wu CG, et al. Notch signaling regulates the FOXP3 promoter through RBP-J and Hes1-dependent mechanisms. *Mol Cell Biochem.* (2009) 320:109-114.
193. Charbonnier LM, Wang S, Georgiev P, et al. Control of peripheral tolerance by regulatory T cell-intrinsic Notch signaling. *Nat Immunol.* (2015) 16:1162-1173.
194. Garbe A., von Boehmer H. TCR and Notch synergize in alphabeta versus gammadelta lineage choice. *Trends Immunol.* (2007) 28:124-131.
195. Perumalsamy LR, Marcel N, Kulkarni S, et al. Distinct spatial and molecular features of Notch pathway assembly in regulatory T cells. *Sci Signal.* (2012) 5:ra53.
196. Charbonnier LM, Wang S, Georgiev P, Sefik E. Control of peripheral tolerance by regulatory T cell-intrinsic Notch signaling. *Nat. Immunol.* (2015) 16:1162–1173.
197. Yuan C, Chang K, Xu C, et al. High expression of Dll3 is associated with a poor prognosis and immune infiltration in invasive breast cancer patients. *Trans Oncol.* (2021) 14:101080.
198. Cui Y, Li Q, Li W, et al. Notch3 is a prognostic factor and is correlated with immune tolerance in gastric cancer. *Front Oncol.* (2020) 10:574937.
199. Mota C, Nunes-Silva V, Pires AR, et al. Delta-like 1-mediated Notch signaling enhances the in vitro conversion of human memory CD4 T cells into FOXP3-expressing regulatory T cells. *J Immunol.* (2014) 193:5854-5862.
200. Ostroukhova M, et al. Treg-mediated immunosuppression involves activation of the Notch-HES1 axis by membrane-bound TGF-beta. *J Clin Invest.* (2006) 116:996-1004.
201. Hue S, Kared H, Mehwish Y, et al. Notch activation on effector T cells increases their sensitivity to Treg cell-mediated suppression through upregulation of TGF-bRII expression. *Eur J Immunol.* (2012) 42:1796-1803.
202. Yang Z, Qi Y, Lai N, et al. Notch1 signaling in melanoma cells promoted tumor-induced immunosuppression via upregulation of TGFbeta1. *J Exp Clin Cancer Res.* (2018) 37:1.
203. Tchekneva EE, Goruganthu MU, Uzhachenko RV, et al. Determinant roles of dendritic cell-expressed Notch Delta-like and Jagged ligands on anti-tumor T cell immunity. *J Immunother.* (2019) 7: 1-17.
204. Yvon ES, Vigouroux S, Rousseau RF, et al. Overexpression of the Notch ligand, Jagged-1, induces alloantigen-specific human regulatory T cells. *Blood* (2003) 102, 3815-3821.
205. Kared H, Adle-Biasette H, et al. Jagged2-expressing hematopoietic progenitors promote regulatory T cell expansion in the periphery through notch signaling. *Immunity* (2006) 25:823–834.

206. Del Papa B, Sportoletti P, Cecchini D, et al. Notch1 modulates mesenchymal stem cells mediated regulatory T-cell induction. *Eur J Immunol.* (2013) 43:182–187.
207. Cahill EF, Tobin LM, Carty F, et al. Jagged-1 is required for the expansion of CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells by murine mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther.* (2015) 6:19.
208. Gopisetty A, Bhattacharya P, Haddad C, et al. OX40L/Jagged1 cosignaling by GM-CSF-induced bone marrow-derived dendritic cells is required for the expansion of functional regulatory T cells. *J Immunol.* (2013) 190:5516–5525.
209. Hoyne GF, Le Roux I, Corsin-Jimenez M, et al. Serrate1-induced Notch Signalling regulates the decision between immunity and tolerance made by peripheral CD4+ T cells. *Int Immunol* (2000) 12:177–85.
210. Tsai YM, Wu KL, Liu YW, et al. Cooperation between cancer and fibroblasts in vascular mimicry and N2-type neutrophil recruitment via Notch2-Jagged1 interaction in lung cancer. *Front Oncol.* (2021) 11:696931.
211. Bai S, Zhao Y, Chen W, et al. The stromal-tumor amplifying STC1-Notch1 feedforward signal promotes the stemness of hepatocellular carcinoma. *J Trans Med.* (2023) 21:236.
212. Nandi A, Debnath R, Nayak A, et al. Dll1-mediated notch signaling drives tumor cell cross-talk with cancer-associated fibroblasts to promote radioresistance in breast cancer. *Cancer Res.* (2022) 82:3718–33.
213. Kim HJ, Yang K, Kim K, et al. Reprogramming of cancer associated fibroblasts by apoptotic cancer cells inhibits lung metastasis via notch1-wisp-1 signaling. *Cell Mol Immunol.* (2022) 19:1373–91.
214. Shao H, Moller M, Cai L, et al. Converting melanoma-associated fibroblasts into a tumor-suppressive phenotype by increasing intracellular notch1 pathway activity. *PloS One.* (2021) 16:e0248260.
215. Wood CS, Pennel KAF, Leslie H, et al. Spatially resolved transcriptomics deconvolutes prognostic histological subgroups in patients with colorectal cancer and synchronous liver metastases. *Cancer Res.* (2023) 83:1329–44.
216. Yang M, Zhang G, Wang Y, et al. Tumour-associated neutrophils orchestrate intratumoural IL-8-driven immune evasion through Jagged2 activation in ovarian cancer. *Br J Cancer.* (2020) 123:1404–16.
217. Zhu TS, Costello MA, Talsma CE, et al. Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells. *Cancer Res* (2011) 71(18):6061–72.
218. Steg AD, Katre AA, Goodman B, et al. Targeting the Notch ligand JAGGED1 in both tumor cells and stroma in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* (2011) 17(17):5674–85.
219. Wieland E, Rodriguez-Vita J, Liebler SS, et al. Endothelial Notch1 activity facilitates metastasis. *Cancer Cell* (2017) 31(3):355–67.
220. Leong KG, Niessen K, Kulic I, et al. Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *J Exp Med* (2007) 204(12):2935–48.
221. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2014) 15:178–96.
222. Leong KG, et al. Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin. *J Exp Med* (2007) 204:2935–48.

223. Veeraraghavalu K, Subbaiah VK, Srivastava S, et al. Complementation of human papillomavirus type 16 E6 and E7 by Jagged1-specific Notch1-phosphatidylinositol 3-kinase signaling involves pleiotropic oncogenic functions independent of CBF1; Su(H); Lag-1 activation. *J Virol* (2005) 79:7889–98.
224. Tanaka S, Shiraha H, et al. Runtrelated transcription factor 3 reverses epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* (2012) 131:2537–46.
225. Wang Z, Li Y, Kong D, Banerjee S, et al. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the Notch signaling pathway. *Cancer Res* (2009) 69(6):2400–7.
226. Shimizu M, Cohen B, Goldvasser P, et al. Plasminogen activator uPA is a direct transcriptional target of the JAG1-Notch receptor signaling pathway in breast cancer. *Cancer Res* (2011) 71:277–86.
227. Xing F, Kobayashi A, Okuda H, et al. Reactive astrocytes promote the metastatic growth of breast cancer stem-like cells by activating Notch signalling in brain. *EMBO Mol Med* (2013) 5:384–96.
228. Sethi N, Dai X, et al. Tumor-derived JAGGED1 promotes osteolytic bone metastasis of breast cancer by engaging notch signaling in bone cells. *Cancer Cell* (2011) 19:192–205.
229. Wang Z, Li Y, Banerjee S, et al. Down-regulation of Notch-1 and Jagged-1 inhibits prostate cancer cell growth, migration and invasion, and induces apoptosis via inactivation of Akt, mTOR, and NF-kappaB signaling pathways. *J Cell Biochem* (2010) 109:726–36.
230. Kim MH, Kim HB, Yoon SP, et al. Colon cancer progression is driven by APEX1-mediated upregulation of Jagged. *J Clin Invest* (2013) 123:3211–30.
231. Cheng P, Nefedova Y, Miele L, et al. Notch signaling is necessary but not sufficient for differentiation of dendritic cells. *Blood* (2003) 102:3980–8.
232. Liu H, Zhou J, Cheng P, et al. Regulation of dendritic cell differentiation in bone marrow during emergency myelopoiesis. *J Immunol* (2013) 191:1916–26.
233. Wang L, Yu S, Chan ER, et al. Notch-regulated dendritic cells restrain inflammation-associated colorectal carcinogenesis. *Cancer Immunol Res*. (2021) 9:348–61.
234. Kijima M, Yamaguchi T, et al. Dendritic cell-mediated NK cell activation is controlled by Jagged2-Notch interaction. *Proc Natl Acad Sci United States America*. (2008) 105:7010–5.
235. Tsukumo S, Yasutomo K. Regulation of CD8+ T Cells and antitumor immunity by Notch signaling. *Front Immunol*. (2018) 9:101.
236. Sugimoto K, Maekawa Y, Kitamura A, et al. Notch2 signaling is required for potent antitumor immunity in vivo. *J Immunol* (2010) 184(9):4673–8.
237. Zhao E, Maj T, Kryczek I, et al. Cancer mediates effector T cell dysfunction by targeting microRNAs and EZH2 via glycolysis restriction. *Nat Immunol* (2016) 17(1):95–103.
238. Dai K, Huang L, Huang YB, et al. 1810011o10 Rik inhibits the antitumor effect of intratumoral CD8+ T cells through suppression of Notch2 pathway in a murine hepatocellular carcinoma model. *Front Immunol* (2017) 8:320.
239. Meng J, Jiang YZ, Zhao S, Tao Y, Zhang T, Wang X, et al. Tumor-derived jagged1 promotes cancer progression through immune evasion. *Cell Rep*. (2022) 38:110492.
240. Biktasova AK, Dudimah DF, Uzhachenko RV, et al. Multivalent forms of the Notch ligand DLL-1 enhance antitumor T-cell immunity in lung cancer and improve efficacy of EGFR-targeted therapy. *Cancer Res* (2015) 75(22):4728–41.

241. Thounaojam MC, Dudimah DF, Pellom ST Jr, et al. Bortezomib enhances expression of effector molecules in anti-tumor CD8+ T lymphocytes by promoting Notch-nuclear factor-kappaB crosstalk. *Oncotarget* (2015) 6(32):32439–55.
242. Kondo T, Morita R, Okuzono Y, et al. Notch-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy. *Nature communications*. (2017) 8:15338.
243. Parmigiani E, Ivanek R, Rolando C, et al. Interferon-gamma resistance and immune evasion in glioma develop via Notch regulated co-evolution of malignant and immune cells. *Dev Cell*. (2022) 57:1847–65 e9.
244. Ghosh C, Luong G, Sun Y. A snapshot of the PD-1/PD-L1 pathway. *J Cancer*. (2021) 12:2735-46.
245. Mathieu M, Cotta-Grand N, Daudelin JF, et al. Notch signaling regulates PD-1 expression during CD8 (+) T-cell activation. *Immunol Cell Biol* (2013) 91(1):82-8.
246. Yu W, Wang Y. Notch signaling pathway dampens tumor-infiltrating CD8 (+) T cells activity in patients with colorectal carcinoma. *Biomed Pharmacother* (2017) 97:535-42.
247. Jiang Q, Chen H, Zhou S, et al. Ubiquilin-4 induces immune escape in gastric cancer by activating the notch signaling pathway. *Cell Oncol*. (2023).
248. Bottcher M, et al. Control of PD-L1 expression in cll-cells by stromal triggering of the Notch-c-Myc-EZH2 oncogenic signaling axis. *J immunother Cancer*. (2021) 9:e001889.
249. Mansour FA, Al-Mazrou A, Al-Mohanna F. PD-L1 is overexpressed on breast cancer stem cells through notch3/mTOR axis. *Oncoimmunology*. (2020) 9:1729299.
250. Lacalle-Gonzalez C, Florez-Cespedes M, Sanz-Criado L, et al. Dll3 is a prognostic and potentially predictive biomarker for immunotherapy linked to PD/PD-L1 axis and Notch1 in pancreatic cancer. *Biomedicines*. (2023) 11:2812.
251. Marcos Rubio A, Everaert C, Van Damme E, et al. Circulating immune cell dynamics as outcome predictors for immunotherapy in non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer* (2023) 11:e007023.
252. Shi H, Li K, Ni Y, et al. Myeloid-derived suppressor cells: implications in the resistance of malignant tumors to T cell-based immunotherapy. *Front Cell Dev Biol* (2021) 9:707198.
253. Sánchez-León ML, et al. The effects of dendritic cell-based vaccines in the tumor microenvironment: impact on myeloid-derived suppressor cells. *Front Immunol* (2022) 13:1050484.
254. Li X, et al. Targeting myeloid-derived suppressor cells to enhance the antitumor efficacy of immune checkpoint blockade therapy. *Front Immunol* (2021) 12:754196.
255. Huang Y, Shen A. The prediction potential of neutrophil-to-lymphocyte ratio for the therapeutic outcomes of programmed death receptor-1/programmed death ligand 1 inhibitors in non-small cell lung cancer patients: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* (2020) 99(34):e21718.
256. Gu XB, Tian T, Tian XJ, Zhang XJ. Prognostic significance of neutrophil-to-lymphocyte ratio in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Sci Rep* (2015) 5:12493.
257. Faria SS, Fernandes PC Jr, Silva MJ, et al. The neutrophil-to-lymphocyte ratio: a narrative review. *Ecancer medical science* (2016) 10:702.
258. Suh KJ, Kim SH, Kim YJ, et al. Post-treatment neutrophil-to-lymphocyte ratio at week 6 is Prognostic in patients with advanced non-small cell lung cancers treated with anti-PD-1 antibody. *Cancer Immunol Immunother* (2018) 67:459–70.

259. Nakaya A, Kurata T, Yoshioka H, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an early marker of outcomes in patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with Nivolumab. *Int J Clin Oncol* (2018) 23:634–40.
260. Norvel DC. Study types and bias – don't judge a study by the abstract's conclusion alone. *Evid Based Spine Care J* (2010) 1(2):7–10.
261. Yamauchi Y, Safi S, Blattner C, et al. Circulating and Tumor Myeloid-derived Suppressor Cells in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med* (2018) 198(6):777–787.
262. Huang A, Zhang B, et al. Increased CD14 (+) HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* (2013) 62:1439–51.
263. Feng PH, Lee KY, Change YL, et al. CD14 (+) S100A9 (+) monocytic myeloid-derived suppressor cells and their clinical relevance in non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* (2012) 186:1025–36.
264. Diaz-Montero CM, Salem ML, et al. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* (2009) 58:49–59.
265. Liu CY, Wang YM, Wang CL, et al. Population alterations of L-arginase- and inducible nitric oxide synthase-expressed CD11b+/CD14-/CD15+/CD33+ myeloid-derived suppressor cells and CD8T lymphocytes in patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* (2010) 136:34–45.
266. Vetsika EK, Koinis F, Gioulbasani M, et al. A circulating subpopulation of monocytic myeloid-derived suppressor cells as an independent prognostic/predictive factor in untreated non-small lung cancer patients. *J Immunol Res* (2014) 65:92–94.
267. Riemann D, Cwikowski M, Turzes S, et al. Blood immune cell biomarkers in lung cancer. *Clin Exp Immunol* (2019) 195:179–89.
268. Bronte G, Calabrò L, Olivieri F, et al. The prognostic effects of circulating myeloid-derived suppressor cells in non-small cell lung cancer: systematic review and meta-analysis. *Clinical and Experimental Medicine* (2023). 23(5):1551–1561.
269. Mazzaschi G, Facchinetti F, Missale G, et al. The circulating pool of functionally competent NK and CD8+ cells predicts the outcome of anti-PD1 treatment in advanced NSCLC. *Lung Cancer* (2019) 127:153–163.
270. Zhuo M, Chen H, Zhang T, et al. The potential predictive value of circulating immune cell ratio and tumor marker in atezolizumab treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Cancer Biomarkers* (2018) 22:467–476.
271. Koh J, et al. MDSC subtypes and CD39 expression on CD8+ T cells predict the efficacy of anti-PD-1 Immunotherapy in patients with NSCLC. *Eur J Immunol* (2020) 50:1810–9.
272. Bronte G, Petracci E, De Matteis S, et al. High levels of circulating Monocytic myeloid-derived suppressive-like cells are associated with the primary resistance to immune Checkpoint inhibitors in advanced non-small cell lung cancer: an exploratory analysis. *Front Immunol* (2022) 13:866561.
273. Delaunay M, Guibert N, Lusque A, et al. Baseline circulating myeloid-derived suppressor cells and response to PD-1 inhibitor in non-small cell lung cancer patients. 2018 Clinical Immuno-Oncology Symposium.

274. Moller M, Turzer S, et al. Blood immune cell biomarkers in patient with lung cancer undergoing treatment with Checkpoint blockade. *J Immunother* (2020) 43:57–66.
275. Limagne E, Richard C, Thibaudin M, et al. Tim-3/Galectin-9 pathway and mMDSC control primary and secondary resistances to PD-1 blockade in lung cancer patients. *Oncoimmunology* (2019) 8:e1564505.
276. Passaro A, Mancuso P, Gandini S, et al. Gr-MDSC-linked asset as a potential immune biomarker in pretreated NSCLC receiving nivolumab as second-line therapy. *Clin Transl Oncol* (2019) Jun 28.
277. Feng J, Chen S, Li S, et al. The Association Between Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Levels and the Anti-Tumor Efficacy of Anti-PD-1 Therapy in NSCLC Patients. *Transl Oncol* (2020) 13 (12):100865.
278. Youn JI, et al. Peripheral natural killer cells and myeloid-derived Suppressor cells correlate with anti-PD-1 responses in non-small cell lung cancer. *Sci Rep* (2020) 10:9050.
279. Kim HR, et al. The Ratio of peripheral regulatory T cells to lox-1 (+) polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells predicts the early response to anti-PD-1 therapy in patients with non-small cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* (2019) 199:243–246.
280. Mezquita L, Martin P, Auclin E, et al. Circulating immature neutrophils, tumor-associated neutrophils and dNLR for identification of fast-progressors to immunotherapy in advanced NSCLC patients. 2019 World Conference on Lung Cancer. MA 07.01.
281. Mitchell KG, Diao L, Karpinets T, et al. Neutrophil expansion defines an immunoinhibitory peripheral and intratumoral inflammatory milieu in resected non-small cell lung cancer: a descriptive analysis of a prospectively immunoprofiled cohort. *J Immunother Cancer* (2020) 8:e000405.
282. Dwivedi P, Greis KD. Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling in severe congenital neutropenia, chronic neutrophilic leukemia, and related malignancies. *Exp Hematol* (2017) 46:9–20.
283. Wang TT, et al. Tumour-activated neutrophils in gastric cancer foster immune suppression and disease progression through GM-CSF-PD-L1 pathway. *Gut* (2017) 66:1900–11.
284. Tang X, Du P. The clinical use of neutrophil-to-lymphocyte ratio in bladder cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Int J Clin Oncol* (2017) 22(5):817–25.
285. Dumitru CA, Moses K, Trellakis S, et al. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol Immunother* (2012) 61(8):1155–67.
286. Chen MF, Tsai MS, Chen WC, et al. Predictive Value of the pretreatment neutrophil-to-lymphocyte ratio in head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Med* (2018) 7(10):294.
287. Zer A, Sung MR, Walia P, et al. Correlation of neutrophil to lymphocyte ratio and absolute neutrophil count with outcomes with PD-1 axis inhibitors in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Clinical Lung Cancer* (2018) 19:426–34.
288. Sheng IY, Diaz-Montero CM, Rayman P, et al. Blood Myeloid-Derived Suppressor Cells Correlate with Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Overall Survival in Metastatic Urothelial Carcinoma. *Targeted Oncology* (2020) 15:211–220.
289. Kotsakis A *et al.* Prognostic value of circulating regulatory T cell subsets in untreated non-small cell lung cancer patients. *Sci Rep* (2016) 6: 39247.

290. Lukesova E et al. High level of Tregs is a positive prognostic marker in patients with HPV-positive oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Biomed Res Int* (2014) 303929.
291. Correale P et al. Regulatory (FoxP3+) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemoimmunotherapy. *J Immunother* (2010) 33: 435–441.
292. West NR et al. Tumour infiltrating FOXP3 (+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer* (2013) 108:155–162.
293. Wan YY, Flavell RA. “Yin-Yang” functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immunoregulation. *Immunol Rev* (2007) 220: 199-213.
294. Oh SA, Li MO. TGF- β : Guardian of T cell function. *J Immunol* (2013) 191; 3973-3979.
295. Kagamu H, Kitano S, Yamaguchi O, et al. Cd4+ T-cell immunity in the peripheral blood correlates with response to anti-PD-1 therapy. *Cancer Immunol Res* (2020) 8:334–44.
296. Kang DH, Chung C, Sun P, et al. Circulating regulatory T cells predict efficacy and atypical responses in lung cancer patients treated with PD-1/PD-L1 inhibitors. *Cancer Immunol Immunother* (2022) 71:579–88.
297. Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression. A diverse arsenal for a moving target. *Immunology* (2008) 124:13-22.
298. Romano M, Fanelli G, Albany CJ, Giganti G. Past, present, and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity. *Front Immunol* (2019) 10: 43.
299. Zhou X, Yao Z, Yang H, et al. Are immune-related adverse events associated with the efficacy of immune checkpoint inhibitors in patients with cancer? A systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine* (2020) 18:87.
300. Cui J, Bystryń JC. Melanoma and vitiligo are associated with antibody responses to similar antigens on pigment cells. *Arch Dermatol* (1995) 131(3): 314-8.
301. Laubli H, Koelzer VH, Matter MS, et al. The T cell repertoire in tumors overlaps with pulmonary inflammatory lesions in patients treated with checkpoint inhibitors. *Oncoimmunology* (2018) 7(2):e1386362.
302. Liu L, Bai H, Wang C, et al. Efficacy and safety of firstline immunotherapy combinations for advanced NSCLC: A systematic review and network meta-analysis. *J Thorac Oncol* (2021) 16(7):1099-117.
303. O'Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* (2019) 16(3):151-67.
304. Gubin MM, Zhang X, Schuster H, et al. Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens. *Nature*. (2014) 515(7528):577-81.
305. Janghorban M, Xin L, Rosen JM, et al. Notch Signaling as a Regulator of the Tumor Immune Response: To Target or Not To Target? *Front Immunol*. (2018) 9:1649.
306. Kunanopparat A, Hirankarn N, Issara-Amphorn J. The expression profile of Jagged1 and delta-like 4 in hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Allergy Immunol* (2021) 39(1):44–52.
307. Yeh TS, Wu CW, Hsu KW, et al. The activated Notch1 signal pathway is associated with gastric cancer progression through cyclooxygenase-2. *Cancer Res* (2009) 69(12):5039–48.
308. Reedijk M, Odorcic S, Chang L, et al. High level coexpression of JAG1 and NOTCH1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. *Cancer Res* (2005) 65(18):8530–7.

309. Choi JH, Park JT, Davidson B, et al. Jagged-1 and Notch3 juxtacrine loop regulates ovarian tumor growth and adhesion. *Cancer Res* (2008) 68(14):5716-23.
310. Zhang J, Li N, Lu S, et al. The role of Notch ligand Jagged1 in osteosarcoma proliferation, metastasis, and recurrence. *J Orthop Surg Res* (2021) 16(1):226.
311. Lee J, Kim JH. Association of Jagged1 expression with malignancy and prognosis in human pancreatic cancer. *Cell Oncol* 2020;43(5):821–34.
312. Chang WH, Ho BC, Hsiao YJ, et al. JAG1 is associated with poor survival through inducing metastasis in lung cancer. *PLoS One* (2016) 11(3):e0150355.
313. The Cancer Genome Atlas data portal: <http://cis.hku.hk/TISIDB/index.php>.
314. Pancewicz J, Niklinska W, Eljaszewicz A, et al. Anti-Jagged-1 immunotherapy in cancer. *Advances in Medical Sciences* (2022) 67:196–202.
315. Sansone P, Storci G, Tavolari S, et al. IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J Clin Invest* (2007) 117:3988-4002.
316. Xu K, Usary J, et al. Lunatic fringe deficiency cooperates with the Met/caveolin gene amplicon to induce basal-like breast cancer. *Cancer Cell* (2012) 21:626-41.
317. Zhu TS, Costello MA, Talsma CE, et al. Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells. *Cancer Res* (2011) 71:6061-72.
318. Lu J, Ye X, Fan F, et al. Endothelial cells promote the colorectal cancer stem cell phenotype through a soluble form of Jagged-1. *Cancer Cell* (2013) 23:171-85.
319. Wang Z, Li Y, Banerjee S, et al. Down-regulation of Notch-1 and Jagged-1 inhibits prostate cancer cell growth, migration and invasion, and induces apoptosis via inactivation of Akt, mTOR, and NF-kappaB signaling pathways. *J Cell Biochem* (2010) 109:726–36.
320. Cao Z, Ding BS, Guo P, et al. Angiocrine factors deployed by tumor vascular niche induce B cell lymphoma invasiveness and chemoresistance. *Cancer Cell* (2014) 25:350–65.
321. Steg AD, Katre AA, Goodman B, et al. Targeting the notch ligand JAGGED1 in both tumor cells and stroma in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* (2011) 17:5674–85.
322. He J, et al. JAG1 is correlated to suppressive immune microenvironment and predicts immunotherapy resistance in Lung adenocarcinoma. *Front Oncol.* (2023) 13:1091488.
323. Kondo T, Morita R, et al. Notch-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy. *Nat Commun.* (2017) 8:15338.
324. Yang Z, Qi Y, Lai N, et al. Notch1 signaling in melanoma cells promoted tumor-induced immunosuppression via upregulation of TGF-β1. *J Exp Clin Cancer Res.* (2018) 37(1):1–13.
325. Mao L, Zhao ZL, Yu GT, et al. g-Secretase inhibitor reduces immunosuppressive cells and enhances tumour immunity in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* (2018) 142:999–1009.
326. Jaiswal A, Murakami K, Elia A, et al. Therapeutic inhibition of USP9x-mediated Notch signaling in triple-negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2021) 118(38): e2101592118.
327. Huang YH, Cai K, Xu PP, et al. CREBBP/ EP300 mutations promoted tumor progression in diffuse large B-cell lymphoma through altering tumor-associated macrophage polarization via FBXW7-NOTCH-CCL2/CSF1 axis. *Signal Transduct Target Ther.* (2021) 6(1):10.
328. Ikemoto T, Sugimoto K, et al. Clinical role of Notch signaling pathway in intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *J Gastroenterol Hepatol.* (2015) 30:217-22.

329. Yang L, Zhao KL, Qin L, et al. Notch signaling pathway regulates CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-} regulatory T cells and T helper 17 cells function in gastric cancer patients. *Biosci Rep.* (2019) 39(5): BSR20182044.
330. Cui Y, Li Q, Li W, et al. NOTCH3 is a prognostic factor and is correlated with immune tolerance in gastric cancer. *Front Oncol.* (2021) 10:574937.
331. Parmigiani E, Ivanek R, Rolando C, et al. Interferon- γ resistance and immune evasion in glioma develop via Notch-regulated co-evolution of malignant and immune cells. *Dev Cell.* (2022) 57(15):1847–65.e9.
332. Ortiz-Martínez F, Gutiérrez-Aviñó FJ, Sanmartín E, et al. Association of Notch pathway down-regulation with triple negative/Basal-like breast carcinomas and high tumor-infiltrating FOXP3⁺ Tregs. *Exp Mol Pathol.* (2016) 100:460–8.
333. Zhao JL, Ye YC, Gao CC, et al. Notch-mediated lactate metabolism regulates MDSC development through the Hes1/ MCT2/c-Jun axis. *Cell Rep.* 2022;38(10): 110451.
334. Bernardo M, Tolstykh T, Zhang YA, et al. An experimental model of anti-PD-1 resistance exhibits activation of TGF- β and notch pathways and is sensitive to local mrna immunotherapy. *Oncoimmunology.* (2021) 10:1881268.
335. Han S, Xu Y, Chen D, et al. Notch activation defines immune-suppressive subsets of ccRCCs with unfavorable benefits from immunotherapy over VEGFR/mTOR inhibitors. *iScience.* (2023) 27:108290.
336. Wang F, Huang C, Long J, et al. Notch signaling mutations increase intra-tumor chemokine expression and predict response to immunotherapy in colorectal cancer. *BMC Cancer.* (2022) 22:933.
337. Li X, Wang Y, Li X, et al. The impact of notch pathway alteration on tumor microenvironment and clinical survival of immune checkpoint inhibitors in NSCLC. *Front Immunol.* (2021) 12:638763.
338. Mazzotta M, et al. Efficacy of immunotherapy in lung cancer with co-occurring mutations in notch and homologous repair genes. *J Immunother Cancer.* (2020) 8:e000946.
339. Zhang Z, Gu Y, Su X, et al. Co-occurring alteration of notch and DDR pathways serves as novel predictor to efficacious immunotherapy in NSCLC. *Front Oncol.* (2021) 11:659321.
340. Long J, Wang D, Yang X, et al. Identification of notch4 mutation as a response biomarker for immune checkpoint inhibitor therapy. *BMC Med.* (2021) 19:154.
341. Sun X, Xin S, et al. Discovery of notch pathway-related genes for predicting prognosis and tumor microenvironment status in bladder cancer. *Front Genet.* (2022) 13:928778.
342. Meireson A, Devos M, Brochez L. IDO expression in cancer: Different compartment, different functionality? *Front Immunol.* (2020) 11:531491.
343. Munn DH. Blocking IDO activity to enhance anti-tumor immunity. *Front. Biosci.* (2012) 4:734-745.
344. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumorinduced tolerance. *J Clin Invest.* (2007) 117:1147–1154.
345. Holmgaard RB, Zamarin D, Munn DH, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *J Exp Med* (2013) 210:1389-1402.
346. Holmgaard RB, Zamarin D, Li Y, et al. Tumor-Expressed IDO Recruits and Activates MDSCs in a Treg-Dependent Manner. *Cell Reports.* (2015) 13:412-424.

347. Li A, Barsoumian HB, Schoenhals JE, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 inhibition targets anti-PD1-resistant lung tumors by blocking myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Lett.* (2018) 431:54–63.
348. Schafer CC, Wang Y, Hough KP, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase regulates anti-tumor immunity in lung cancer by metabolic reprogramming of immune cells in the tumor microenvironment. *Oncotarget.* (2016) 7:75407–24.
349. Yu J, et al. Noncanonical NF- κ B activation mediates STAT3-stimulated IDO upregulation in myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *J Immunol.* (2014) 193:2574–86.
350. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* (2009) 9:162–174.
351. Okła K, Czerwinka A, Wawruszak A, et al. Clinical relevance and immunosuppressive pattern of circulating and infiltrating subsets of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in epithelial ovarian cancer. *Front Immunol.* (2019) 10:691.
352. Li F, Zhao Y, Wei L, et al. Tumor-infiltrating Treg, MDSC, and IDO expression associated with outcomes of neoadjuvant chemotherapy of breast cancer. *Cancer Biology & Therapy* (2018) 19 (8): 695–705.
353. Chevolet I, Speeckaert R, Schreuer M, et al. Characterization of the in vivo immune network of IDO, tryptophan metabolism, PD-L1, and CTLA-4 in circulating immune cells in melanoma. *Oncol Immunology.* (2015) 4:e982382.
354. Li A, Barsoumian HB, Schoenhals JE, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 inhibition targets anti-PD1-resistant lung tumors by blocking myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Lett.* (2018) 431:54–63.
355. Li H, Bullock K, Gurjao C, et al. Metabolomic adaptations and correlates of survival to immune checkpoint blockade. *Nat Commun.* (2019) 10:1–6.
356. Wang W, Huang L, Jin JY, et al. IDO immune status after chemoradiation may predict survival in lung cancer patients. *Cancer Res.* (2018) 78:809–16.
357. Botticelli A, Cerbelli B, Lionetto L, et al. Can IDO activity predict primary resistance to anti-PD-1 treatment in NSCLC? *J Transl Med.* (2018) 16:219.
358. Spranger S, Koblisch HK, et al. Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8⁺ T cells directly within the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer.* (2014) 2:3.
359. Monjazeb AM, Kent MS, Grossenbacher SK, et al. Blocking indoleamine-2,3-dioxygenase rebound immune suppression boosts antitumor effects of radio-immunotherapy in murine models and spontaneous canine malignancies. *Clin Cancer Res.* (2016) 22:4328–40.
360. Long GV, Dummer R, Hamid O, et al. Epcadostat plus pembrolizumab versus placebo plus pembrolizumab in patients with unresectable or metastatic melanoma (ECHO-301/KEYNOTE-252): a phase 3, randomised, double-blind study. *Lancet Oncol.* (2019) 20:1083–97.
361. Zheng H, Bae Y, Kasimir-Bauer S, et al. Therapeutic antibody targeting tumor- and osteoblastic niche-derived Jagged1 sensitizes bone metastasis to chemotherapy. *Cancer Cell* (2017) 32(6):731–47 e6.
362. Masiero M, Li D, Whiteman P, et al. Development of therapeutic anti-JAGGED1 antibodies for cancer therapy. *Mol Cancer Ther* (2019) 18(11):2030–42.
363. Xue Y, Gao X, Lindsell CE, et al. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet.* (1999) 8:723–30.

- 364. Krebs LT, Shutter JR, Tanigaki K, et al. Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes Dev* (2004) 18:2469-73.
- 365. Steg AD, Katre AA, Goodman B, et al. Targeting the Notch ligand JAGGED1 in both tumor cells and stroma in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* (2011) 17:5674-85.
- 366. Jimeno A, Moore KN, Gordon M, et al. A first-in-human phase 1a study of the bispecific anti-DLL4/anti-VEGF antibody navicixizumab (OMP-305B83) in patients with previously treated solid tumors. *Invest New Drugs* (2019) 37(3):461-72.
- 367. Meng J, Jiang Yz, Zhao S, et al. Tumor-derived Jagged1 promotes cancer progression through immune evasion. *Cell Rep.* 2022; 38(10):110492.
- 368. Tannenbaum CS, Rayman PA, et al. Mediators of inflammation-driven expansion, trafficking, and function of tumor-infiltrating MDSCs. *Cancer Immunol Res* (2019).
- 369. Tesi RJ. MDSC the most important cell you have never heard of. *Trends Pharmacol Sci.* (2019) 40(1):4-7.
- 370. Ma P, Beatty PL, McKolanis J, et al. Circulating myeloid derived suppressor cells that accumulate in premalignancy share phenotypic and functional characteristics with MDSC in cancer. *Front Immunol* (2019) 10:1401.
- 371. Bronte V, Brandau S, Chen SH, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun* (2016) 7: 12150.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Hoja de Información al Paciente (HIP)

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Título: “Estudio prospectivo para explorar la relación entre los niveles de expresión de ligandos de la vía Notch en Células Mieloides Supresoras Circulantes y la respuesta al tratamiento con anticuerpos anti-PD1 en cáncer de pulmón no microcítico avanzado tras progresión a una primera línea basada en platino”.

Versión: 1.0, del 27 de Febrero de 2017

Por favor, lea atentamente esta hoja de información:

El Servicio de Oncología del H. _____, está realizando un estudio promovido por el Grup de Investigació i Divulgació en Oncologia y la Fundación La Fe, en el que le invita a participar.

Nos dirigimos a usted para solicitarle su autorización para participar en este estudio, en el que está previsto incluir un total de 60 pacientes en aproximadamente 6 hospitales de la Comunidad Valenciana que, como en su caso, o bien acuden a consulta o bien permanecen ingresados en Servicios de Oncología de hospitales del ámbito regional por padecer un cáncer de pulmón de células no pequeñas, y para los cuales, a criterio de su médico, la opción terapéutica más adecuada es el tratamiento con un anticuerpo anti-PD1/PD-L1 (Nivolumab, Pembrolizumab, Atezolizumab u otro) para intentar combatir su enfermedad.

La inmunoterapia contra el cáncer se basa en el bloqueo de la capacidad de un tumor para camuflarse del ataque de las células del sistema inmunológico. Esta inmunoterapia se basa en un concepto sencillo: existen una serie de ‘puestos de control’ o ‘checkpoints’ en el sistema inmunológico que son las vías inhibitorias que amortiguan o bloquean la respuesta inmune. Así, las terapias inmunes están diseñadas para bloquear o inhibir estas vías inhibitorias. Por ejemplo, una de estas vías inhibitorias, PD-1, provoca la desinhibición de un tipo de célula inmune llamada célula T, lo que permite atacar y eliminar a las células cancerosas. El bloqueo de este ligando PD-L1 logra respuestas duraderas en pacientes con cáncer de pulmón, piel y riñón, pero es necesario identificar biomarcadores vinculados a una mejor respuesta al tratamiento, algo fundamental porque muchos pacientes no obtienen beneficio del tratamiento.

El estudio pretende describir la posible relación que existe entre las características de su enfermedad y el tratamiento con la combinación de un anticuerpo anti-PD-1/PD-L1 (nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab u otro), para intentar identificar qué futuros pacientes podrían beneficiarse en mayor medida del tratamiento.

Su médico ha considerado que la mejor opción terapéutica para usted, teniendo en cuenta sus características clínicas y personales, es un anticuerpo anti-PD-1/PD-L1. Él/ella le habrá explicado ya las distintas opciones terapéuticas disponibles, así como las potenciales ventajas e inconvenientes de cada una de ellas. Si tiene cualquier duda sobre ellas, por favor, pregunte libremente todas sus dudas.

Debe saber que su participación es voluntaria, por lo que es necesario que antes de su inclusión en el estudio, haya otorgado por escrito su autorización mediante la firma de un consentimiento informado. Podrá retirar su consentimiento para la utilización de sus datos cuando lo desee, sin tener que dar ninguna explicación al equipo de investigación y sin que ello suponga ninguna alteración en la relación con su médico. Además, la atención médica que reciba siempre será la mejor para usted y sólo estará determinada por las características clínicas de su enfermedad y el criterio de su médico, independientemente de que su decisión sea la de participar o no.

Su participación en el estudio consistirá en las visitas habituales a su médico durante las cuales se recogerá la información necesaria para el estudio. También se recogerán algunos datos disponibles en su historia clínica relativos a su enfermedad y su situación clínica. Se registrarán asimismo datos de los análisis que le vayan realizado y se tomarán tres muestras de sangre para analizar algunas sustancias naturales que podrían tener relación con el grado de respuesta al tratamiento. Además, su tumor será analizado para el estudio de factores predictivos de respuesta al tratamiento de su enfermedad. Se analizarán los resultados obtenidos en relación con los datos de su evolución clínica. Se estudiará la relación de los marcadores analizados en su muestra tumoral con la respuesta al tratamiento así como con la evolución de la enfermedad.

La toma de estas muestras se hará coincidir con las extracciones que habitualmente le practican antes de recibir el tratamiento y no supondrán pinchazos adicionales. No existe ningún riesgo médico asociado a su participación en este estudio. Su muestra de tejido tumoral se extrajo durante el diagnóstico de su enfermedad, previamente al inicio de su tratamiento. En todo momento se seguirá la normativa vigente en cuanto a la obtención, conservación y almacenamiento de las muestras obtenidas, así como en el manejo de los datos que se obtengan, de acuerdo a lo establecido en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación Biomédica.

Según la citada ley deberá consentir en la donación de sus muestras biológicas para los posteriores estudios que se realizarán y para ello se le facilitará una Hoja de Consentimiento Informado. Debe saber que podrá retirar dicho consentimiento en cualquier momento sin que pueda verse afectado por ese motivo su derecho a la asistencia sanitaria.

Asimismo debe saber que se le garantizará, en todo momento, la protección de su intimidad y el tratamiento confidencial de los datos personales que resulten de la investigación biomédica conforme a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

En el caso de que sus muestras biológicas sean conservadas deberá ser informado por escrito de las condiciones de conservación, así como de sus futuros usos.

Si como consecuencia de la mencionada investigación se obtuviese información relevante para la salud de los participantes, esta sería puesta en su conocimiento. Debe saber también que los investigadores participantes en esta investigación están

obligados a hacer públicos los resultados de la misma, siguiendo siempre lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y también a informarle si así lo solicita.

Dado que la realización del estudio únicamente consiste en recoger información sobre su estado de salud, su tratamiento y determinaciones analíticas, no hay beneficios específicos relacionados con su participación ni tampoco tendrá un riesgo adicional diferente al que de por sí tiene con su enfermedad, ya que su tratamiento y cuidado no cambiará en modo alguno por motivos relacionados con su participación en el estudio.

Todos los datos que se recogen en el estudio, serán utilizados por los investigadores y el promotor de este estudio con la finalidad comentada anteriormente, serán tratados con total reserva y usted estará identificado mediante un número, no incluyéndose ningún dato que le identifique directamente.

Solamente podrán acceder a los datos de su historia clínica, además de sus médicos, el promotor y sus representantes y las autoridades sanitarias para la realización de inspecciones o auditorias del estudio, pero en ningún caso saldrá del hospital ningún dato que pueda identificarle.

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los participantes se ajustarán a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/1999 de 13 de diciembre. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer el derecho de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

La información sobre usted, identificada exclusivamente mediante un número, será transmitida por su médico y/o colaboradores fuera del centro, al Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, como promotor del estudio, propietario del fichero de datos del estudio y responsable del análisis.

También es importante que sepa que este estudio ha sido sometido al criterio de un Comité Ético de Investigación Clínica, cumple con toda la legislación vigente en España y se realizará de conformidad con los principios establecidos tanto en la Declaración de Helsinki como en las Normas de Buena Práctica Clínica.

Si cualquier momento tiene alguna duda y quiere contactar con el médico responsable del estudio en este centro, Dr. _____, podrá hacerlo en el teléfono _____.

Si está de acuerdo en participar en este estudio, por favor exprese su consentimiento rellenando el documento disponible a continuación.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (POR ESCRITO)

"Estudio prospectivo para explorar la relación entre los niveles de expresión de ligandos de la vía Notch en Células Mieloides Supresoras Circulantes y la respuesta al tratamiento con anticuerpos anti-PD1 en cáncer de pulmón no microcítico avanzado tras progresión a una primera línea basada en platino".

Nombre del Investigador: _____

1. Confirmando:
 - Que he leído y entendido la Hoja de Información al paciente (Versión 1.0, del 27 de Febrero de 2017) que se me ha entregado.
 - He podido hacer las preguntas necesarias acerca del estudio.
 - He recibido suficiente información sobre el estudio.
2. Entiendo que mi participación es voluntaria y puedo retirarme del estudio en cualquier momento, sin dar ninguna explicación y sin que mis cuidados médicos se vean por ello afectados.
3. Comprendo que los datos relacionados con el estudio podrán ser revisados por personal autorizado y por las autoridades competentes para ello y presto mi conformidad.
4. Estoy de acuerdo en que mi médico de familia esté informado de mi participación en este estudio y de cualquier información clínica significativa que surja.
5. Estoy de acuerdo en participar en el estudio.
6. Presto mi conformidad para:
 - la donación de 3 muestras de sangre: SI ☐ // NO ☐
 - la donación de tejido tumoral: SI ☐ // NO ☐

Entiendo la forma en que se recogerán las muestras y comprendo que la donación es voluntaria y que soy libre de retirar el consentimiento para su uso en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que mis cuidados médicos se vean por ello afectados.

7. Estoy de acuerdo en que las muestras que he donado y la información anónima sobre mí se almacenen en el Laboratorio de Biología Molecular, Fundación para la Investigación del Hospital Universitari y Politecnia La Fe de Valencia, y pueda ser usada en un futuro para la investigación sobre el cáncer de pulmón en futuros proyectos.

8. Comprendo que no obtendré ningún provecho financiero si este estudio conduce al desarrollo de un nuevo tratamiento o prueba médica.
9. Comprendo que las futuras investigaciones usando las muestras que he donado puedan incluir investigaciones destinadas a comprender la influencia de marcadores predictores en el cáncer de pulmón y que es poco probable que los resultados de estas investigaciones tengan implicaciones para mí.

Nombre del paciente	Fecha	Firma
Nombre de la persona que ha obtenido el consentimiento (si es diferente al investigador)	Fecha	Firma
Investigador	Fecha	Firma

Distribución: original al investigador y copia al paciente

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (ORAL ANTE TESTIGOS)

"Estudio prospectivo para explorar la relación entre los niveles de expresión de ligandos de la vía Notch en Células Mieloides Supresoras Circulantes y la respuesta al tratamiento con anticuerpos anti-PD1 en cáncer de pulmón no microcítico avanzado tras progresión a una primera línea basada en platino".

Nombre del Investigador: _____

Yo, _____ declaro bajo mi responsabilidad que

1. Confirmo:

- Que ha entendido la Hoja de Información al paciente (Versión 1.0, del 27 de Febrero de 2017) que se le ha leído.
- Ha podido hacer las preguntas necesarias acerca del estudio.
- Ha recibido suficiente información sobre el estudio.

2. Entiende que su participación es voluntaria y puede retirarse del estudio en cualquier momento, sin dar ninguna explicación y sin que sus cuidados médicos se vean por ello afectados.

3. Comprende que los datos relacionados con el estudio podrán ser revisados por personal autorizado y por las autoridades competentes para ello y presta su conformidad.

4. Está de acuerdo en que su médico de familia esté informado de su participación en este estudio y de cualquier información clínica significativa que surja.

5. Está de acuerdo en participar en el estudio.

6. Presta su conformidad para:

- la donación de 3 muestras de sangre: SI ☐ // NO ☐
- la donación de tejido tumoral: SI ☐ // NO ☐

Entiende la forma en que se recogerán las muestras y comprende que la donación es voluntaria y que es libre de retirar el consentimiento para su uso en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que sus cuidados médicos se vean por ello afectados.

7. Está de acuerdo en que las muestras que ha donado y la información anónima sobre él se almacenen en el Laboratorio de Biología Molecular, Fundación para la Investigación del Hospital La Fe de Valencia, y pueda ser usada en un futuro para la investigación sobre el cáncer de pulmón en futuros proyectos.

8. Comprende que no obtendrá ningún provecho financiero si este estudio conduce al desarrollo de un nuevo tratamiento o prueba médica.

9. Comprende que las futuras investigaciones usando las muestras que ha donado puedan incluir investigaciones destinadas a comprender la influencia de marcadores predictores en el cáncer de pulmón y que es poco probable que los resultados de estas investigaciones tengan implicaciones para él.

Nombre del testigo	Fecha	Firma
Nombre de la persona que ha obtenido el consentimiento (si es diferente al investigador)	Fecha	Firma
Investigador	Fecha	Firma

Distribución: original al investigador y copia al paciente

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (DEL REPRESENTANTE)

"Estudio prospectivo para explorar la relación entre los niveles de expresión de ligandos de la vía Notch en Células Mieloides Supresoras Circulantes y la respuesta al tratamiento con anticuerpos anti-PD1 en cáncer de pulmón no microcítico avanzado tras progresión a una primera línea basada en platino".

Nombre del Investigador: _____

Yo, _____ en calidad de _____ que

1. Confirmo:

- Que ha entendido la Hoja de Información al paciente (Versión 1.0, del 27 de Febrero de 2017) que se le ha leído.
- Ha podido hacer las preguntas necesarias acerca del estudio.
- Ha recibido suficiente información sobre el estudio.

2. Entiende que su participación es voluntaria y puede retirarse del estudio en cualquier momento, sin dar ninguna explicación y sin que sus cuidados médicos se vean por ello afectados.

3. Comprende que los datos relacionados con el estudio podrán ser revisados por personal autorizado y por las autoridades competentes para ello y presta su conformidad.

4. Está de acuerdo en que su médico de familia esté informado de su participación en este estudio y de cualquier información clínica significativa que surja.

5. Está de acuerdo en participar en el estudio.

6. Presta su conformidad para:

- la donación de 3 muestras de sangre: SI ☐ // NO ☐
- la donación de tejido tumoral: SI ☐ // NO ☐

Entiende la forma en que se recogerán las muestras y comprende que la donación es voluntaria y que es libre de retirar el consentimiento para su uso en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que sus cuidados médicos se vean por ello afectados.

7. Está de acuerdo en que las muestras que ha donado y la información anónima sobre él se almacenen en el Laboratorio de Biología Molecular, Fundación para la Investigación del Hospital La Fe de Valencia, y pueda ser usada en un futuro para la investigación sobre el cáncer de pulmón en futuros proyectos.

8. Comprende que no obtendrá ningún provecho financiero si este estudio conduce al desarrollo de un nuevo tratamiento o prueba médica.

9. Comprende que las futuras investigaciones usando las muestras que ha donado puedan incluir investigaciones destinadas a comprender la influencia de marcadores predictores en el cáncer de pulmón y que es poco probable que los resultados de estas investigaciones tengan implicaciones para él.

Nombre del representante	Fecha	Firma
Nombre de la persona que ha obtenido el consentimiento (si es diferente al investigador)	Fecha	Firma
Investigador	Fecha	Firma

Distribución: original al investigador y copia al paciente

ANEXO 3. Informe del CEIm Hospital Arnau de Vilanova



INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN con medicamentos

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

CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado, en la sesión ordinaria del día 29 de marzo (acta 03/2017) el estudio EPA-SP, titulado: **"Estudio prospectivo para explorar la relación entre los niveles de expresión de ligandos de la vía Notch en Células Mieloides Supresoras Circulantes y la respuesta al tratamiento con anticuerpos anti-PD1/PD-L1 en cáncer de pulmón no microcítico avanzado tras progresión a una primera línea basada en platino"**

Clasificado por la AEMPS con fecha 03 de marzo de 2017, con código de protocolo: IIS-NIV-2017-01

Versión fecha protocolo: versión 1, de 27 de febrero de 2017

HIP/CI: versión 2, de 20 de febrero de 2017

Investigador Principal: José García Sánchez

Servicio: Oncología

Promotor: Instituto Investigación Sanitaria La Fe.

Y tomando en consideración las siguientes cuestiones:

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

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización del estudio por el **Dr. José García Sánchez**, como investigador principal en el servicio de Oncología del H. Arnau de Vilanova de Valencia

Lo que firmo en Valencia a 29 de marzo de 2017


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



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

Hace constar que:

El Comité tanto en su composición como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con el Real Decreto 1090/2015, y su composición actual es la siguiente:

PRESIDENTE

Andreu Ballester, Juan Carlos — Medico Unidad de Investigación

VICEPRESIDENTE

Parra Gasent, Alberto — Farmacéutico. Atención Primaria

SECRETARIO

Sánchez-Toril López, Fernando — Facultativo especialista en Neumología

VOCALES:

Alonso Gómez, J. Ricardo — Facultativo Atención Primaria. CS Burjassot

Casanoves Laparra, Eloina — Facultativa de la Unidad de Cuidados Intensivos

Dalli Peydró, Ernesto — Facultativo especialista en Cardiología

Domene García, Juan — Gerente del Hospital

Esplugues Mota, Juan Vicente — Facultativo especialista en Farmacología clínica

Garde Noguera, Javier — Facultativo especialista en Oncología

González Jimenez, Mª del Carmen — Diplomada Enfermería

Llombart Cussac, Antonio — Facultativo especialista en Oncología

López Corell, Laura — Licenciada en Derecho.

Monforte Albalat, Alberto — Facultativo especialista en Cir. Gral. y Aparato Digestivo

Moral Baltuille, Mª Desamparados — Facultativa especialista Laboratorio. Analisis Clínicos

Munera Rubio, María José — Técnico en Función Administrativa

Pajín Echevarría, Pablo — Miembro Lego. Unión de Consumidores

Soler Company, Enrique — Farmacéutico Hospital

Ubeda Sansano, Mª Isabel — Pediatra en Atención Primaria. C.S.Eliana

Velasco Pastor, Manuel — Facultativo especialista en Dermatología

Que en dicha reunión del Comité Ético de Investigación Clínica se cumplió el quórum preceptivo legalmente.

Que en el caso de que se evalúe algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador, éste se ausentará de la reunión durante la discusión del proyecto.

Valencia a 29 de marzo de 2017



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



ANEXO 4. Informe del CEIm Hospital La Fe



FPNT-07-14-ED (0)

DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Don Serafín Rodríguez Capellán, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe,

CERTIFICA

Que este Comité, ha evaluado en su sesión de fecha 13 de septiembre de 2017, con acta nº 416, la propuesta del promotor para que se realice el estudio:

Código de protocolo del promotor: IIS-NIV-2017-01

Código de protocolo AEMPS: IIS-NIV-2017-01

Versión/fecha del protocolo: 1.0/ 27 de febrero de 2017

Versión/fecha de la Hoja de Información y consentimiento informado para el paciente: 2/ 20 de febrero de 2017

Título: **"LIGANDOS DE NOTCH EN CELULAS MIELOIDES SUPRESORAS (MDSCS) CIRCULANTES COMO BIOMARCADORES DE RESPUESTA A ANTICUERPOS ANTI-PD-1/PD-L1 EN CANCER DE PULMON NO MICROCITICO (CPNM) AVANZADO."**

Promotor: **DR. JOSÉ GARCÍA SÁNCHEZ. SERVICIO DE ONCOLOGÍA MÉDICA. HOSPITAL ARNAU DE VILANOVA (VALENCIA).**

Que se han evaluado las compensaciones económicas previstas y su posible interferencia con el respeto a los postulados éticos.

Que se cumplen los preceptos éticos formulados en la Orden SAS 3470/2009 y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio.

Y emite un **DICTAMEN FAVORABLE** para la realización de dicho estudio en este centro, en el servicio de **ONCOLOGÍA MÉDICA**, por el/la **Dr./Dra. Oscar José Juan Vidal** como investigador principal.

Que el CEIC, tanto en su composición como en los PNT, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y que su composición actual es la siguiente:

Presidente:

Dra. Adela Cañete Nieto (Oncología Pediátrica)

Vicepresidente - Farmacólogo Clínico:

Dr. Salvador Aliño Pellicer (Catedrático Farmacólogo Clínico)

Secretario- Licenciado en Derecho:

D. Serafín Rodríguez Capellán (Licenciado en derecho-Ajeno profesión sanitaria)

Miembros:

Dr. Luis Almenar Bonet (Cardiología)

Dra. Esther Zorio Grima (Cardiología)

Dr. Marino Blanes Julia (Unidad de Enfermedades Infecciosas)

Dra. Inmaculada Calvo Penadés (Reumatología Pediátrica)

Dr. Bonaventura Casanova Estruch (Neurología)

Dr. José Vicente Castell Ripoll (Hepatología Experimental)

Dr. José Vicente Cervera Zamora (Hematología)

Dra. María José Gómez-Lechón Moliner (Investigadora del Grupo Acreditado en Hepatología Experimental)
 Dra. María Isabel Izquierdo Macian (Neonatología)
 Dr. José López Aldeguer (Enfermedades Infecciosas)
 Dr. Luis Vicente Martínez Dolz (Cardiología)
 Dr. Javier Pemán García (Investigador del Grupo Acreditado multidisciplinar para el estudio de la Infección Grave)
 Dr. Alfredo José Perales Marín (Ginecología y Obstetricia)
 Dra. Paula Ramírez Gallego (UCI)
 Dra. Pilar Sáenz González (Neonatología)
 Dr. Maximo Vento Torres (Neonatología)
 Dra. Begoña Polo Miquel (Gastroenterología y Nutrición Pediátrica)
 Dra. Iratxe Zarragoikotxea Jauregui (Anestesia y Reanimación)
 Dra. Sara Brugger Frigols (Radiodiagnóstico)
 Dra. Eugenia Pareja Ibars (Cirugía General y Aparato Digestivo)
 Dr. Jaime Sanz Caballer (Investigador del Grupo Acreditado en Hematología y Hemoterapia)
 Dra. Pilar Sepúlveda Sanchis (Cardiología)
 Dr. Felipe Querol Fuentes (Hemostasia y Trombosis)
 Dra. Esperanza Ferrer Ferrandiz (Directora Escuela de Enfermería)
 Dra. María Luisa Martínez Triguero (Análisis Clínicos)
 Dra. María Tordera Baviera (Farmacéutica del Hospital)
 Dr. Cesar Diaz Garcia (Reproducción - Miembro de la Comisión de Investigación)
 Dr. Santiago Domingo Del Pozo (Oncología Ginecológica)
 Dr. Enrique Vlosca Herrero (Medicina Física y Rehabilitación)
 Dr. Joaquín Ernesto Hinojosa De Val (Medicina Digestiva - Hospital de Manises)
 Dr. Rafael Botella Estrada (Dermatología)
 Dra. María Angeles Canos Verdecho (Unidad del Dolor)
 Dña. Ana María Vivas Broseta (Directora de Enfermería)
 Dña. María Victoria Paricio Gomez (Enfermería)
 Dr. Oscar José Juan Vidal (Oncología Médica)
 Dr. José María Canelles Gamir (Farmacéutico de Atención Primaria)
 Dr. Jose Ivorra Cortes (Reumatología)
 Dr. Matteo Frasson (Cirugía General y Aparato Digestivo)
 Dr. José Vicente Solanas Prats (Atención Primaria)
 Dr. Oscar Díaz Cambrón (Anestesia y Reanimación)
 Dña. Pilar Robles Villalba (Vicepresidenta de la asociación de Miastenia - Miembro ajeno a la profesión sanitaria)
 Dr. Javier Lluna González (Cirugía Pediátrica - Miembro del Comité de Ética Asistencial)
 Dra. Monica Almiñana Rique (Gerente del Dpto. de Salud Valencia La Fe)
 D. Miguel Ángel Cano Torres (Secretario de ASLEUVAL - Representante de los pacientes)

Lo que firmo en Valencia, a 13 de septiembre de 2017



Fdo.: Serafin Rodriguez Capellan
 Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica

ANEXO 5. Clasificación estudio clínico por la AEMPS

 MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES E IGUALDAD	 am agencia española de medicamentos y productos sanitarios	DEPARTAMENTO DE MEDICAMENTOS DE USO HUMANO
DESTINATARIO:	D. JOSÉ GARCÍA SÁNCHEZ HOSPITAL ARNAU DE VILANOVA SERVICIO DE ONCOLOGÍA MÉDICA C/ SAN CLEMENTE, 12 46015 - VALENCIA	
Fecha: 12 de abril de 2017		
REFERENCIA: ESTUDIO ANTI-PD1		
ASUNTO: NOTIFICACIÓN DE RESOLUCIÓN DE CLASIFICACIÓN DE ESTUDIO CLÍNICO O EPIDEMIOLÓGICO Adjunto se remite resolución de clasificación sobre el estudio titulado "Estudio prospectivo para explorar la relación entre los niveles de expresión de ligandos de la vía Notch en Células Mieloides Supresoras Circulantes y la respuesta al tratamiento con anticuerpos anti- PD1 y anti-PD-L1 en cáncer de pulmón no microcítico avanzado tras progresión a una primera línea basada en platino. ", con código IIS-NIV-2017-01		
CORREO ELECTRÓNICO farmacoepi@semps.es	 MINISTERIO DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES E IGUALDAD REGISTRO AUXILIAR AGENCIA E. DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS SALIDA N. de Registro: 6115 / RG 11295 Fecha: 18/04/2017 13:42:54	C/ CAMPEZO, 1 - EDIFICIO 8 28002 MADRID

ASUNTO: RESOLUCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE CLASIFICACIÓN DE ESTUDIO CLÍNICO O EPIDEMIOLÓGICO

DESTINATARIO: D. JOSÉ GARCÍA SÁNCHEZ

Vista la solicitud formulada con fecha **26 de febrero de 2017**, por **D. JOSÉ GARCÍA SÁNCHEZ**, para la clasificación del estudio titulado **"Estudio prospectivo para explorar la relación entre los niveles de expresión de ligandos de la vía Notch en Células Mieloides Supresoras Circulantes y la respuesta al tratamiento con anticuerpos anti-PD1 y anti-PD-L1 en cáncer de pulmón no microcítico avanzado tras progresión a una primera línea basada en platino."**, con código **IIS-NIV-2017-01**, y cuyo promotor es **INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA LA FE**, se emite resolución a tenor de los siguientes antecedentes.

Con fecha **10 de marzo de 2017**, se emite propuesta de resolución, otorgando un plazo de quince días al solicitante para presentar alegaciones. Transcurrido este plazo, no se han recibido alegaciones.

Por todo ello, el Departamento de Medicamentos de Uso Humano de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), de conformidad con los preceptos aplicables, **⁽¹⁾ RESUELVE** clasificar el estudio citado anteriormente como **"Estudio Posautorización de seguimiento prospectivo (abreviado como EPA-SP)"**.

El promotor del estudio deberá remitir solicitud de autorización del mismo **⁽²⁾** a todas aquellas Comunidades Autónomas en las que se pretenda llevar a cabo, incluyendo la siguiente documentación (una copia en papel y otra en formato electrónico) y enviando una copia de la misma (papel y formato electrónico) a la AEMPS en el momento de la primera solicitud de autorización:

- Carta de presentación dirigida a los responsables de esta materia en la Comunidad Autónoma⁽³⁾ en la que se solicite la autorización del estudio e indique la dirección y contacto del solicitante y la relación de documentos que se incluyen⁽⁴⁾.
- Resolución de la AEMPS sobre la clasificación del estudio
- Protocolo completo, incluidos los anexos, y donde conste el número de pacientes que se pretenden incluir en España, desglosado por Comunidad Autónoma.
- Dictamen favorable del estudio por un CEIC acreditado en España.
- Listado de Centros Sanitarios donde se pretende realizar el estudio, desglosado por Comunidad Autónoma
- Listado de investigadores participantes en la Comunidad Autónoma.
- Si el estudio se pretende realizar en otros países, situación del mismo en éstos
- Documento acreditativo de haber satisfecho las tasas correspondientes, en aquellas CC.AA. donde se exijan.

CORREO ELECTRÓNICO

farmacoepi@aemps.es

C/ CAMPEZO, 1 – EDIFICIO 8
28022 MADRID

El plazo máximo establecido para emitir resolución por parte de cada CC.AA. será de 90 días naturales. Si transcurrido el mismo la CC.AA. no se hubiese pronunciado, se entenderá autorizado el estudio en esa CC.AA.

Contra la presente resolución que pone fin a la vía administrativa podrá interponerse Recurso Potestativo de Reposición, ante la Directora de la Agencia, en el plazo de un mes a contar desde el día siguiente a aquel en que tenga lugar la notificación de la presente resolución. ⁽¹⁾

Madrid, a 12 de abril de 2017

EL JEFE DE DEPARTAMENTO DE
MEDICAMENTOS DE USO HUMANO

César Hernández García



¹ Son de aplicación al presente procedimiento la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas; la Ley 14/2000, de 29 de diciembre, de medidas fiscales, administrativas y de orden social; Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios; Real Decreto 1090/2015, de 4 de diciembre, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos, los Comités de Ética de la Investigación con medicamentos y el Registro Español de Estudios Clínicos; el Real Decreto 1275/2011, de 16 de septiembre, por el que se crea la Agencia estatal "Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios" y se aprueba su estatuto; el Real Decreto 577/2013, de 26 de julio, por el que se regula la farmacovigilancia de medicamentos de uso humano y la Orden SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las directrices sobre estudios posautorización de tipo observacional para medicamentos de uso humano.

² De acuerdo con la Orden SAS/3470/2009, de 16 de diciembre.

³ Directorio disponible en la página web de la AEMPS (<http://www.aemps.es/actividad/irv/Clinica/estudios/Postautorizacion.htm>)

⁴ En el caso de que el promotor no sea quien presente la documentación, se deberá incluir en la misma un documento que indique las responsabilidades delegadas por el promotor a la persona o empresa que actúa en su nombre.

⁵ De conformidad con lo dispuesto en la Ley 39/2015, de 1 de octubre, o Recurso Contencioso-Administrativo ante el Juzgado Central de lo Contencioso-Administrativo de Madrid, en el plazo de dos meses contados desde el día siguiente al de la notificación de la presente resolución, de conformidad con la Ley 29/1998, de 13 de Julio, reguladora de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa, sin perjuicio de poder ejercitar cualquier otro recurso que se estime oportuno. En caso de interponerse recurso de reposición no podrá interponerse recurso contencioso-administrativo hasta la resolución expresa o presunta del primero.

ANEXO 6. Resolución del Comité Autonómico de Estudios Postautorización Observacionales Prospectivos con Medicamentos de la Comunidad Valenciana



Direcció General de Farmàcia i Productes Sanitaris

RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE ESTUDIO POSTAUTORIZACIÓN OBSERVACIONAL PROSPECTIVO CON MEDICAMENTOS

DESTINATARIO: DR. JOSÉ GARCÍA SÁNCHEZ. SERVICIO ONCOLOGÍA MÉDICA HOSPITAL ARNAU VILANOVA

Vista la solicitud formulada por el Dr. José García Sánchez, Servicio de Oncología Médica del hospital Arnau de Vilanova, con domicilio a efectos de notificación hospital Arnau de Vilanova, C/ Sant Climent 12, 46015 Valencia.

ANTECEDENTES

PRIMERO- Con fecha de entrada en la Conselleria de Sanidad Universal y Salud Pública 30 de mayo de 2017 el Dr. José García Sánchez, Servicio de Oncología Médica del hospital Arnau de Vilanova, solicita la autorización para la realización del estudio postautorización observacional titulado *Ligandos de Notch en células mieloides supresoras (MDSCs) circulantes como biomarcadores de respuesta anti-PD-1/PD-L1 en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM avanzado)*, con código: IIS-NIV-2017-01.

SEGUNDO- El Comité Autonómico de Estudios Postautorización Observacionales Prospectivos de Medicamentos de la Comunitat Valenciana (CAEPO) evalúa el citado estudio y emite informe favorable a la Directora General de Farmacia y Productos Sanitarios por no contravenir las directrices establecidas en el artículo 24 del RD. 577/2013, de 26 de julio, del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad por el que se regula la farmacovigilancia de medicamentos de uso humano y el artículo 8 de la Resolución de 16 de julio de 2009, de la Conselleria de Sanitat, de regulación de los procedimientos, documentación y plazos a observar en la presentación y modificaciones en procesos relacionados con los ensayos clínicos y estudios post-autorización observacionales de medicamentos y productos sanitarios en la Comunitat Valenciana.

FUNDAMENTOS DE DERECHO

- 1º- La Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios es competente para autorizar la realización de los estudios postautorización de acuerdo a lo dispuesto en el Decreto 156/2015, de 18 de septiembre, del Consell, por el que se aprueba el Reglamento Orgánico y Funcional de la Conselleria de Sanidad Universal y Salud Pública.
- 2º- RD. 577/2013, de 26 de julio, del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad por el que se regula la farmacovigilancia de medicamentos de uso humano, establece en su artículo 24 que los estudios postautorización deberán tener como finalidad complementar la información obtenida durante el desarrollo clínico de los medicamentos previo a su autorización y queda prohibida la planificación realización o financiación de estudios postautorización con la finalidad de promover la prescripción de los medicamentos.
- 3º- La Orden SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las directrices sobre estudios postautorización de tipo observacional para medicamentos de uso humano.
- 4º- Decreto 73/2009, de 5 de junio, del Consell, por el que se regula la gestión de ensayos clínicos y estudios postautorización observacionales con medicamentos y productos sanitarios.
- 5º- Resolución de 16 de julio de 2009, de la Conselleria de Sanitat, de regulación de los procedimientos, documentación y plazos a observar en la presentación y modificaciones en procesos relacionados con los ensayos clínicos y estudios post-autorización observacionales de medicamentos y productos sanitarios en la Comunitat Valenciana.

Direcció General de Farmàcia i Productes Sanitaris
 De conformidad con ello, la Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios

RESUELVE

1º. **AUTORIZAR** la realización del estudio:

Título: Ligandos de Notch en células mieloides supresoras (MDSCs) circulantes como biomarcadores de respuesta anti-PD-1/PD-L1 en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM avanzado). Protocolo versión 1, de 27 de febrero de 2017. HIP/CI versión 2, de 20 de febrero de 2017.

Código: IIS-NIV-2017-01.

en los centros sanitarios propuestos en la solicitud:

CENTROS	INVESTIGADORES
Hospital Arnau de Vilanova	José García Sánchez Javier Garde Noguera José Ferrando Marco
Hospital Universitario la Fe	Oscar José Juan Vidal Agustín Lahoz Rodríguez
Hospital Doctor Peset	Maria Martín Ureste
Consorcio Hospitalario Provincial Castellón	Alfredo Sánchez Hernández

2º. La realización del estudio en estos centros está condicionada a que el Gerente del Departamento dé el visto bueno para su realización y firme el correspondiente contrato con el promotor.

3º. El promotor deberá comunicar a esta Dirección General la fecha efectiva de comienzo del estudio en cada centro. Asimismo, enviará el informe de seguimiento anual y deberá comunicar cualquier incidencia relevante de forma inmediata. Tras la finalización de la recopilación de los datos, presentará el informe final del estudio antes de doce meses.

Contra esta Resolución, que no pone fin a la vía administrativa, podrá interponerse Recurso de Alzada ante la Secretaría Autonómica de Salud Pública y del Sistema Sanitario Público en el plazo de un mes a contar desde el día siguiente al de la recepción de la presente notificación.

Valencia 26 de junio de 2017

**LA DIRECTORA GENERAL DE FARMACIA
Y PRODUCTOS SANITARIOS**

Patricia Lacruz Gimeno

IX. ACTIVIDADES CIENTÍFICAS RELACIONADAS

BECAS

Beca GIDO Proyecto de Investigación 2017, por el proyecto de investigación titulado: “Ligandos de Notch en Células Mieloides Supresoras circulantes como biomarcadores de respuesta a Anticuerpos anti-PD1/PD-L1 en Cáncer de Pulmón No Microcítico”.



En Valencia, a 27 de febrero de 2017

D. Óscar Juan Vidal, en calidad de Presidente del Grup d'Investigació i Divulgació Oncològica (**GIDO**), con CIF: G98178791 y domicilio fiscal en la C/ Velázquez No 7- 3a. 28001 de Madrid

MANIFIESTA

1. Que GIDO, tiene entre sus **finés de carácter científico**, la promoción del desarrollo de programas específicos de investigación básica y aplicada sobre el cáncer, particularmente estudios epidemiológicos, clínicos y trasnacionales de carácter multidisciplinar, dirigidos a la identificación de factores que tengan importancia patogénica, diagnóstica, terapéutica o pronóstica en el cáncer.
2. Para tal fin ha desarrollado la convocatoria de la **Beca GIDO Proyecto de Investigación 2017**

CERTIFICA

3. Que entre los proyectos de investigación aceptados a optar a dicha beca se encuentra el presentado por el **Dr. José García Sánchez**, médico especialista del servicio de Oncología Médica del Hospital Arnau de Vilanova de Valencia, cuyo título es:

Ligandos de Notch en Células Mieloides Supresoras (MDSCs) Circulantes como biomarcadores de respuesta a Anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 en Cáncer de Pulmón No Microcítico (CPNM).

Lo que pongo en su conocimiento para los efectos oportunos.

Óscar José Juan Vidal
Presidente de GIDO

VII Jornada GIDO
"Cáncer de Pulmón:
del caminar a paso lento
a competir en maratones"



El Comité Científico Evaluador
resuelve por unanimidad
otorgar:

BECA GIDO 2017

Organiza:

GIDO

grup de investigació i divulgació en oncologia

En Valencia a 9 de Marzo de 2017

Fdo. Dr. Oscar Juan Vidal
Presidente de GIDO

PREMIOS

Premio de accesit entre las comunicaciones seleccionadas para exposición oral en la PROFFERED PAPER SESSION, con la comunicación titulada **"NIVELES BASALES DE CÉLULAS SUPRESORAS MIELOIDES INMADURAS CIRCULANTES COMO MARCADORES PREDICTIVOS DE EFICACIA A INMUNOTERAPIA ANTI-PD1/PD-L1 EN CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO AVANZADO"** y número de registro 49 durante el **13th Congress on Lung Cancer** celebrado en Valencia, 21 y 22 de noviembre de 2019.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Autores: José García, Marta Benet, Lourdes Cordon, Marta Piqueras, Verónica Ruiz, Javier Garde, Nuria Piera, María De Julián, Alfredo Sánchez, David Lorente, Óscar Juan, Agustín Lahoz.

Título: Niveles basales de células supresoras mieloides inmaduras circulantes como marcadores predictivos de eficacia a inmunoterapia anti-PD1/PD-L1 en cáncer de pulmón no microcítico avanzado.

Tipo de participación: Comunicación oral.

Congreso: 13th Congress On Lung Cancer. Valencia, 21 y 22 de noviembre de 2019.

Autores: José García Sánchez, Marta Benet Gimenez, Lourdes Cordón, Maria De Julian, Marta Piqueras, Veronica Ruiz, Javier Garde, Nuria Piera, Alfredo Sanchez, David Lorente, Julian Carretero, Oscar Juan-Vidal, Agustin Lahoz.

Título: Baseline circulating myeloid-derived suppressor cells subpopulations, neutrophils/lymphocytes ratio, and response to PD-1/PD-L1 inhibitor in non-small cell lung cancer patients.

Tipo de participación: Póster. Abstract 308497.

Congreso: 2020 ASCO Annual Meeting. Journal of Clinical Oncology 38, no. 15_suppl.
DOI: 10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.e15042

Autores: José García Sánchez, Marta Benet Gimenez, Lourdes Cordón, Maria De Julian, Marta Piqueras, Veronica Ruiz, Javier Garde, Nuria Piera, Alfredo Sanchez, David Lorente, Julian Carretero, Oscar Juan-Vidal, Agustin Lahoz.

Título: Baseline circulating Myeloid-Derived Suppressor Cells correlate with Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Overall Survival in advanced Non-Small Cell Lung Cancer patients treated with Immune Checkpoint Inhibitors.

Tipo de participación: Póster. Abstract #405.

Congreso: European Lung Cancer Congress Virtual 2021.

NIVELES BASALES DE CÉLULAS SUPRESORAS MIELOIDES INMADURAS CIRCULANTES COMO MARCADORES PREDICTIVOS DE EFICACIA A INMUNOTERAPIA ANTI-PD1/PD-L1 EN CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO AVANZADO

José García¹, Marta Benet², Lourdes Cordon³, Marta Piqueras⁴, Verónica Ruiz⁵, Javier García⁶, María Perea⁷, María De Julián⁸, Alfredo Sánchez⁹, David Lorente¹⁰, Óscar Juan¹¹, Agustín Lahoz¹².
¹Servicio de Oncología Médica, Hospital Arce de Valencia, Valencia, España. ²Unidad de Biomarcadores y Medicina de Precisión, IS La Fe, Valencia, España. ³Unidad de Clínica, IS La Fe, Valencia, España. ⁴Servicio de Oncología Médica, Hospital Provincial de Castellón, Castellón, España. ⁵Servicio de Oncología Médica, Hospital Puñonrostre y Universitario La Fe, Valencia, España. ⁶Servicio de Oncología Médica, Hospital Puñonrostre y Universitario La Fe, Valencia, España. ⁷Servicio de Oncología Médica, Hospital Puñonrostre y Universitario La Fe, Valencia, España. ⁸Servicio de Oncología Médica, Hospital Puñonrostre y Universitario La Fe, Valencia, España. ⁹Servicio de Oncología Médica, Hospital Puñonrostre y Universitario La Fe, Valencia, España. ¹⁰Servicio de Oncología Médica, Hospital Puñonrostre y Universitario La Fe, Valencia, España. ¹¹Servicio de Oncología Médica, Hospital Puñonrostre y Universitario La Fe, Valencia, España. ¹²Servicio de Oncología Médica, Hospital Puñonrostre y Universitario La Fe, Valencia, España.

ANTICORPOTIVO: Las Células Supresoras de origen Mielóide (MDSs) ejercen un papel clave en la supresión de la respuesta inmune antitumoral mediada por células T promoviendo la supervivencia y progresión tumoral (Scheidt et al. Nature reviews 2012). Los niveles de MDSs en sangre periférica (SP) podrían correlacionarse con la proporción de MDSs en el microambiente tumoral y comportarse como un biomarcador predictivo de respuesta a los agentes anti-PD1/PD-L1 en cáncer.

OBJETIVO: Explorar si la proporción de las subpoblaciones de MDSs circulantes pretratamiento puede predecir la eficacia de la inmunoterapia con anticuerpos anti-PD1/PD-L1 (ICs) en pacientes con Carcinoma No Microcítico de Pulmón Avanzado (CNMFA).

MATERIALES Y MÉTODOS: Se han obtenido prospectivamente muestras de SP de pacientes con diagnóstico de CNMFA tratados con ICs (nivolumab, pembrolizumab o atezolizumab) tras progresión, al menos, a una línea de quimioterapia basada en platino en 3 centros entre marzo de 2020 y junio de 2020. Se ha analizado el inmunofenotipo de las células mononucleares por citometría de flujo para evaluar la proporción de MDSs circulantes y subpoblaciones (Figura 1). Hemos evaluado si la proporción de MDSs circulantes basales se correlaciona con el tipo de respuesta según criterios RECIST v1.1, supervivencia libre de progresión (SLP), supervivencia global (SG) y tasa de muerte precoz (TMP).

RESULTADOS: Se han incluido 47 pacientes en el estudio. La mediana de edad fue de 62 años (rango 42-79 años), 36 (77%) varones y 11 (23%) mujeres. 29 (62%) pacientes fueron adenocarcinomas. La proporción de PD-L1 fue $> 25\%$ en 24 (51%) (Tabla 1). La mediana de supervivencia fue de 6,4 meses (rango 1,7-21,2 meses). La mediana de SLP y SG fue de 3,3 meses (IQR 0-6,6 IQR 0-10) y no alcanzó significativamente la TMP < 3 meses del 17%. No se encontraron diferencias en los porcentajes totales y subpoblaciones de MDSs basales entre el grupo de respondedores (R) y el grupo de no respondedores (NR) (Test de Wilcoxon, p=0,56, Tabla 1 y Figura 2). No hubo diferencias en los niveles de SLP (p=0,04, Figura 3 A1) ni SG (p=0,1, Figura 3 A2) en función de una proporción de MDSs totales pre-tratamiento alta o baja ($> 4,3\%$ o $< 4,3\%$). Una proporción baja de e-MDSs ($< 22,8\%$) pretratamiento se asoció con una peor SLP (p=0,025, Figura 3 B1, 3 B2) y una mayor TMP (p=0,007, Figura 4). Sin embargo, una proporción baja de PMN-MDSs ($< 44,9\%$) se asoció con una mayor SG (p=0,020, Figura 3 C2).

ASLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MDSs

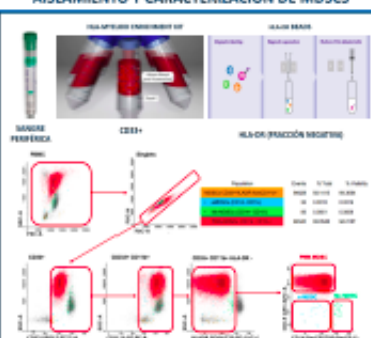


Figura 1. Caracterización de MDSs en SP de pacientes con CNMFA. Evaluación del inmunofenotipo por citometría de flujo del porcentaje de células MDSs en las células PMNCs aisladas de un paciente con CNMFA. Representación en dispersión de las células positivas para CD33 y negativas para CD45 (MDSs). Polimorfismos (PMN-MDSs CD33+), Monoclonales (M-MDSs CD33+) e Inmaduras o adultas (e-MDSs CD33+). Conexión: NEO April 12, 2020

CARACTERÍSTICAS BASALES

Tabla 1. Características clínicas-patológicas (N = 47)	n (%)
Mediana edad, años (rango)	62 (42-79)
Sexo	
Varones	36 (77%)
Mujeres	11 (23%)
Historia de tabaquismo	
Fumador activo o exfumador	44 (94%)
No fumador	3 (7%)
ECOG Performance Basal	
0-1	40 (85%)
2	7 (15%)
Histología	
No adenoma	29 (62%)
Adenoma	17 (36%)
Carcinoma No Microcítico (CNM)	3 (7%)
Supervivencia de PD-L1 por IHC (puntos de corte)	
$> 25\%$	24 (51%)
1-25%	20 (43%)
$< 1\%$	3 (6%)
Disponibilidad	6 (13%)
EF (localizaciones metastásicas pre-ICs)	
0-2	31 (66%)
3-4	16 (34%)
Localizaciones metastásicas pre-ICs	
Pulmón	8 (17%)
Hueso	10 (21%)
Cerebro	9 (19%)
Alteraciones oncogénicas clave	
KRAS	3 (6%)
EGFR	0 (0%)
ALK	3 (6%)
ROS1	3 (6%)
BRAF	3 (6%)
NTRK	3 (6%)
MET	3 (6%)
RET	3 (6%)
FGFR	3 (6%)
HER2	3 (6%)
PIK3CA	3 (6%)
TP53	3 (6%)
PTEN	3 (6%)
SMAD4	3 (6%)
SMAD2	3 (6%)
SMAD3	3 (6%)
SMAD1	3 (6%)
SMAD5	3 (6%)
SMAD6	3 (6%)
SMAD7	3 (6%)
SMAD8	3 (6%)
SMAD9	3 (6%)
SMAD10	3 (6%)
SMAD11	3 (6%)
SMAD12	3 (6%)
SMAD13	3 (6%)
SMAD14	3 (6%)
SMAD15	3 (6%)
SMAD16	3 (6%)
SMAD17	3 (6%)
SMAD18	3 (6%)
SMAD19	3 (6%)
SMAD20	3 (6%)
SMAD21	3 (6%)
SMAD22	3 (6%)
SMAD23	3 (6%)
SMAD24	3 (6%)
SMAD25	3 (6%)
SMAD26	3 (6%)
SMAD27	3 (6%)
SMAD28	3 (6%)
SMAD29	3 (6%)
SMAD30	3 (6%)
SMAD31	3 (6%)
SMAD32	3 (6%)
SMAD33	3 (6%)
SMAD34	3 (6%)
SMAD35	3 (6%)
SMAD36	3 (6%)
SMAD37	3 (6%)
SMAD38	3 (6%)
SMAD39	3 (6%)
SMAD40	3 (6%)
SMAD41	3 (6%)
SMAD42	3 (6%)
SMAD43	3 (6%)
SMAD44	3 (6%)
SMAD45	3 (6%)
SMAD46	3 (6%)
SMAD47	3 (6%)
SMAD48	3 (6%)
SMAD49	3 (6%)
SMAD50	3 (6%)
SMAD51	3 (6%)
SMAD52	3 (6%)
SMAD53	3 (6%)
SMAD54	3 (6%)
SMAD55	3 (6%)
SMAD56	3 (6%)
SMAD57	3 (6%)
SMAD58	3 (6%)
SMAD59	3 (6%)
SMAD60	3 (6%)
SMAD61	3 (6%)
SMAD62	3 (6%)
SMAD63	3 (6%)
SMAD64	3 (6%)
SMAD65	3 (6%)
SMAD66	3 (6%)
SMAD67	3 (6%)
SMAD68	3 (6%)
SMAD69	3 (6%)
SMAD70	3 (6%)
SMAD71	3 (6%)
SMAD72	3 (6%)
SMAD73	3 (6%)
SMAD74	3 (6%)
SMAD75	3 (6%)
SMAD76	3 (6%)
SMAD77	3 (6%)
SMAD78	3 (6%)
SMAD79	3 (6%)
SMAD80	3 (6%)
SMAD81	3 (6%)
SMAD82	3 (6%)
SMAD83	3 (6%)
SMAD84	3 (6%)
SMAD85	3 (6%)
SMAD86	3 (6%)
SMAD87	3 (6%)
SMAD88	3 (6%)
SMAD89	3 (6%)
SMAD90	3 (6%)
SMAD91	3 (6%)
SMAD92	3 (6%)
SMAD93	3 (6%)
SMAD94	3 (6%)
SMAD95	3 (6%)
SMAD96	3 (6%)
SMAD97	3 (6%)
SMAD98	3 (6%)
SMAD99	3 (6%)
SMAD100	3 (6%)

MDSs & TIPO DE RESPUESTA SEGÚN RECIST 1.1

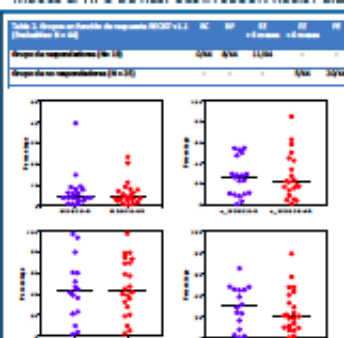
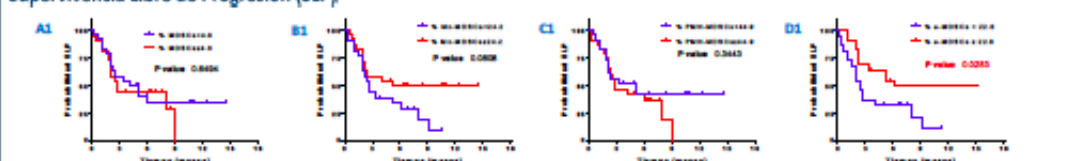


Figura 2. Tipos de respuesta (R) en grupo No Respondedores (NR). Los porcentajes de subpoblaciones de MDSs basales se correlacionan con el tipo de respuesta según criterios RECIST 1.1 (Grupo R: respuesta completa, respuesta parcial o enfermedad estable (RE), > 6 meses en grupo RE; progresión de enfermedad o RE < 6 meses [No Wilcoxon] p = ns).

Supervivencia Libre de Progresión (SLP)



Supervivencia Global (SG)

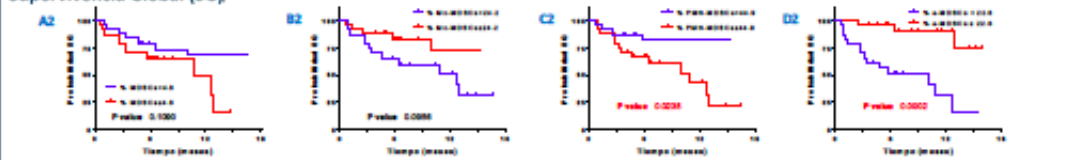


Figura 3. Análisis según test de log-rank de SLP y SG mediante el valor de corte de la mediana del porcentaje de las poblaciones celulares de MDSs totales y de las subpoblaciones M-MDSs, PMN-MDSs y e-MDSs.

Tasa de Muerte Precoz (TMP)



Figura 4. Tasa de Muerte Precoz en subpoblaciones de MDSs y Treg. Análisis de la TMP de los pacientes clasificados según las poblaciones celulares mediante el valor de corte de la mediana. Los pacientes con poblaciones de e-MDSs y Treg circulantes más bajas que el valor de la mediana tienen una mayor TMP (p=0,047 y 0,048, respectivamente).

CONCLUSIONES

- ✓ Nuestro estudio sugiere que la proporción de subpoblaciones de MDSs circulantes pre-tratamiento ICs, especialmente de e-MDSs, pueden identificar a los pacientes con CNMFA con mayor riesgo de progresión y muerte precoz. Rápido progreso: Proporción baja de e-MDSs pre-tratamiento.
- ✓ Se debería estudiar en profundidad el valor de las subpoblaciones de MDSs circulantes como biomarcador predictivo de eficacia a ICs para confirmar estos hallazgos utilizando una cohorte de pacientes más numerosa con un seguimiento más prolongado.
- ✓ Estudio transcriptómico y metabólico sobre MDSs circulantes y en tejido en curso.

Abstract #405
Poster #165



Contact: garcia_jossan@vva.es

Baseline circulating Myeloid-Derived Suppressor Cells correlate with Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and Overall Survival in advanced Non-Small Cell Lung Cancer patients treated with Immune Checkpoint Inhibitors

J. García-Sánchez¹, M. Benet², L. Cordón³, M. Piqueras⁴, J. Garde-Noguer⁵, M. de Julián⁶, L. González-Castillo⁷, D. Lorente⁸, N. Píera⁹, M. Gómez-Soler¹, V. Ruiz², J. Carretero¹, A. Sánchez-Hernández², O. Juan-Vidal¹⁰, A. Lahoz²

¹Department of Medical Oncology, Hospital Arnau de Vilanova, Valencia, Spain; ²Biomarkers and Precision Medicine Unit, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, Spain; ³Cytotoxic Unit, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia, Spain; ⁴Department of Medical Oncology, Hospital Provincial de Castellón, Castellón, Spain; ⁵Department of Medical Oncology, Hospital Universitario Doctor Peset, Valencia, Spain; ⁶Department of Medical Oncology, Hospital Politécnico y Universitario La Fe, Valencia, Spain; ⁷Department of Physiology, Universidad de Valencia, Valencia, Spain.

Background

Immune Checkpoint Inhibitors (ICI) have become a care standard in advanced non-small cell lung cancer (aNSCLC). Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) are potent immunity suppressors and may represent both a potential prognostic and a predictive biomarker^{1,2,3}. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio (NLR) is an inflammatory biomarker with a prognostic role in NSCLC⁴. We hypothesized that MDSC levels correlate with NLR and overall survival (OS) in aNSCLC.

Methods

Pretreatment immunophenotyping of total MDSC (HLA-DR⁺/CD33⁺/CD11b⁺), early-MDSC (e-MDSC: CD14⁺/CD15⁻), monocytic-MDSC (M-MDSC: CD14⁺/CD15⁺) and polymorphonuclear-MDSC (PMN-MDSC: CD14⁻/CD15⁺) was performed by flow cytometry in fresh blood. NLR was collected at baseline. Spearman's rank correlation, univariate and multivariate Cox proportional hazard models were used for data analysis (Graphpad Prism software).

Results

100 patients treated with ICI who received at least one previous platinum based combination chemotherapy for stage II-IV NSCLC and 14 healthy donors were prospectively included; median age 63 years (range 38-80); 93% smokers; 60% non-squamous; 83% ECOG PS 0-1 and 50% PD-L1 $\geq 1\%$ (Table 1). Median follow-up was 9.85 months [n] (4.6-23.57). Median progression free survival (mPFS) and mOS was 2.98 m [95% CI, 0.92-4.85] and 11.83 m [95% CI, 9.46-13.85].

Pretreatment high-NLR, dichotomized at a ROC curve analyses cutoff value ≤ 5.17 , and high level of total MDSC, defined by the median value as a cut-off (26.3%), were correlated with poor PFS (NLR: $p=0.045$ and MDSC: $p=0.036$) and OS (NLR: $p=0.0001$ and MDSC: $p=0.004$). Pretreatment low e-MDSC ($\leq 21.1\%$), were also associated with poor PFS ($p=0.02$) and OS ($p=0.03$) (Figure 1). Both total MDSC (Spearman's $\rho=0.40$, $p<0.0001$) and PMN-MDSC (Spearman's $\rho=0.29$, $p<0.003$) were positively correlated with NLR while e-MDSC (Spearman's $\rho=-0.44$, $p<0.0001$) were negatively correlated (Figure 2). Multivariate analyses confirmed that higher NLR and higher total MDSC levels were independently associated with shorter OS (NLR HR 3.45; $p=0.005$ and total MDSC HR 3.24; $p=0.021$) (Table 2).

Table 1. Summary of patient characteristics

	N=100 (%)
Age (median, range)	63 (38-80)
Gender	
Female	23%
Male	77%
Smoking status	
Smokers	93%
Non-smokers	7%
Histology	
Non-squamous	60%
Squamous	38%
Other	4%
PD-L1 status	
$\leq 1\%$	43%
$\geq 49\%$	38%
$\geq 50\%$	12%
Missing	7%
Driver oncogene alteration	2/10 (2.1%)
Performance status ECOG	
0-1	81%
2	19%
Descriptor M1 prior to immunotherapy	
M0	6%
M1a	23%
M1b	14%
M1c	60%
No metastatic sites	
≤ 2	67%
> 2	33%
Line of immunotherapy	
2 nd line	77%
≥ 3 line	23%
Type of immunotherapy	
Nivolumab	35%
Pembrolizumab	16%
Atezolizumab	49%

Figure 1. Impact on Progression Free Survival and Overall Survival.

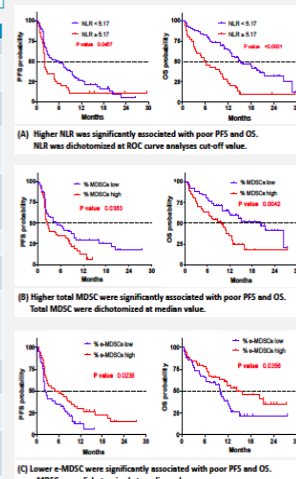


Figure 2. Correlation between NLR and MDSC.

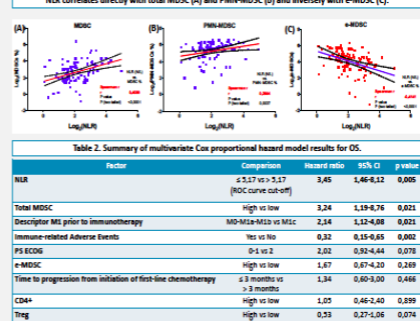


Table 2. Summary of multivariate Cox proportional hazard model results for OS.

Factor	Comparison	Hazard ratio	95% CI	p value
NLR	≤ 5.17 vs > 5.17 (ROC curve cut-off)	3.45	1.46-8.12	0.005
Total MDSC	High vs low	3.24	1.19-9.76	0.021
Descriptor M1 prior to immunotherapy	M0-M1a-M1b vs M1c	2.14	1.12-4.08	0.021
Immune-related Adverse Events	Yes vs No	0.32	0.15-0.65	0.002
PS ECOG	0-1 vs 2	2.02	0.33-12.44	0.376
e-MDSC	High vs low	1.67	0.67-4.20	0.269
Time to progression from initiation of first-line chemotherapy	≤ 3 months vs > 3 months	1.34	0.60-3.00	0.466
CD4+	High vs low	1.02	0.46-2.40	0.989
Thy	High vs low	0.52	0.27-1.06	0.074

Conclusions

Our study suggests that a baseline circulating MDSC correlate with NLR. Higher total MDSC levels and higher NLR were negative prognostic factors. The role of MDSC appears interesting as a potential predictive and prognostic biomarker in NSCLC patients treated with ICI.

References

1. Li J, et al. BMC Cancer 2018; 18:550. 2. Pissone A et al. Clin Ther Oncol 2019; 13:1. 3. Sur J et al. Eur J Immunol 2020; 50:1. 4. Huang Y et al. Medicine 2020; 99:1.

Acknowledgements

The authors would like to thank the patients, their families, all other investigators and all investigational site members involved in this study. The study was financially supported by Roche Pharma, S.A. and Grup de Investigació i Diagnòstic Oncològic.

First Author COI: J. García-Sánchez
Consulting or Advisory Role: Boehringer Ingelheim, Eisai Pharma, Roche, PharmAster, Eisai Europe
Travel, Accommodations, Expenses: Pfizer, Roche, Bristol-Myers Squibb, Merck Sharp & Dohme