



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Factores predictivos de respuesta a inmunoterapia en cáncer colorrectal avanzado con inestabilidad de microsatélites

Tesis doctoral:

Núria Mulet Margalef

Directores:

Dra Elena Élez Fernández

Dr Ramon Salazar Soler

Tutor:

Dr Albert Selva O'Callaghan

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Año 2021



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

2021

**Factores predictivos de respuesta a inmunoterapia
en cáncer colorrectal avanzado con inestabilidad de
microsatélites**

Tesis doctoral presentada para optar al grado de Doctor

Núria Mulet Margalef

Directores de Tesis Doctoral

María Elena Élez Fernández

Ramon Salazar Soler

Tutor de Tesis Doctoral

Albert Selva O'Callaghan

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Agradecimientos

Parece como si existiera en el cerebro una región totalmente específica, que podría denominarse memoria poética y que registrara aquello que nos ha conmovido, encantado, que ha hecho hermosa nuestra vida.

Milan Kundera

El llamado “proyecto hipermutados” se encuentra entre lo que me ha conmovido y encantado a lo largo de la vida. Para mí, ha supuesto la primera oportunidad de llevar a cabo un proyecto desde el principio, y además, de hacerlo de la mano de grandes profesionales que han hecho posible su desarrollo y que han dejado en mí huella en lo profesional y en lo personal. Pero sobre todo, también ha supuesto la oportunidad de tratar pacientes que siguen vivos contra todo pronóstico y de reforzar la idea que, sin investigación, no avanzaremos en esta lucha que todavía nos libra demasiadas batallas difíciles y que, al fin y al cabo es de toda la sociedad.

Desde aquí mi más sincero agradecimiento a los verdaderos protagonistas del proyecto hipermutados: a pacientes y familias, la razón de nuestro hacer; al Grupo de Genómica de VHIO, Ana, Miriam y Francesco; al Grupo de Oncología Molecular de VHIO, Paolo, Jose, Roberta, Garazi y Stefania; al grupo Odyssey, Rodrigo, Fiorella, Raquel y Susana; al Servicio de Anatomía Patológica de Vall d’Hebron, Stefania y Javi; y a la Unidad de Investigación de Terapia Molecular del Cáncer. A todos ellos y al resto del CRC TaskForce de VHIO, GRACIAS, por el trabajo, las ideas y la paciencia. Protagonistas también del proyecto son los compañeros clínicos del grupo de Digestivo de VHIO: Ari, siempre dispuesta con buena cara,

Guillem que por muy lejos que esté, siempre será mi R mayor; Enrique, al cual le agradezco todas sus enseñanzas y su cercana amistad en todo momento; a Giulia, por su soporte incondicional y su estima, y también Alba, José Luís, Javi, Iosune y mi R pequeño Cesc, a los cuales les deseo lo mejor en sus trayectorias, y esperando que pronto defiendan sus tesis. Siguiendo en lo profesional, quiero también agradecer al resto del grupo de Digestivo de VHIO la huella de calidad profesional que han dejado en mí, así como el soporte en momentos laboralmente complicados: Josep, Teresa, Jaume, Maria, Helena y Jorge, y también y de forma muy especial a Ana Oaknin, del grupo de tumores Ginecológicos de VHIO. A mi coR Davis, para mí un ejemplo claro de persecución de sueños y ambiciones, y que ahora están dando sus frutos, y a mis R mayores Víctor, Guillem e Isaac, por cuidarnos en las etapas iniciales de la residencia. Para el Institut Català de Oncologia, mi puesto de trabajo actual, también tengo sinceras palabras. Gracias a todo el equipo de Tumores Digestivos por el compañerismo y por hacerme crecer en el día a día, Cristina, Berta, Merche, Ferran, Gema, Bitó, Àlex, Rosa, Raquel, Elena, Monica; gracias también a la Unidad de Fases 1, en especial a Marc por su confianza y sus ganas, a la Unidad de Tumores Genitourinarios y Sarcomas por facilitarme tanto la llegada al nuevo hospital en su día, en especial a Manuela y Rosó, y a los compañeros del Hospital de Vilafranca, de quienes tan buen recuerdo guardo. No puedo olvidarme de los compañeros del laboratorio de Sarcomas, de quienes aprendí la importancia de la metodología y de dar tiempo personal para la formación de los que empiezan, Santi, Juan, Laura, David y Óscar, ni tampoco del Grupo de Cáncer Colorrectal de IDIBELL,

con los que tengo el placer de empezar a trabajar, Víctor, Mireia, Rebeca y Eli. Y un poquito más atrás en el tiempo, gracias a Fermí Güell y a Jesús Gil, mis profesores de química y física del instituto, por abrir las puertas del laboratorio en Navidad para que pudiera hacer mis humildes experimentos, y por hacerme presentar a recuperación si quería mejor nota. Quizá parecen 2 anécdotas irrelevantes, pero para mí significaron mucho. Gracias también a Joaquim Majó, por sus ganas de enseñar y por guiarme en los primeros pasos dentro del Hospital en el que me he formado como profesional y como persona.

Y en lo personal, en primer lugar agradecer a mis padres, Cinta y Joan, por enseñarme la incondicionalidad y por siempre anteponer mis necesidades a las suyas. A mis abuelos, por hacerme sentir tan querida y, aunque la *iaia Teresina* ahora ya no pueda comprender estas líneas, no me olvido de que me enseñó a leer. A mi marido Uri, compañero de viaje desde hace muchos años y al cual le debo parte de lo que soy hoy, a mis 3 hombrecitos, mis ahijados, Guillem y David, y mi hijo Aniol, por sacar lo mejor de mí y recordarme las cosas verdaderamente importantes. A Mireia, porque aunque hoy lo mires desde arriba, sabes que estoy en esto por ti. Gracias al resto de familia, por crear vínculos tan especiales y que hacen que la distancia en la que nos toca vivir sea más complicada, y gracias a mi familia política, en especial a mis suegros Felipe y Consol, por aceptarme como una más desde el primer día.

Al grupo de amig@s de Benifallet, y en especial a Mària, Laura, Roser, Cris y Sara, por haber tenido la suerte de crecer a su lado, primero como mujer, y ahora como madre. Mencionar también los valores aprendidos

gracias a la Cursa del Pastisset, porque aunque se trate de un proyecto deportivo, la esencia no difiere de la de un proyecto científico. A Clara y Antonio, por su bondad, y por hacerme uno de los regalos más bonitos; a Richard, por llegar siempre tan puntual en horas difíciles; a Xema, por su sensatez y buenos consejos desde el primer día de carrera.

Y finalmente, y no por ello menos importante, gracias a Elena y a Ramon, por confiar este proyecto en mí, por todo lo aprendido a su lado, a nivel científico, personal, de liderazgo en general y en femenino (tan necesario actualmente), y por siempre abrirme la puerta de sus despachos cuando lo he necesitado. Gracias también a Albert Selva, por aceptar ser tutor y por enseñarme las bases de la medicina en la carrera.

Índice de abreviaturas

ACVR2A, del inglés, activin A receptor type 2A.

ALK, del inglés, anaplastic lymphoma kinase.

APC, del inglés, adenomatous polyposis coli.

APOBEC, del inglés, apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like

ARID1A, del inglés, AT-rich interactive domain-containing protein 1A.

ATF3, del inglés, Activating transcription factor 3.

ATP, del inglés, adenosine triphosphate.

B2M, del inglés, Beta-2 microglobulin.

BAF, del inglés, BRG1-associated factors.

Batf3, del inglés, basic leucine zipper transcription factor ATF-like 3.

BAX, del inglés, bcl-2-like protein 4.

BCL2, del inglés, B-cell lymphoma 2.

BRAF, del inglés, v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B.

BRCA, del inglés, breast cancer.

CCL, del inglés, C-C Motif Chemokine Ligand.

CEA, antígeno carcinomaembrionario.

CEACAM, del inglés, carcinoembryonic antigen-related adhesion molecules

CEIC, Comité Ético de Investigación Clínica.

cfDNA, del inglés, circulant free DNA.

CIMP, del inglés, high CpG island methylation phenotype.

CMH, complejo mayor de histocompatibilidad.

CMS, del inglés, Consensus Molecular Subtype.

CPS, del inglés, Composite Positive Score.

CR, del inglés, complete response.

CTCAE, del inglés, Common Toxicity Criteria Adverse Events.

CTLA-4, del inglés, Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4.

CTNNB1, del inglés, Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1.

CXCL, del inglés, C-X-C motif chemokine.

DAMP, del inglés, Damage Associated Molecular Pattern.

DC, del inglés, dendritic cell.

dMMR, del inglés, deficient mismatch repair (determinado por PCR).

DNA, del inglés, deoxyribonucleic acid.

ECOG, del inglés, Eastern Cooperative Oncology Group.

EGFR, del inglés, epidermal growth factor receptor.

EMA, del inglés, European Medicines Agency

ESMO, del inglés, European Society of Medical Oncology.

FDA, de inglés, Food and Drug Administration.

FGFR, del inglés, fibroblast growth factor receptor.

FOLFIRI, 5- flurouracilo + leucovorin + irinotecán.

FOLFOX, 5-flurouracilo + leucovorin + oxaliplatino.

FOXP3, del inglés, forkhead box P3.

GAS-STING, del inglés, GMP-AMS Synthase, Stimulator of Interferon Genes.

HER2, del inglés, human epidermal growth factor receptor 2.

HLA, del inglés, human leukocyte antigen.

HR, del inglés, Hazard Ratio.

IARC, del inglés, International Agency for Research on Cancer.

IC, intervalo de confianza

IDO, del inglés, Indoleamine 2,3-dioxygenase.

IHQ, inmunohistoquímica.

IL, interleuquina

INSR, del inglés, insulín receptor.

irRECIST, del inglés, immune related RECIST criteria.

JAK, del inglés, janus kinase.

KRAS, del inglés, Kirsten rat Sarcoma virus.

LAG-3, del inglés, Lymphocyte-activation gene 3.

MAFG, del inglés, MAF BZIP Transcription Factor G

MAPK, del inglés, mitogen – activated protein kinase.

Mb, megabase.

MDM2, del inglés, mouse double minute 2.

MECOM, del inglés, MDS1 And EVI1 Complex Locus.

MMR, del inglés, mismatch repair.

MS, microsatélites.

MSI-H, del inglés, microsatellite instability high (determinado por PCR)

MSS, del inglés, microsatellite stability (determinado por PCR)

NCCN, del inglés, National Comprehensive Cancer Network.

NDUFC2, del inglés, NADH: Ubiquinone Oxidoreductase Subunit C2.

NGS, del inglés, Next Generation Sequencing.

NLCR5, del inglés, NOD-like receptor family CARD domain containing 5.

NR, del inglés, not reached.

NRAS, del inglés, neuroblastoma RAS viral oncogene homolog.

ns, no estadísticamente significativo.

NTRK, del inglés, Neurotrophic tyrosine kinase.

OS, del inglés, overall survival.

PAMP, del inglés, pathogen associated molecular pattern.

PBAF, del inglés, Polybromo BAF.

PCR, del inglés, polymerase chain reaction.

PFS, del inglés, progression free survival.

PD, del inglés, progression disease.

PD-1, del inglés, Programmed Cell Death protein 1.

PD-L1, del inglés, Programmed Cell Death protein 1 ligand.

PIK3C, del inglés, phosphatidylinositol 3-kinase gene.

pMMR, del inglés, proficient mismatch repair (determinado por PCR)

POLE, polimerasa ϵ .

PR, del inglés, partial response.

PSRC1, del inglés, Proline and Serine Rich Coiled-Coil 1.

PTEN, del inglés, Phosphatase and tensin homolog

RANBP2, del inglés, RAN binding protein 2.

RET, del inglés, Ret Proto-Oncogene.

RFX5, del inglés, regulatory factor X-associated protein.

RNA, del inglés, acid ribonucleic.

RNA-ISH, del inglés, RNA in situ hybridization.

RNF43, del inglés, ring finger protein 43.

ROS, del inglés, Reactive Oxidative Species.

RR, del inglés, response rate.

SD, del inglés, stable disease.

SL, síndrome de Lynch.

SLC23A1, del inglés, Solute Carrier Family 23 Member 1.

SLC4A3, del inglés, Solute Carrier Family 4 Member 3.

SMAD 4, del inglés SMAD family member 4.

SNPs, del inglés, Single Nucleotide Polymorphisms.

STAT, del inglés, signal transducer and activators of transcription.

STING, del inglés, stimulator of interferon genes.

SWI/SNF, del inglés, SWItch/Sucrose Non Fermentable.

TAP, del inglés, transporters associated with antigen processing.

TCGA, del inglés, The Cancer Genome Atlas.

TGFBeta, del inglés, transforming growth factor beta.

TGFBR2, del inglés, transforming growth factor beta.receptor 2.

TIGIT, del inglés, T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains.

TMB, del inglés, tumor mutational burden.

TNM, del inglés, tumor-node-metastases.

TP53, del inglés, tumor protein P53.

VEGF, del inglés, vascular endothelial growth factor.

VHIO, del inglés, Vall d'Hebron Institute of Oncology.

WES, del inglés, Whole Exome Sequencing.

ZBTB2, del inglés, Zinc Finger And BTB Domain Containing 2.

SUMARIO

Resumen	16
Abstract	19
1. Introducción	21
1.1. Epidemiología del cáncer colorrectal.....	21
1.2. Carcinogénesis del cáncer colorrectal.....	21
1.3. Bases biológicas del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR	23
1.3.1. Generalidades del sistema del MMR.....	23
1.3.2. Mecanismos subyacentes al cáncer colorrectal MSI-H/dMMR....	26
1.3.3. Técnicas de detección del fenotipo MSI-H/dMMR.....	28
1.3.4. Alteraciones genómicas del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR.....	30
1.3.5. Transcriptómica y microambiente tumoral del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR.....	33
1.4. Aspectos clínicos del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR	37
1.5. Inmunoterapia en cáncer colorrectal MSI-H/dMMR.....	38
1.5.1. Desarrollo y estudios clínicos	38
1.5.2. Factores relacionados con la respuesta a inmunoterapia en cáncer colorrectal MSI-H/dMMR	45
2. Justificación	49
3. Hipótesis	52
3.1. Hipótesis primaria.....	52
3.2. Hipótesis secundarias	52
4. Objetivos	53
4.1. Objetivo primario	53
4.2. Objetivos secundarios	53

5. Métodos	55
5.1. Tipo de estudio	55
5.2. Selección de la cohorte de estudio y criterios de inclusión.....	55
5.3. Variables clínicas de estudio	56
5.4. Análisis de parámetros genómicos	57
5.5. Análisis bioinformático	59
5.6. Análisis de poblaciones linfocitarias y PD-L1	63
5.7. Análisis de <i>Fusobacterium nucleatum</i>	65
5.8. Análisis del fenotipo MSI-H/dMMR por IHQ y PCR	67
5.9. Análisis estadísticos	68
6. Resultados	72
6.1. Perfil clínico de la cohorte y patrones de beneficio a PD-1/PD-L1 inh	72
6.2. Características de las muestras de estudio	80
6.3. TMB, mutaciones <i>indels</i> y beneficio a PD-1/PD-L1 inh	82
6.4. Perfil genómico de la cohorte y beneficio a PD-1/PD-L1 inh	85
6.5. Densidades linfocitarias, expresión de PD-L1, y beneficio a PD-1/PD- L1 inh.....	89
6.6. <i>Fusobacterium nucleatum</i> y beneficio a PD-1/PD-L1 inh	91
6.7. Discordancias entre IHQ y PCR y beneficio a PD-1/PD-L1 inh	92
6.8. Descripción integrada de resultados	94
7. Discusión	98
7.1. Perfil clínico de la cohorte de estudio y patrones de respuesta a PD- 1/PD-L1 inh	98

7.2. Discusión de TMB, mutaciones <i>indels</i> y beneficio a PD-1/PD-L1 inh.	100
7.3. Discusión del perfil genómico de la cohorte y beneficio a PD-1/PD-L1 inh.	104
7.4. Discusión de densidades linfocitarias, expresión de PD-L1, y beneficio a PD-1/PD-L1 inh.	111
7.5. Discusión de <i>Fusobacterium nucleatum</i> y beneficio a PD-1/PD-L1 inh.	114
7.6. Discusión de las discordancias entre IHQ y PCR y beneficio a PD-1/PD-L1 inh.	116
7.7. Discusión de la descripción integrada de resultados.	119
7.8. Limitaciones del estudio.	125
8. Conclusiones	127
9. Líneas futuras	128
10. Referencias bibliográficas	130
ANEXO 1	142
ANEXO 2	144
ANEXO 3	146

Resumen

Antecedentes del tema. La búsqueda y validación de biomarcadores de respuesta a la inmunoterapia en el cáncer colorrectal avanzado con fenotipo *Microsatellite Instability High / Deficient Mismatch Repair system* (MSI-H/dMMR) constituye uno de los principales retos en el panorama del cáncer colorrectal, en parte justificado por la baja frecuencia de este fenotipo (alrededor del 5% de los tumores avanzados).

Pacientes y métodos. Pacientes con cáncer colorrectal avanzado MSI-H/dMMR tratados con inmunoterapia basada en inhibidores de PD-1/PD-L1 en el Hospital Vall d'Hebron formaron la cohorte de estudio. Según si la supervivencia libre de progresión a inhibidores de PD-1/PD-L1 fue mayor a 6 meses o igual/menor, los pacientes fueron divididos en dos grupos, el grupo IT-respond (n:9 pacientes), y el grupo IT-resist (n: 7 pacientes), respectivamente. Con el objetivo de dilucidar factores predictivos de beneficio a inhibidores de PD-1/PD-L1, se llevó a cabo un análisis exploratorio multimodal que incluyó genómica (secuenciación de nueva generación con un panel de 431 genes para determinar carga mutacional tumoral, mutaciones *frameshift* y patrón de genes mutados), microambiente tumoral (anticuerpos dirigidos a CD3, CD8, FOXP3 y PD-L1) y microbioma en tumor focalizado en *Fusobacterium nucleatum* (técnica RNA *In Situ Hybridization*). En relación a la determinación del fenotipo MSI-H/dMMR, se realizó una revisión central mediante inmunohistoquímica y reacción en cadena de la polimerasa.

Resultados. La carga mutacional tumoral y las mutaciones *frameshift* no se correlacionaron con el beneficio a los inhibidores de PD-1/PD-L1. En el

análisis del microambiente tumoral se constató una mayor densidad de las diferentes subpoblaciones de células T y de expresión de PD-L1 en el grupo IT-respond. Las mutaciones bialélicas en *PTEN* fueron más frecuentes en el grupo IT-resist en comparación con el grupo IT-respond. Las mutaciones bialélicas en *ARID1A* fueron objetivadas exclusivamente en el grupo IT-respond. Los tumores con mutaciones bialélicas en *ARID1A* presentaron la mayor densidad linfocitaria de la cohorte y de PD-L1, al contrario que los tumores con mutaciones en *CTNNB1*, y en *PTEN* bialélicas. Los niveles de *Fusobacterium nucleatum* no se correlacionaron con el beneficio a inhibidores de PD-1/PD-L1. Las discordancias entre técnicas consistentes en un fenotipo MSS según la reacción en cadena de la polimerasa y un fenotipo dMMR según la inmunohistoquímica, se encontraron sólo en el grupo IT-resist, a pesar que toda la cohorte tenía una firma genómica compatible con fenotipo MSI-H/dMMR.

Conclusiones. En el contexto del cáncer colorrectal avanzado con fenotipo MSI-H/dMMR: 1. La carga mutacional tumoral no es un factor predictivo de beneficio a inhibidores de PD-1/PD-L1, a diferencia de la infiltración linfocitaria, aunque son necesarios más estudios; 2. Las mutaciones bialélicas en *ARID1A* se asocian a una marcada infiltración tumoral por células T, al contrario que las mutaciones bialélicas en *PTEN* y la activación de la vía de Wnt a través de mutaciones en *CTNNB1*. Estos hallazgos, que correlacionan con patrones de respuesta a inhibidores de PD-L1/PD-L1, requieren de mayor investigación por su potencial interés; 3. Los niveles de *Fusobacterium nucleatum* tumoral no correlacionan con el beneficio a inhibidores de PD-1/PD-L1, pero son necesarios más estudios

en esta dirección por la base biológica existente; 4. Los resultados discordantes entre técnicas diagnósticas de fenotipo MSI-H/dMMR se asocian a un beneficio limitado a los inhibidores de PD-L1/PD-L1; 5. El desarrollo de biomarcadores sólidos en el campo de la inmunoterapia debe basarse en análisis multimodales representativos de los diferentes *hallmarks* del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR.

Abstract

Background. The search of immunotherapy biomarkers in Microsatellite Instability High / Deficient Mismatch Repair system (MSI-H/dMMR) metastatic colorectal cancer (mCRC) is an unmet need. The low prevalence of this phenotype (around 5% of advanced CRC) partly justifies the challenge.

Patients and methods. Patients with MSI-H/dMMR mCRC treated with PD-1/PD-L1 inhibitors at Vall d'Hebron University Hospital comprised study cohort. According to whether the progression free survival with PD-1/PD-L1 inhibitors was longer to 6 months or equal/shorter, patients were clustered into IT- respond group (*n*: 9 patients) or IT- resist group (*n*: 7 patients), respectively. In order to evaluate determinants of benefit with PD-1/PD-L1 inhibitors, an exploratory multimodal analysis including genomics (through NGS panel tumor-only with 431 genes to determine TMB, frameshift mutations and mutational profile), immune microenvironment (using CD3, CD8, FOXP3 and PD-L1 antibodies), and microbiome focused on *Fusobacterium nucleatum* (RNA-ISH) were performed. Analysis of MSI-H/dMMR phenotype was centrally determined either by immunohistochemistry and polymerase chain reaction.

Results. TMB and frameshift mutations did not correlate with PD-1/PD-L1 inhibitors benefit. Higher densities of T cell populations and PD-L1 expression were observed among IT-respond. Biallelic *PTEN* mutations were more frequent in IT-resist, compared to IT-respond, but biallelic *ARID1A* mutations were exclusively found in IT-respond. Biallelic *ARID1A* mutated tumours had the highest immune infiltration and PD-L1 scores,

contrary to tumours with *CTNNB1* mutation or biallelic *PTEN* mutations. Levels of *Fusobacterium nucleatum* did not correlate with benefit to PD-1/PD-L1 inhibitors. Misdiagnosis of MSI-H/dMMR phenotype consisting of MSS by polymerase chain reaction and dMMR by immunohistochemistry were only found in IT-resist group, although the whole cohort presented a genomic signature of MSI-H/dMMR.

Conclusion. In advanced colorectal cancer MSI-H/dMMR: 1. TMB is not a predictive factor of response to PD-1/PD-L1 inhibitors, contrary to T cell infiltration and PD-L1 expression, although further studies are required; 2. Biallelic *ARID1A* mutations, contrary to biallelic *PTEN* mutations and Wnt signalling activation through *CTNNB1* mutation, associate with high and low T cell immune infiltrates, respectively, and deserve special interest because potential association with PD-1/PD-L1 inhibitors benefit; 3. Levels of *Fusobacterium nucleatum* do not correlate with benefit to PD-1/PD-L1 inhibitors, but further studies are warranted because the biological background; 4. Discordances between techniques regarding the diagnosis of MSI-H/dMMR phenotype associate poor benefit to PD-1/PD-L1 inhibitors; 5. The development of biomarkers in immunotherapy field must rely on multimodal analysis encompassing the different hallmarks of MSI-H/dMMR colorectal cancer.

1. Introducción

1.1. Epidemiología del cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal es uno de los tumores malignos más frecuentes en población adulta, según datos del proyecto GLOBOCAN diseñado por la IARC. En el año 2012, la incidencia del cáncer colorrectal fue de 1.4 millones de casos y 694000 muertes, y estaba entre los 6 tumores malignos que representaban alrededor de la mitad del total. En relación a la distribución por sexos, el cáncer colorrectal supone el tercer cáncer más común en hombres y el segundo en mujeres [1]. Asimismo, se estima que en 2035 el número de nuevos casos en personas mayores de 65 años será el doble que actualmente, tanto en zonas desarrolladas como subdesarrolladas [2]. Entre las causas que motivan el aumento de incidencia se incluyen el tabaco, el consumo de alcohol, la obesidad, la diabetes, el estilo de vida sedentario y las dietas inadecuadas con presencia destacable de carnes rojas y procesados [3].

1.2. Carcinogénesis del cáncer colorrectal

Según el modelo de carcinogénesis del cáncer colorrectal, aproximadamente el 85% de los tumores derivan de una lesión pre-maligna (adenoma), que ha adquirido una mutación inactivadora en el gen supresor tumoral *APC*. A continuación, una mutación en el gen *TP53* media el paso de adenoma a carcinoma inicial y, posteriormente, emergen mutaciones en *KRAS*, *PIK3CA* y en genes involucrados en la vía de *TGF β* como *SMAD4*, u otras alteraciones como la pérdida del cromosoma 18q, hasta

promover el desarrollo de un carcinoma invasivo [4]. En este escenario, llamado *pathway* de inestabilidad cromosómica, las neoplasias presentan un fenotipo MSS/pMMR dado que no asocian alteraciones en los genes pertenecientes al sistema del MMR.

Por otro lado, alrededor del 15% de los cánceres colorrectales localizados asocian un fenotipo llamado mutador o MSI-H/dMMR, y su origen radica en esencia en el mal funcionamiento de genes del sistema del MMR [4]. Dado que el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR supone la base de estudio del presente proyecto, se detallará más información al respecto en apartados posteriores.

Los trabajos seminales en el ámbito de cáncer colorrectal han constatado diferencias entre tumores con fenotipo MSS/pMMR y MSI-H/dMMR. El proyecto TCGA concluyó que los tumores MSI-H/dMMR presentan un elevado TMB, por encima de 12 mutaciones/Mb, a diferencia de los tumores MSS/pMMR [5]. Cabe subrayar que este dintel de TMB fue definido por el propio proyecto TCGA, dado que no existe un valor exacto que *per se* defina a los tumores hipermutados. No obstante, las alteraciones en la vía del MMR no son la única causa de cáncer colorrectal hipermutado, dado que también se puede producir por otras causas intrínsecas como mutaciones en el gen de la polimerasa *POLE*, que ocurren entre el 1-2% de los tumores primarios [5]. En relación a la transcriptómica, en el año 2015 se publicó la Clasificación Molecular de Consenso del cáncer colorrectal, a partir de la cual las neoplasias se pueden dividir en 4 grupos: CMS1 o inmune, CMS2 o canónico, CMS3 o metabólico y CMS4 o mesenquimal, con unas frecuencias respectivas del

14%, 37%, 13% y 23% [6]. Los tumores MSI-H/dMMR pertenecen mayoritariamente al CMS1, al contrario que los MSS/pMMR, que se clasifican dentro del CMS2 y CMS3, con práctica ausencia de infiltrado tumoral linfocitario, o bien dentro del CMS4, que asocia un infiltrado tumoral compuesto por células inmunes y fibroblastos que merman la respuesta inmune antitumoral [7]

1.3. Bases biológicas del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR

1.3.1. Generalidades del sistema del MMR

El sistema del MMR, altamente conservado en organismos procariontas y eucariotas, se encarga de detectar y reparar diferentes tipos de errores por incorporaciones anómalas de bases en la cadena hija durante la síntesis del DNA, y que implican cambios conformacionales [8].

Las proteínas del MMR, que se expresan en el núcleo de forma ubicua, se denominan Mut y las más relevantes en humanos son hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS2, hMSH3 y hMLH3, las cuales actúan formando complejos heterodiméricos. El primer complejo en actuar es el denominado hMutS α , formado por la unión de hMSH2 y hMSH6 (aunque ocasionalmente hMSH2 puede unirse a hMSH3), y es el encargado de reconocer el error. Posteriormente, al complejo hMutS α se le une normalmente el hMutL α , formado por hMLH1 y hPMS2 (y menos frecuentemente el complejo hMutL γ , formado por hMLH1 y hMLH3) que inicia el proceso de reparación. A continuación, la exonucleasa 1, otro miembro del sistema del MMR,

realiza la escisión del error, y una polimerasa resintetiza la cadena de DNA y realiza un apareamiento con la cadena parental [8][9][10] (Figura I1).

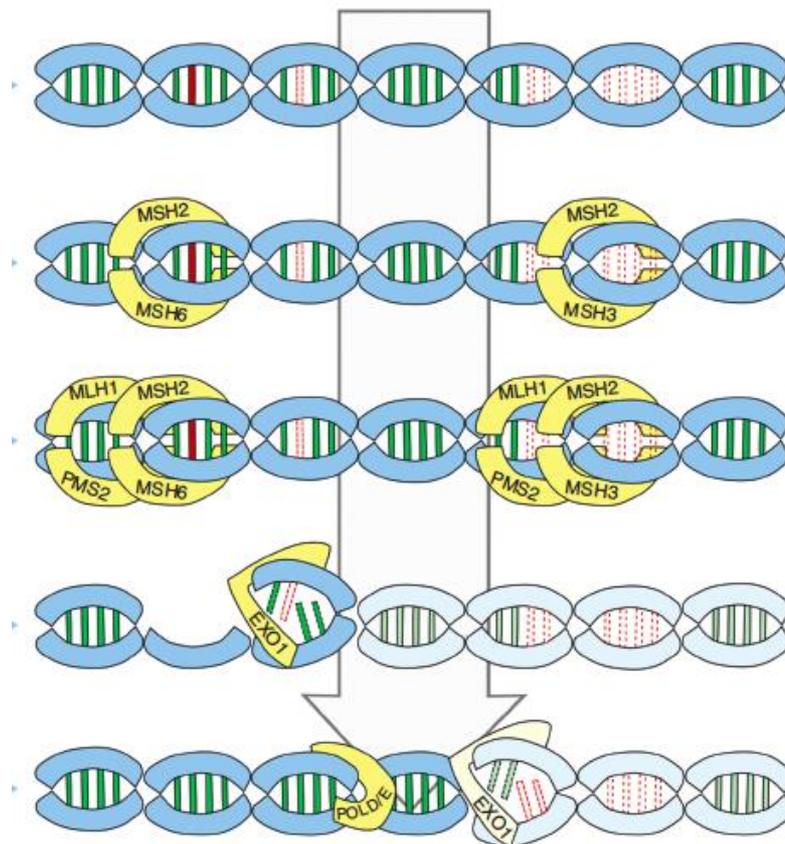


Figura I1. Funcionamiento del sistema del MMR. En rojo, señalados los errores en la cadena de DNA tributarios de ser reparados. Complejo hMutS α (MSH2/MSH6 o MSH3) reconoce el error. Complejo hMutL α (MLH1/PMS2) inicia el proceso de reparación. Exonucleasa 1 realiza la escisión del error. Polimerasa D/E sintetiza de nuevo la cadena de DNA. Adaptado de [9]

Uno de los principales objetivos del sistema del MMR es la reparación de los errores que ocurren en las regiones denominadas MS. Los MS son

repeticiones en tándem de pares de bases, entre 1 y hasta un máximo de 6, que se pueden encontrar tanto en regiones no codificantes, mayoritariamente, como en regiones codificantes del genoma humano. La naturaleza repetitiva de los MS hace que sean regiones del genoma muy propensas a aparearse incorrectamente durante la replicación del DNA por el fenómeno de *slippage replication*. Éste tiene como resultado que la longitud de la cadena originaria y la de nueva síntesis no sea la misma, debido sobre todo a la inserción o pérdida de un número de nucleótidos no múltiple de tres dando lugar a mutaciones *frameshift* o de desplazamiento del marco de lectura en la nueva cadena [11]. El sistema del MMR se encarga de reparar las mutaciones que surgen como resultado del mencionado *slippage*, aunque cuando éste no funciona correctamente, las mutaciones *frameshift* acumuladas en los MS no son reparadas. Un análisis genómico de múltiples neoplasias MSI-H/dMMR observó que la presencia de MS inestables es menor pero no inexistente en exones, en puntos de unión de factores de transcripción y en regiones genómicas conservadas evolutivamente. Esta distribución traduce un mecanismo biológico de protección contra potenciales aberraciones funcionales, aunque es altamente variable entre subtipos tumorales [12]. Cuando los MS inestables se encuentran en regiones exónicas o codificantes, existe una consiguiente alteración del marco de lectura en el momento de la transcripción, originando proteínas truncadas con función anómala [13]. Este hecho implica un crecimiento celular rápido (sobre todo cuando se ven afectados oncogenes o genes supresores tumorales), la activación de factores de transcripción pro-tumorales, la alteración de otras vías de

reparación del DNA (como la recombinación homóloga y no homóloga, y la reparación por escisión de bases) y la inhibición de apoptosis, promoviendo así la carcinogénesis de tumores colorrectales MSI-H/dMMR [13] [14][15].

1.3.2. Mecanismos subyacentes al cáncer colorrectal MSI-H/dMMR

El fenotipo MSI-H/dMMR se puede adquirir vía germinal en el caso de los pacientes afectados de SL, o bien de forma esporádica. Independientemente del origen, se considera un fenotipo neoplásico generalizado, siendo muy frecuente en el carcinoma de endometrio (alrededor del 30% de los casos) y en el adenocarcinoma gástrico (alrededor del 20% de los casos), y menos común aunque descrito, con frecuencias que oscilan entre el 0.5% y el 3% de los casos, en tumores malignos del córtex adrenal, ováricos, pulmonares, renales, pancreáticos, uroteliales, prostáticos, hepatocarcinomas, carcinomas escamosos cervicales, carcinomas mamarios, glioblastomas multiformes y carcinomas de cabeza y cuello, entre otros [9][12].

En relación al cáncer colorrectal, alrededor del 3% de los tumores emergen en pacientes con SL [16] [17] y, en algunos casos, los pacientes presentan un adenoma como lesión pre-maligna si el evento inicial ha sido una mutación esporádica en el gen *APC* y, posteriormente, la inactivación del sistema MMR detallada a continuación es la responsable del resto de proceso de carcinogénesis [18]. El SL es causado por una mutación germinal en uno de los 2 alelos de los genes pertenecientes al sistema MMR, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*, a la que posteriormente se añade una

mutación esporádica o *second hit* en el otro alelo adquirida a lo largo de la vida del individuo, dando lugar al fenotipo MSI-H/dMMR. No obstante, el riesgo de desarrollar el fenotipo MSI-H/dMMR es mayor cuando la mutación germinal ocurre en *MLH1* o *MSH2*, y es menor cuando ocurre en *MSH6* o *PMS2* [18]. Este hecho es debido a que las mutaciones en *MLH1* o *MSH2* resultan en la degradación de todas las proteínas del heterodímero, es decir, MLH1 y PMS2, o MSH2 y MSH6; pero cuando las mutaciones ocurren en *MSH6* o *PMS2* su función puede ser sustituida por MSH3 y por PMS1 y MLH3, respectivamente [9]. Asimismo, el sexo, la edad, el antecedente de neoplasias y el estilo de vida, también son factores que intervienen en el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal en pacientes con SL, que suele aparecer alrededor de los 40 años [18]. Existe también el síndrome constitucional o bialélico del MMR, que se caracteriza porque los pacientes heredan los 2 alelos mutados de alguno de los genes del MMR, de manera que ambos alelos están inactivados en todos los tejidos. Es una entidad muy poco frecuente, con un fenotipo clínico de aparición temprana que incluye la presencia de manchas café con leche, hipopigmentación cutánea, neurofibromas y tumores malignos sólidos y hematológicos [19][20].

La genómica de los tumores colorrectales en pacientes con SL es compleja y ha sido relativamente poco estudiada, pero datos recientes apuntan a que estos tumores se podrían dividir en 2 grupos: grupo 1 (G1), con características similares a los tumores colorrectales MSI-H/dMMR esporádicos, y grupo 2 (G2), que remedan a los tumores MSS/pMMR. Los tumores del grupo G1 presentan mayor número de mutaciones *frameshift*

que los del grupo G2, probablemente debido a un perfil mutacional ligeramente distinto, con mayor presencia de mutaciones en *POLE*. Desde el punto de vista de la expresión génica, ambos grupos presentan una elevada expresión de genes relacionados con la proliferación, pero el G1 presenta mayor expresión de los relacionados con procesos inflamatorios y metabolismo [21].

En contraposición al SL, el mecanismo que con mayor frecuencia causa el fenotipo MSI-H/dMMR en el cáncer colorrectal es la hipermetilación esporádica bialélica de las islas CpG del promotor de *MLH1*, causando la inactivación del gen y la ausencia de su expresión proteica [22]. En estos casos, la lesión precursora es el adenoma serrado y la mayoría de ellos son tumores con un fenotipo CIMP^{high} [23]. No obstante, se han descrito también casos esporádicos en los que se ha constatado tanto hipermetilación del promotor *MLH1* y mutación adquirida en *MSH2*, dando lugar a la pérdida de expresión de las 4 proteínas principales del sistema MMR [24]. Otro mecanismo esporádico descrito más recientemente en tumores MSI-H/dMMR sin asociación a SL ni a eventos epigenéticos, es la adquisición de mutaciones somáticas bialélicas en los genes del MMR [25].

1.3.3. Técnicas de detección del fenotipo MSI-H/dMMR

Clásicamente, la determinación del fenotipo MSI-H/dMMR se ha realizado bien mediante el análisis de la expresión por IHQ de las 4 proteínas principales del sistema del MMR, o bien mediante biología molecular por PCR determinando la inestabilidad de ciertos MS en comparación con el tejido normal. Existen diferentes paneles de MS para el análisis mediante

PCR, pero los más utilizados son dos que estudian cinco MS. Concretamente, uno de ellos analiza dos mononucleótidos (*BAT-25* y *BAT-26*) y tres dinucleótidos (*D5S346*, *D2S123*, *D17S250*), y el otro, recomendado por la ESMO por tener mayor sensibilidad y especificidad, analiza 5 poly-A mononucleótidos (*BAT-25*, *BAT-26*, *NR-21*, *NR-24* y *NR-27*) [26]. Pese a dichas diferencias, ambos definen el fenotipo MSI-H si existe una pérdida de estabilidad en mínimo dos de los cinco MS estudiados, es decir, una alteración de su longitud en comparación con la que presentan en el tejido normal. La información que aportan la PCR y la IHQ es diferente. Por un lado, la PCR sólo permite diagnosticar el fenotipo MSI-H o con elevada inestabilidad de MS, mientras que la IHQ permite también conocer cuál o cuáles proteínas del sistema MMR han perdido su función, definiendo así una deficiencia del sistema MMR. En relación a la sensibilidad de las técnicas, el uso de ambas alcanza un porcentaje de detección de fenotipo MSI-H/dMMR del 100%, aunque la PCR es más sensible que la IHQ, sobre todo en los casos esporádicos en los que el porcentaje de detección es mayor al 90%, mientras que la IHQ detecta alrededor del 88% de ellos [27].

Recientemente, la ESMO ha publicado una recomendación que sostiene la determinación del fenotipo MSI-H/dMMR mediante el análisis de las 4 proteínas principales del sistema MMR, definiendo el fenotipo dMMR cuando existe pérdida de expresión nuclear de 2 de ellas. Si existen dudas de interpretación o bien sólo se evidencia pérdida de una de las proteínas, la indicación es realizar una PCR, dado que pérdidas de expresión de PMS2 y MSH6 objetivadas por IHQ podrían corresponder a variantes

somáticas de dichos genes sin repercusión funcional [26]. Asimismo, las técnicas de NGS emergen también como otra potencial estrategia de diagnóstico de fenotipo MSI-H/dMMR y, algunas de ellas como *MSI/sensor*, son combinadas con la bioinformática [28][29]. De momento, son herramientas que deben utilizarse para casos seleccionados y en centros expertos [26].

En relación a las muestras tumorales utilizadas para el análisis del fenotipo MSI-H/dMMR, la del tumor primario es la de elección, aunque se estima una concordancia de entorno al 80% en relación al diagnóstico del mencionado fenotipo entre muestras de tumor primario y metástasis [30].

Es importante destacar que, tras un diagnóstico de cáncer colorrectal MSI-H/dMMR, los pacientes deben ser derivados a una unidad de consejo genético para estudio de un potencial SL.

1.3.4. Alteraciones genómicas del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR

El estudio del perfil mutacional en el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR asocia la complejidad derivada del estado de hipermutabilidad, es decir, que la elevada presencia de mutaciones por el mal funcionamiento de uno de los sistemas de reparación del DNA dificulta el hecho de discernir las que son *drivers* o patogénicas, de las que son *passenger* [31]. Aún así, los análisis genómicos de secuenciación masiva han dilucidado cuáles son los genes más frecuentemente mutados en esta población con implicación funcional, en parte por la presencia de MS en sus zonas codificantes vulnerables a mutaciones *frameshift*. Algunos de estos genes presentan

mutaciones ya en estadios muy iniciales del desarrollo tumoral, pero con diferencias sustanciales en comparación con el cáncer colorrectal MSS/pMMR. Por ejemplo, la frecuencia de mutaciones en *TP53* es del 20% versus el 60%, y en *APC* del 51% versus el 81%, en cáncer colorrectal MSI-H/dMMR y MSS/pMMR, respectivamente [5]. Entre los genes potencialmente mutados en fase de adenoma previo al desarrollo del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR, se encuentran algunos relacionados con la vía del *TGF β* , como *ACVR2A* y *TGFBR2*, con la vía de Wnt, como *Axin2*, genes de la familia *BCL2* que codifican para proteínas anti-apoptóticas, como *BAX*, y genes relacionados con el metabolismo, como *NDUFC2*, *SLC4A3* y *SLC23A1* [32]. La mutación V600E del gen *BRAF* y las mutaciones en *KRAS* son de las más frecuentes en estadios avanzados de la carcinogénesis del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR, y se encuentran en aproximadamente el 30% de los casos [5][33]. Es importante destacar que la mutación V600E del gen *BRAF* es exclusiva del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR esporádico, y por tanto excluyente con la presencia de SL. De hecho, datos pre-clínicos postulan la mutación de *BRAF* como generadora del fenotipo MSI-H/dMMR mediante la activación de la vía de MAPK, que a su vez induce la elevación de los niveles de MAFK, un represor transcripcional que se une al promotor de *MLH1* y recluta a una metiltransferasa, resultando en su hipermetilación [34]. Otros genes mutados descritos en el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR son *ZBTB2*, inductor de MDM2, la proteína reguladora negativa de p53 que promueve su degradación y bloquea su efecto reparador del DNA; *RANBP2*, que tiene un rol de supresor tumoral; *PSRC1*, que también media la inhibición de

p53; *MECOM* que codifica un regulador transcripcional de hematopoiesis, apoptosis y proliferación, y *RNF43*, que codifica una proteína de la vía de Wnt [35][36]. Los genes relacionados con el proceso de presentación antigénica también son *targets* frecuentes de mutaciones en dichos tumores, por ejemplo, *NLRC5* y *RFX5*, involucrados en la regulación transcripcional del CMH tipo I, *TAP 1* y *TAP 2*, involucrados en el procesamiento antigénico, y *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C* y *B2M*, involucrados en la presentación *per se* del antígeno [37]. Finalmente, los genes que codifican para subunidades de complejos reguladores epigenéticos, como el complejo SWI/SNF, también presentan una mayor incidencia de mutaciones en los tumores MSI-H/dMMR, en comparación con los MSS/pMMR [38].

Recientemente, se han publicado diferentes series que constatan una elevada presencia de fusiones de quinasas en los tumores colorrectales MSI-H/dMMR esporádicos por hipermetilación de *MLH1* y *KRAS / BRAF* nativos [39][40][41]. Dichas fusiones, presentes entre el 40-55% de los casos con las condiciones moleculares mencionadas, incluyen mayoritariamente a los genes *NTRK*, *BRAF*, *RET*, *FGFR*, *ROS1*, *INSR* y *ALK*, y asocian un peor pronóstico. Asimismo, se postula que estas fusiones podrían inducir una hipermetilación de las islas CpG, de forma similar a las mutaciones de *BRAF* [39][40][41] .

En relación al tipo de mutaciones, los tumores MSI-H/dMMR asocian con mayor frecuencia que los tumores MSS/pMMR mutaciones *frameshift* por los motivos expuestos en el apartado 1.3.1, pero es importante destacar que estas mutaciones son altamente inmunogénicas. Los resultados de un

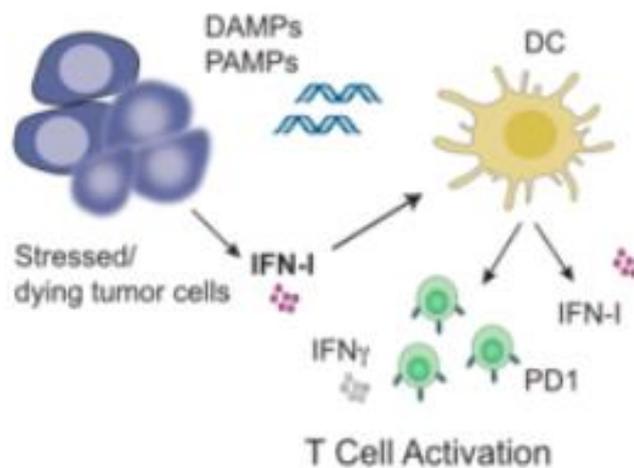
estudio *in silico* utilizando los datos de secuenciación de exomas en 19 tipos tumorales procedentes del TCGA, objetivaron que las mutaciones *frameshift* generaban casi 3 veces más de neoantígenos capaces de ser reconocidos por células T, en comparación con otras mutaciones no sinónimas [42].

1.3.5. Transcriptómica y microambiente tumoral del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR

Tal y como se ha comentado en el apartado 1.2., la mayoría de los tumores colorrectales MSI-H/dMMR pertenecen al subgrupo CMS1 o inmune de la Clasificación Molecular de Consenso, aunque hasta un tercio pueden ser clasificados dentro del CMS3 o metabólico [6]. El subgrupo CMS1 es el que presenta una mayor expresión de los genes involucrados en la respuesta inmune antitumoral. Ejemplos de ello son los genes relacionados con la presentación antigénica, genes que codifican quemoquinas que atraen linfocitos T, como CXCL9 y CXCL10, genes relacionados con el fenotipo T *helper* 1 y también genes relacionados con la señalización mediante interferón γ [43][44]. Según datos pre-clínicos en líneas celulares de cáncer colorrectal MSI-H/dMMR, dichos tumores son particularmente sensibles a la señalización a través de interferón γ [45], un paso esencial para el control tumoral por parte del sistema inmunitario, tal y como se describe de forma esquemática en la Tabla I2.

<p>-Interferón tipo I –activación de células T. Las células tumorales segregan interferones tipo I (grupo que engloba principalmente a los interferones α y β),</p>

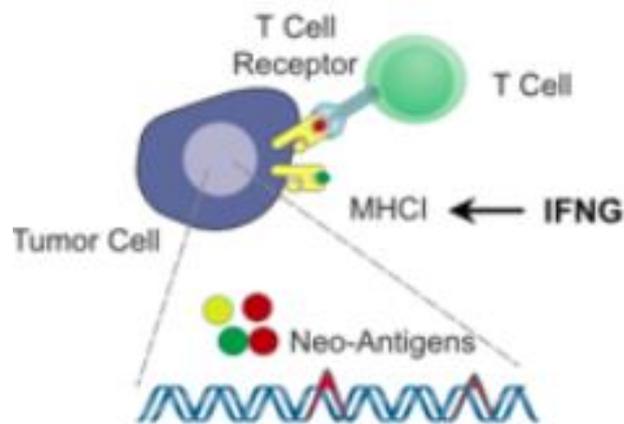
induciendo el reclutamiento de células dendríticas (también macrófagos, linfocitos B, entre otras) que interiorizan DNA derivado de células tumorales, el cual activa los receptores citosólicos de la vía de cGAS/STING que, a su vez, también activan la producción de interferón tipo I para aumentar más el reclutamiento de células dendríticas (particularmente el subgrupo Batf3+). Dichas células dendríticas ya maduras, migran al ganglio linfático con el fin de realizar la presentación del antígeno tumoral a los linfocitos T CD8⁺, que se convierten en linfocitos T con citotoxicidad específica de antígeno . Las quemoquinas CXCL9 y CXCL10 promueven el reclutamiento de más linfocitos T CD8⁺ en este escenario [46].



- **Interferón y –respuesta inmune antitumoral.** Una vez activos, los linfocitos CD8⁺ migran al microambiente tumoral, donde reconocen en las células tumorales los antígenos presentados previamente por las células dendríticas, y tratan de eliminarlas por los mecanismos efector. Este proceso, genera la producción de interferón y por parte de los linfocitos, el cual promueve en el tumor la expresión de genes relevantes en la respuesta inmune antitumoral como interferón y receptor, *JAK1*, *JAK2* y *STAT*. Estos genes están involucrados en el procesamiento antigénico mediante la degradación del mismo en el proteasoma y su transporte mediante la proteína TAP, su presentación mediante el CMH en la

membrana de la célula tumoral, en la producción de quemoquinas que reclutan más células T y en la inducción de apoptosis tumoral [47].

Es importante destacar que el subgrupo T *helper* 1 de linfocitos CD4⁺, diferenciado a partir de la producción local de IL-12, también produce interferón y con el fin de mantener la citotoxicidad de los linfocitos CD8⁺. Asimismo, también activan las células presentadoras de antígenos y pueden inducir la muerte directa de células tumorales a través de citoquinas que activan receptores de superficie de muerte celular [48].



- **Interferón γ – respuesta adaptativa tumoral.** La señalización de través de Interferón γ también induce una modulación tumoral y del microambiente que inhibe la respuesta inmune antitumoral. Se caracteriza por la expresión tumoral de PD-L1 y de otros *immune checkpoints* que inhiben la función citotóxica linfocitaria, y por el reclutamiento de linfocitos T reguladores, con acciones inmunosupresoras [49].

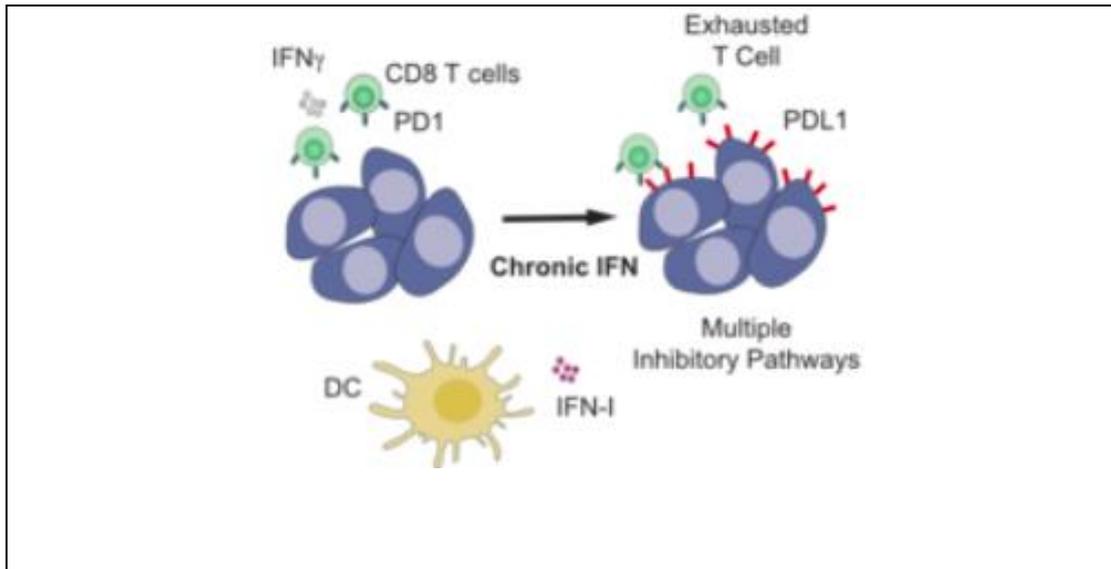


Tabla I2. Puntos clave de la señalización mediante el sistema de interferones. Imágenes adaptadas de [50]

En relación al microambiente tumoral, el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR presenta una elevada infiltración de linfocitos T citotóxicos en el centro tumoral y en el margen invasivo, de células *Natural Killer*, de linfocitos con fenotipo T *helper* 1 y 2 y de macrófagos tipo 1, es decir, asocia un inmunoma con células del sistema inmune innato y adaptativo favorecedor de una respuesta inmune antitumoral [43][51][52]. Asimismo, la densidad de la infiltración de linfocitos T citotóxicos se ha correlacionado con el número de mutaciones *frameshift*, lo que traduce que los linfocitos son capaces de reconocer los neoantígenos derivados que se generan con elevada frecuencia en estos tumores [53]. Los factores descritos implican, por tanto, que los tumores MSI-H/dMMR son neoplasias expuestas a una mayor inmunovigilancia y, teóricamente, las células tumorales pueden ser eliminadas con mayor facilidad por el sistema inmune. No obstante, el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR es también un ejemplo de resistencia

adaptativa, dado que para contrarrestar dicha inmunovigilancia presenta una elevada expresión de *immune checkpoints* o moléculas reguladoras negativas de la respuesta inmune antitumoral por parte de células tumorales, de estirpe inmune y del estroma, como por ejemplo IDO-1, CTLA-4, PD-1, PD-L1 y LAG-3, entre otras [54][55]. También se ha postulado que estos tumores pueden presentar mayor secreción de citoquinas pro-tumorales y infiltración por linfocitos T reguladores, cuya función es principalmente inmunosupresora, aunque depende de la regulación epigenética del factor FOXP3 [56].

El microambiente tumoral de los tumores colorrectales asociados a SL puede ser diferente según si corresponden al grupo G1 o al grupo G2, mencionados en el apartado 1.3.2. En la mucosa distal a los tumores G1 se ha evidenciado una elevada infiltración inmune por linfocitos T CD4⁺ y la expresión de *immune checkpoints*, a diferencia de los tumores G2, que presentan un entorno tumoral menos inmunogénico. De estos hallazgos parte la premisa que los tumores G1 se acaban desarrollando por mecanismos de escape a la respuesta inmune antitumoral [21].

1.4. Aspectos clínicos del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR

El fenotipo MSI-H/dMMR se objetiva en aproximadamente un 5% del cáncer colorrectal avanzado, siendo más frecuente en tumores de colon derecho [5] [6] [57]. Se postula también como un potencial factor pronóstico negativo por la coexistencia de mutaciones en *BRAF V600E*, aunque en

enfermedad localizada es un factor relacionado con mejor supervivencia [58]. En relación al tratamiento, todavía no se ha descrito un algoritmo específico de manejo del cáncer colorrectal avanzado MSI-H/dMMR, si bien las guías clínicas recomiendan la determinación de dicho fenotipo [59] [60]. Las últimas guías ESMO publicadas en 2016, especifican el fenotipo MSI-H/dMMR como un biomarcador de respuesta a inmunoterapia, pero en el algoritmo de tratamiento de la enfermedad avanzada no se detalla como una población molecular a parte, a diferencia de la población *RAS* mutada, *RAS* nativa, y *BRAF* mutada [59]. Las guías NCCN, en cambio, plantean nivolumab combinado o no con ipilimumab y pembrolizumab, como una opción alternativa a los esquemas clásicos en base a los estudios que se detallarán en el apartado 1.5., aunque considerando que, en primera línea de enfermedad avanzada, los datos son aún limitados [60].

1.5. Inmunoterapia en cáncer colorrectal MSI-H/dMMR

1.5.1. Desarrollo y estudios clínicos

Los primeros estudios fase 1 y fase 2 que evaluaron los anticuerpos anti-PD-1 / anti- PD-L1 y anti-CTLA4 en cáncer colorrectal avanzado en población no seleccionada y pre-tratada no demostraron ningún beneficio en RR, tal y como se muestra la tabla I3 [61][62][63].

REF	Droga	Fase	N	RR
[61]	BMS-936559 (anti-PD-L1)	1	18	0%

[62]	NIVOLUMAB (anti-PD-1)	1	19	0%
[63]	TREMELIMUMAB (anti-CTLA4)	2	47	0%

Tabla I3. Primeros estudios que evaluaron la inmunoterapia en cáncer colorrectal avanzado. N: número de pacientes. Ref: referencia.

Sin embargo, en el estudio que evaluaba nivolumab se obtuvo una respuesta completa prolongada en un paciente, cuyo tumor presentaba un fenotipo MSI-H/dMMR [62]. Esta observación y el mayor conocimiento de la biología molecular de los tumores MSI-H/dMMR expuesta en los apartados anteriores, condujeron al diseño de estudios específicos para esta población de cáncer colorrectal, los cuales se detallan a continuación.

El KEYNOTE-016 es un estudio fase II americano con 3 cohortes de pacientes, cáncer colorrectal MSI-H/dMMR (10 pacientes), cáncer colorrectal MSS/pMMR (18 pacientes) y cáncer no colorrectal MSI-H/dMMR (7 pacientes) [64]. La RR y la PFS a 20 semanas siguiendo los criterios irRECIST [65] fueron los dos objetivos primarios. Todos los participantes habían progresado a al menos una línea previa de tratamiento sistémico y fueron tratados con pembrolizumab a dosis de 10 mg/kg cada 2 semanas. En la cohorte de cáncer colorrectal MSI-H/dMMR, el 45% de los pacientes habían recibido más de 4 líneas previas. Pese a ello, la RR fue del 40% tanto por criterios irRECIST (objetivo primario) como RECIST [66], y las medianas de PFS y de OS no fueron alcanzadas. Una actualización del

estudio a 24 meses y con 28 pacientes, demostró una PFS del 61% y una OS del 66%. Los eventos adversos grado 3 o 4 más frecuentes fueron la anemia (17% de pacientes) y la linfopenia (20% de pacientes). En la cohorte de cáncer colorrectal MSS/pMMR, pembrolizumab no demostró actividad [64]. Posteriormente, el mismo equipo investigador amplió el estudio con el mismo esquema de tratamiento hasta un máximo de 2 años con 86 pacientes afectados de 12 tipos histológicos tumorales diferentes con fenotipo MSI-H/dMMR, los cuales habían recibido mínimo una línea de tratamiento para enfermedad avanzada. La RR según los criterios RECIST [67] no difirió entre la de los tumores colorrectales y la de los no colorrectales (52% vs 54%, respectivamente), y se obtuvo una tasa global de respuestas completas del 21%. Las medianas de PFS y OS no fueron alcanzadas, con una estimación de probabilidad de PFS a 2 años del 53% y de OS del 64% [67]. Este estudio fue uno de los más destacados en contribuir en la primera aprobación *tissue/site-agnostic* por parte de la FDA en mayo del 2017. Concretamente, dicha aprobación fue para tumores adultos o pediátricos irresecables o metastásicos, con fenotipo MSI-H o dMMR, en progresión a tratamientos previos y sin otras alternativas de tratamiento, incluyendo cáncer colorrectal MSI-H o dMMR, en progresión a oxaliplatino, fluoropirimidinas e irinotecán.

El CHECKMATE-142 es un ensayo fase II con tres cohortes para pacientes con cáncer colorrectal avanzado MSI-H/dMMR. Dos de ellas incluyeron población previamente tratada, una evaluó nivolumab a dosis de 3 mg/kg cada 2 semanas, y la otra evaluó nivolumab a dosis 3 mg/kg más ipilimumab a dosis de 1 mg/kg cada 3 semanas x 4 dosis, seguido de

nivolumab 3 mg/kg cada 2 semanas. La tercera cohorte incluyó pacientes no tratados previamente, los cuales recibieron nivolumab a dosis de 3 mg/kg cada 2 semanas, más ipilimumab a dosis de 1 mg/kg cada 6 semanas. En las 3 cohortes, los fármacos fueron administrados hasta progresión y/o toxicidad inaceptable, y el objetivo primario fue la RR a criterio investigador, de acuerdo con los criterios RECIST v1.1. [68][69][70]. La cohorte de nivolumab en monoterapia incluyó 74 pacientes, el 54% de los cuales habían recibido 3 terapias previas o más. La RR a criterio investigador fue del 31%, con una mediana de PFS de 14.3 meses, sin llegar a alcanzar la mediana de OS, y con un perfil de toxicidad aceptable, siendo el incremento de amilasa y lipasa los efectos secundarios grado 3/4 más frecuentes [68]. En la primera cohorte de combinación se incluyeron 119 pacientes, el 40% de los cuales había recibido un mínimo de tres tratamientos previos. La RR fue del 54%, siendo respuestas completas un 3% de ellas. Ni la mediana de PFS ni de OS fueron alcanzadas, y un 13% de los pacientes discontinuaron el tratamiento por toxicidad, aunque sin afectar el beneficio del tratamiento [69]. En base a los resultados del estudio CHECKMATE-142, la FDA aprobó nivolumab en julio de 2017 para pacientes de 12 años o más con cáncer colorrectal metastásico con fenotipo MSI-H o dMMR en progresión a oxaliplatino, fluoropirimidinas e irinotecán, y en julio de 2018 la combinación de nivolumab e ipilimumab para la misma indicación.

El estudio KEYNOTE-164 es un estudio fase II que evaluó pembrolizumab a dosis de 200 mg cada 3 semanas hasta un máximo de 35 ciclos en 2 cohortes de pacientes con cáncer colorrectal con fenotipo MSI-H/dMMR:

cohorte A, que incluyó pacientes que habían recibido mínimo 2 líneas previas de tratamiento sistémico, y cohorte B, que incluyó pacientes que habían recibido mínimo 1 línea de tratamiento. El objetivo primario fue la RR según los criterios RECIST v1.1 [66] y tras revisión radiológica central. La RR en la cohorte A fue del 33%, incluyendo un 3% de respuestas completas, y en la cohorte B también del 33%, aunque la tasa de respuestas completas fue del 8%. Pese a que las comparaciones entre ambas cohortes son indirectas, cabe destacar que en la cohorte B un 38% de pacientes había recibido sólo una línea de tratamiento para enfermedad avanzada, lo que podría explicar la mayor tasa de respuestas completas. La mediana de PFS para la cohorte A fue de 2.3 meses, para la cohorte B de 4.1 meses, la mediana de OS para la cohorte A fue de 31.4 meses y no se alcanzó para la cohorte B. En relación a la toxicidad, la tasa de efectos adversos inmunomediados que dieron lugar a discontinuación de tratamiento fueron del 2% y 3% en la cohorte A y B, respectivamente, destacando los eventos de pancreatitis, hepatitis, colitis, neumonitis y toxicidad cutánea [71].

La inmunoterapia en el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR también se ha evaluado en primera línea de enfermedad metastásica, y en este sentido, uno de los estudios más relevantes es el KEYNOTE-177 [72]. Dicho estudio es el primer estudio fase III randomizado del cual se disponen resultados en población MSI-H/dMMR, y cuyos objetivos primarios fueron la PFS y la OS. 307 pacientes se aleatorizaron a recibir quimioterapia a elección del investigador o bien pembrolizumab 200 mg cada 3 semanas hasta un máximo de 35 ciclos. El *crossover* a pembrolizumab estaba

permitido en aquellos pacientes que habían progresado según los criterios RECIST v1.1 tras ser randomizados a recibir quimioterapia. El estudio se consideró positivo dado que la PFS fue superior en el brazo de pembrolizumab en comparación con el brazo de quimioterapia (16.5 meses versus 8.2 meses, HR, 0.6; intervalo de confianza del 95% 0.45 – 0.80; $p=0.0002$). La tasa de respuestas de acuerdo a los criterios RECIST v1.1 también fue superior en el brazo de pembrolizumab (43.8%, el 11.1% de ellas completas, *versus* el 33.1%, el 1.9% de ellas completas, en el brazo de quimioterapia), y el 83% de los pacientes mantenían la respuesta a 24 meses, en contraposición al 35% de los enfermos que respondieron a quimioterapia. Los datos de OS no se han presentado todavía, pero recientemente se comunicaron los resultados de PFS2, es decir, la PFS a la siguiente línea de tratamiento. Pembrolizumab, en comparación con el tratamiento estándar hasta el momento, también demostró una reducción en el riesgo de progresión al siguiente tratamiento del 37% [73]. En relación a la seguridad, los eventos adversos relacionados con los tratamientos grado 3 o mayor favorecieron el brazo de inmunoterapia (22% versus 66%), así como los análisis de calidad de vida [74]. En base a los resultados del estudio KEYNOTE-177, la FDA y la EMA han aprobado pembrolizumab para la primera línea de tratamiento de los pacientes con cáncer colorrectal avanzado con fenotipo MSI-H o dMMR, en junio 2020 y en diciembre 2020, respectivamente.

En relación a la cohorte de pacientes no tratados previamente del estudio CHECKMATE-142, se incluyeron un total de 45, obteniendo una RR del 70%, con un 13% de respuestas completas y, en la última actualización de

resultados, las medianas de PFS y de OS no fueron alcanzadas tras 29 meses de mediana de seguimiento [75]. La tasa de PFS a 24 meses fue del 74%, la de OS a 24 meses del 79%, y la tasa de discontinuación por efectos secundarios grado 3 / 4 fue del 7% [70] [75].

La actividad de la inmunoterapia en el contexto neoadyuvante fue analizada en el estudio NICHE, en el cual 20 pacientes con cáncer colorrectal MSI-H/dMMR localizado se trataron con 1 dosis de ipilimumab a 1 mg/kg y 2 dosis de nivolumab 3 mg/kg previo a la cirugía. Todos los pacientes presentaron una respuesta patológica, 12 de ellos completa y el resto con menos de un 10% de tumor viable residual [76].

Los ensayos clínicos que están actualmente en desarrollo para población afecta de cáncer colorrectal MSI-H/dMMR, se encuentran resumidos en la Tabla I4 [77].

ESTUDIO	DISEÑO	INDICACIÓN	BRAZOS
NCT04008030	Fase III	1ª línea/sucesivas	Nivolumab Nivolumab+ Ipilimumab Tratamiento estándar
NCT02997228	Fase III	1ª línea	Atezolizumab Atezolizumab+Bevacizumab +FOLFOX
NCT02912559	Fase III	Adyuvancia	Atezolizumab Atezolizumab+FOLFOX
NCT03827044	Fase III	Adyuvancia	Avelumab + quimioterapia Quimioterapia
NCT03638297	Fase II	2ª línea/sucesivas	Anti-PD-1 +Aspirina

NCT03104439	Fase II	2ª línea/sucesivas	Nivolumab+Ipilimumab+RT
NCT02060188	Fase II	2ª línea sucesivas	Nivolumab Nivolumab+Ipilimumab Nivolumab+anti-LAG3
NCT03186326	Fase II	2ª línea	Avelumab Tratamiento estándar

Tabla I4. Ensayos clínicos en desarrollo para cáncer colorrectal MSI-H/dMMR

1.5.2. Factores relacionados con la respuesta a inmunoterapia en cáncer colorrectal MSI-H/dMMR

Hasta la fecha, no se ha validado ningún biomarcador de sensibilidad/resistencia a inmunoterapia en el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR, pese a que los diferentes estudios han explorado diversos factores potencialmente implicados con el beneficio a la misma. Desde un punto de vista clínico, el estudio KEYNOTE-016 objetivó que el beneficio a pembrolizumab era independiente del tiempo de evolución de la enfermedad metastásica, y también de la PFS que hubieran presentado los pacientes a regímenes previos. En cambio, si que correlacionó una mayor reducción del CEA tras la primera dosis de fármaco con una mejor PFS y OS [64]. Asimismo, en la cohorte de nivolumab del estudio CHECKMATE - 142 se observó que un descenso mayor de CEA se asociaba a mejor control de la enfermedad a las 12 semanas [68]. La influencia del SL en la respuesta a la inmunoterapia se evaluó en las cohortes para pacientes

refractarios del estudio CHECKMATE-142 [68][69] y también en el estudio de pembrolizumab para diferentes histologías MSI-H/dMMR, sin apreciar diferencias significativas entre los portadores o no de dicho síndrome [67]. La edad de los pacientes, el estado general según ECOG o la administración previa de quimioterapia adyuvante tampoco fueron factores relacionados con la respuesta a nivolumab e ipilimumab en la cohorte de primera línea del CHECKMATE-142 [70]. En el estudio KEYNOTE-177, pembrolizumab en comparación con el brazo estándar presentó mayor beneficio en términos de PFS independientemente de la edad, del sexo, del estado general según ECOG, de la procedencia geográfica, de si el paciente había debutado con estadio IV o se trataba de una recurrencia, y de la localización del tumor primario [72].

En relación a las mutaciones clásicas del cáncer colorrectal, el beneficio a nivolumab +/- ipilimumab en ambas cohortes del estudio CHECKMATE-142 para pacientes previamente tratados fue independiente del estatus de *KRAS* y *BRAF* [68][69], y tampoco se observaron patrones de beneficio a inmunoterapia destacables según el estatus mutacional de dichos genes en el estudio KEYNOTE-164 [71]. En la cohorte de primera línea de tratamiento del estudio CHECKMATE-142, las respuestas objetivadas tanto en pacientes con tumores *RAS/BRAF* nativos como en *RAS/BRAF* mutados fueron consistentes con el global de la cohorte [70]. No obstante, en el estudio KEYNOTE-177, los resultados del brazo de tratamiento estándar fueron mejores en relación a PFS en población *KRAS / NRAS* mutada. Dicha población estaba formada por 74 pacientes del total de 307, pero no se dispone de los datos del perfil mutacional de *RAS/BRAF* en el

34% de pacientes randomizados en el brazo de pembrolizumab, hecho que podría influir en la magnitud del beneficio de dicha droga en los tumores *RAS* mutados, aunque su beneficio fue mayor que el de la quimioterapia en los pacientes *BRAF V600E* mutados [72]. Es importante destacar de cara a su interpretación que la información reportada acerca de variables clínicas y de perfil mutacional y su relación con el beneficio a inmunoterapia en los diferentes estudios deriva de análisis de subgrupos.

Desde un punto de vista traslacional, se han descrito diferentes factores relacionados con la genómica, la epigenómica, la proteómica, la transcriptómica, la regulación de la función inmune y, más recientemente, con el microbioma (entendido como los genes codificados por bacterias, y otros microorganismos que habitan en el huésped humano [78]), y que definen la inmunogenicidad tumoral, así como la capacidad del paciente de emitir una respuesta inmune dirigida, y por tanto pueden estar también involucrados en la respuesta a la inmunoterapia [79] (Figura I5). La evidencia científica acerca de dichos factores en cáncer colorrectal MSI-H/dMMR en el momento del diseño del estudio y los argumentos científicos que motivaron el mismo, se detallan en el apartado 2.

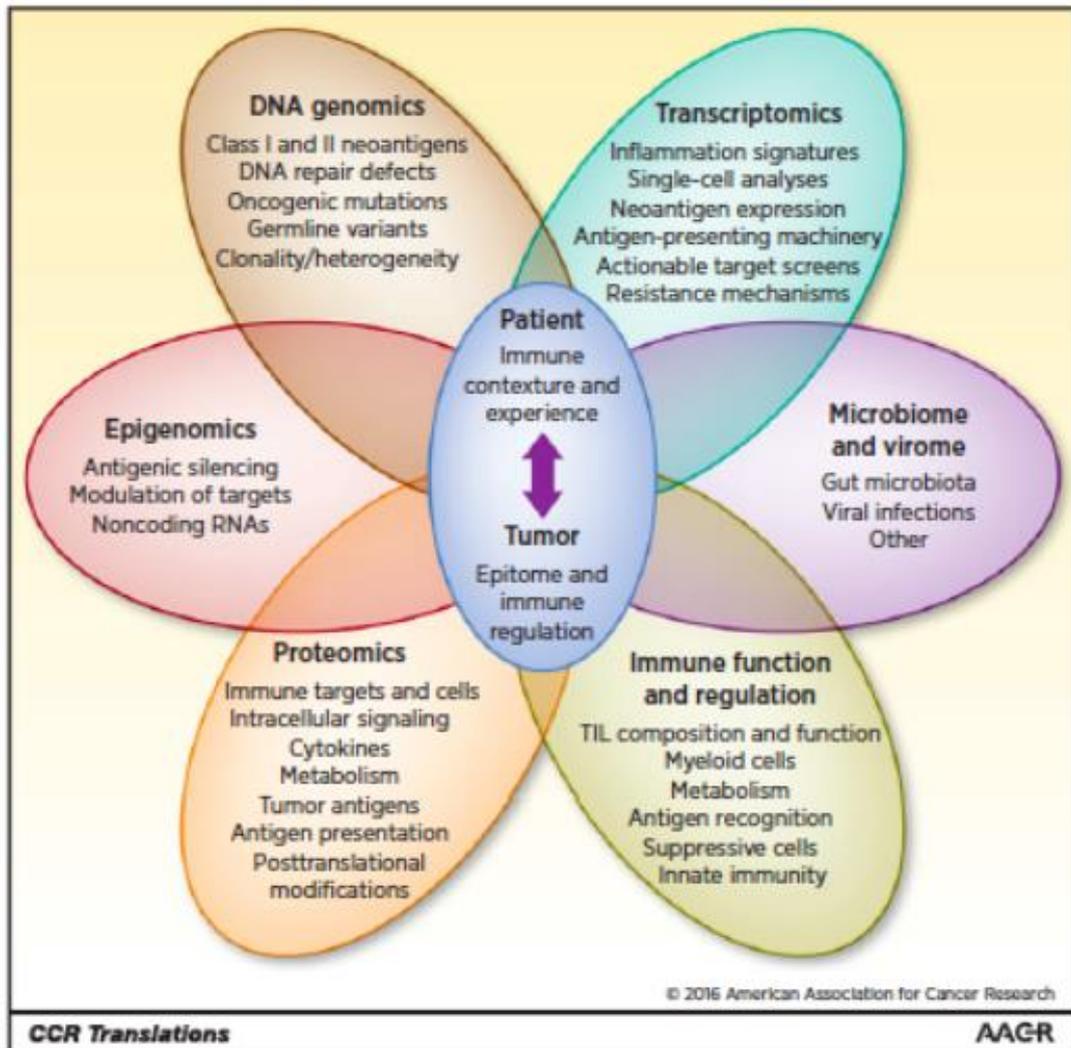


Figura I5. Factores *multiomics* relacionados con la inmunogenicidad tumoral y la respuesta inmune antitumoral por parte del paciente. Adaptado de referencia [79]

2. Justificación

El presente proyecto fue diseñado en 2016. En aquel momento igual que ahora, el cáncer colorrectal avanzado ya representaba un problema de salud relevante, con un pronóstico de alrededor de 30 meses [80]. Sin embargo, en los últimos años, se han ido definiendo diferentes poblaciones moleculares que asocian tratamientos específicos que han cambiado el paradigma de manejo. Por ejemplo, tumores con mutaciones en *BRAF* V600E [81], tumores con amplificaciones en *HER2* [82], y también tumores con fenotipo MSI-H/dMMR, que suponen alrededor de un 5% de los tumores colorrectales avanzados [57] [83] y son la base de este estudio. Cuando el proyecto fue planteado, no se disponía de los resultados definitivos de la mayoría de estudios descritos en el apartado 1.5.1. y que han dado lugar a que la inmunoterapia basada en inhibidores de PD-1/PD-L1 (PD-1/PD-L1 inh, de ahora en adelante) sea parte del arsenal terapéutico en estos pacientes, pero el estudio KEYNOTE-016 sí que había sido publicado [64]. En el mismo se investigó si parámetros genómicos y relacionados con el microambiente tumoral podrían relacionarse con la respuesta a pembrolizumab, en base a la evidencia emergente en otros tumores [62][84]. Los autores realizaron un análisis de secuenciación de exomas en 9 pacientes con tumores MSI-H/dMMR (procedentes de la cohorte de cáncer colorrectal y no colorrectal con este fenotipo) y en 7 pacientes con tumores colorrectales MSS/pMMR, observando que el mayor número de mutaciones somáticas y de neoantígenos asociados a mutaciones se asociaba a una mejor PFS a pembrolizumab ($p=0.021$ para mutaciones, $p= 0.018$ para neoantígenos), aunque no a RR ni a OS. La

densidad de linfocitos CD8⁺ intratumorales y la expresión PD-L1 fueron determinadas en 30 pacientes del total de incluidos en el estudio y, aunque no se asociaron con RR, ni con PFS, ni con OS de forma estadísticamente significativa, la tendencia observada entre la densidad linfocitaria y la respuesta a pembrolizumab fue positiva. Estos hallazgos pusieron de manifiesto que los patrones de respuesta a PD-1/PD-L1 inh podrían depender de factores genómicos y de microambiente tumoral, más allá del propio fenotipo MSI-H/dMMR y que por tanto, era preciso una mejor caracterización focalizada en cáncer colorrectal. Asimismo, no se disponía de evidencia sólida acerca de si mutaciones en genes involucrados en diferentes vías de señalización podrían relacionarse también con el beneficio a PD-1/PD-L1 inh, ni tampoco acerca del rol del microbioma en este sentido. No obstante, se habían publicado ya diferentes series que detectaban una bacteria Gram-negativa, *Fusobacterium nucleatum*, en tejido tumoral y/o heces de pacientes con cáncer colorrectal en un porcentaje variable [85][86][87][88], pero siendo el fenotipo MSI-H/dMMR la característica molecular más asociada a su presencia. Además, en un análisis realizado en muestras tumorales de 598 pacientes con cáncer colorrectal, niveles altos de *Fusobacterium nucleatum* determinados mediante PCR cuantitativa y definidos según un dintel propio de la cohorte, se habían correlacionado inversamente con la densidad de linfocitos CD3⁺ [89]. Finalmente y si bien no estaba planteado desde un inicio, a lo largo del transcurso del estudio se decidió realizar una revisión central del fenotipo MSI-H/dMMR mediante IHQ y PCR, además de su valoración por NGS, por la publicación de un estudio que postuló las discordancias entre

IHQ y PCR en relación al diagnóstico del fenotipo mencionado, como una causa no biológica de resistencia primaria a inmunoterapia por falsos positivos en alguna de las técnicas [90]. Todos los motivos expuestos, además de la participación activa del Hospital Vall d'Hebron en el desarrollo de la inmunoterapia en el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR, fueron los que justificaron el diseño del presente proyecto de carácter exploratorio y que incluye múltiples análisis, con el fin de generar hipótesis de valor para el desarrollo de biomarcadores a PD-1/PD-L1 inh. A medida que se han ido publicando los resultados de los estudios detallados en el apartado 1.5.1, en los cuales un porcentaje no menospreciable de pacientes no se beneficia de los PD-1/PD-L1 inh pese a ser tumores teóricamente inmunogénicos como se ha explicado en los apartados 1.3.4 y 1.3.5., el interés en el objetivo fundamental del estudio se ha visto reforzado. De hecho, la selección óptima de pacientes MSI-H/dMMR sigue siendo uno de los mayores retos en el ámbito de la inmunoterapia y el cáncer colorrectal.

3. Hipótesis

3.1. Hipótesis primaria

El TMB, la infiltración tumoral de linfocitos T, y la expresión de PD-L1 podrían ser factores predictivos de respuesta a PD-1/PD-L1 inh en el cáncer colorrectal avanzado MSI-H/dMMR.

3.2. Hipótesis secundarias

- Los niveles de mutaciones *frameshift* podrían ser factor predictivo de respuesta a PD-1/PD-L1 inh en el cáncer colorrectal avanzado MSI-H/dMMR.

- Mutaciones con pérdida de función en determinados genes podrían ser factores predictivos de respuesta a PD-1/PD-L1 inh en el cáncer colorrectal avanzado MSI-H/dMMR, por la activación de vías de señalización y modulación de microambiente tumoral.

-Los niveles de *Fusobacterium nucleatum* intratumoral podrían ser factor predictivo de respuesta a PD-1 / PD-L1 inh en el cáncer colorrectal avanzado MSI-H/dMMR.

-Las discordancias de resultados entre técnicas diagnósticas de fenotipo MSI-H/dMMR podrían relacionarse con la falta de beneficio a PD-1/PD-L1 inh en el cáncer colorrectal avanzado MSI-H/dMMR

4. Objetivos

4.1. Objetivo primario

Determinar el TMB mediante secuenciación de nueva generación, así como la densidad de diferentes subpoblaciones de linfocitos T y la expresión de PD-L1 mediante IHQ, en tumores colorrectales MSI-H/dMMR de pacientes tratados con PD-1/PD-L1 inh. Correlacionar los resultados obtenidos con el beneficio presentado a PD-1/PD-L1 inh de acuerdo a la PFS.

4.2. Objetivos secundarios

- Cuantificar las mutaciones *frameshift* mediante secuenciación de nueva generación en tumores colorrectales MSI-H/dMMR de pacientes tratados con PD-1/PD-L1 inh. Correlacionar los resultados obtenidos con el beneficio presentado a PD-1/PD-L1 inh de acuerdo a la PFS.

-Determinar el perfil de genes mutados mediante secuenciación de nueva generación en tumores colorrectales MSI-H/dMMR de pacientes tratados con PD-1/PD-L1 inh. Correlacionar los resultados obtenidos con el beneficio presentado a PD-1/PD-L1 inh de acuerdo a la PFS, así como con los resultados obtenidos en relación al microambiente tumoral.

-Determinar la presencia y los niveles de *Fusobacterium nucleatum* mediante técnicas de hibridación *in situ*, en tumores colorrectales MSI-H/dMMR de pacientes tratados con PD-1/PD-L1 inh. Correlacionar los resultados obtenidos con el beneficio presentado a PD-1/PD-L1 inh de acuerdo a la PFS.

-Determinar la existencia de discordancias entre IHQ y PCR en relación al diagnóstico de fenotipo MSI-H/dMMR, y correlacionarlo con el beneficio presentado a PD-1/PD-L1 inh de acuerdo a la PFS, y con la presencia de fenotipo MSI-H/dMMR evaluado mediante NGS.

5. Métodos

5.1. Tipo de estudio

El presente estudio es observacional, dado que no se realizó ninguna intervención específica en los pacientes incluidos, y unicéntrico, porque se seleccionaron aquellos procedentes del servicio de Oncología Médica del Hospital Vall d'Hebron y que cumplían los criterios de inclusión especificados en el apartado 5.2. El estudio fue aprobado por el CEIC del mismo centro con el código PR(AG)336-2018.

5.2. Selección de la cohorte de estudio y criterios de inclusión

Entre el 1 de enero de 2017 y el 30 de mayo de 2019, se identificaron de forma retrospectiva y prospectiva los pacientes con cáncer colorrectal avanzado que cumplieran los siguientes criterios de inclusión:

1-Diagnóstico de fenotipo MSI-H/dMMR obtenido mediante las técnicas de IHQ y/o PCR, realizadas en el laboratorio local o de otro centro.

2-Recibir por primera vez tratamiento con un régimen de inmunoterapia basado en PD-1/PD-L1 inh en cualquier línea de tratamiento, ya fuera en contexto asistencial o de ensayo clínico.

3-Disponer de muestra de archivo parafinada de tumor primario y/o metástasis para los análisis pertinentes.

Se identificaron un total de 19 pacientes que cumplían los 2 primeros criterios de inclusión durante el periodo de tiempo especificado, pero por la falta de muestra tumoral adecuada en 3 pacientes (criterio de inclusión 3),

finalmente se seleccionaron 16 como cohorte de estudio. Todos ellos firmaron el consentimiento informado específico, mediante el cual autorizaron el uso de las muestras de tumor y datos clínicos asociados para investigación, de acuerdo a la Declaración de Helsinki de los Principios Éticos para las Investigaciones Médicas en Seres Humanos.

5.3. Variables clínicas de estudio

Las siguientes variables se recogieron en una base de datos tras la identificación de los pacientes que cumplían los criterios de inclusión.

- *Variables epidemiológicas*: fecha de nacimiento y sexo (hombre / mujer)
- *Variables relacionadas con la enfermedad neoplásica*: fecha del diagnóstico, estadio al diagnóstico según el sistema TNM [91] (estadio I / estadio II / estadio III / estadio IV), localización del tumor primario (colon derecho / colon izquierdo / recto), número de localizaciones metastásicas al inicio del tratamiento con PD-1/PD-L1 inh (1 / 2 / 3), número de líneas previas de tratamiento para enfermedad avanzada, fecha del último seguimiento, vivo en el momento del último seguimiento (sí / no), si éxito, secundario a enfermedad (sí / no).
- *Variables relacionadas con características moleculares basales de la enfermedad neoplásica*: presencia de mutaciones en *KRAS* (sí / no), *NRAS* (sí / no) y *BRAF V600E* (sí / no).
- *Variables relacionadas con el fenotipo MSI-H/dMMR*: resultados de la determinación mediante PCR (MSS / MSI-H), MS inestables (BAT25 / BAT26 / NR-21 / NR-24 / MONO-27), resultados de la determinación mediante IHQ (pMMR / dMMR), proteínas con pérdida de expresión en el

análisis mediante IHQ (MLH1 / MSH2 / MSH6 / PMS2), asociación con SL (sí / no).

-Variables relacionadas con el tratamiento de inmunoterapia: descripción del régimen basado en PD-1 / PD-L1 inh, mejor respuesta presentada al mismo según los criterios RECIST v1.1 [62] (CR / PR / SD / PD), fecha de inicio del tratamiento, fecha de fin si aplica, fecha de primera respuesta, fecha de progresión si aplica, toxicidad inmunomediada de acuerdo a los criterios CTCAE v4.

-Variables relacionadas con las muestras a analizar: procedencia (primario / metástasis, y descripción del origen de la metástasis, si procede), influencia de tratamientos previos (no / sí, y descripción de los mismos si procede).

5.4. Análisis de parámetros genómicos

El estudio los diferentes parámetros genómicos de los tumores (TMB, mutaciones *frameshift* y determinación de fenotipo MSI-H/dMMR por NGS) se realizó sobre muestras en parafina y mediante NGS de alta resolución, tal y cómo se describe a continuación.

El primer paso fue la extracción de DNA de las muestras parafinadas, en cantidad aproximada de 500 nanogramos por muestra. A continuación, se llevó a cabo la fragmentación del DNA mediante ultrasonificación (ultrasonicador Covaris S2) con el objetivo de romper al azar moléculas de DNA cuyos extremos terminales serían posteriormente secuenciados, de manera que existieran el máximo de extremos terminales posibles para asegurar una buena cobertura de secuenciación. Se obtuvieron fragmentos

o *short-reads* de entre 150-200 pares de bases para la creación de la librería de DNA, los cuales fueron también purificados.

Posteriormente, se utilizaron sondas de oligonucleótidos biotiniladas, es decir, con biotina unida de forma covalente, las cuales son selectivas y complementarias a los genes de interés. La plataforma concreta utilizada fue Agilent SureSelect, cuyas sondas son de RNA, tienen una longitud de 120 pares de bases, corresponden a regiones genómicas adyacentes (en lugar de sobrepuestas como ocurre en otras plataformas), y se estima que cubren 1.34 megabases del genoma humano en el panel NGS utilizado descrito en el siguiente apartado [92].

Una vez se confrontaron las librerías de DNA con las sondas pertinentes, se seleccionaron las zonas de DNA tumoral que se habían unido a ellas. Este paso se realizó mediante la plataforma *solution-based* de Agilent, la cual utiliza moldes con estreptavidina, que se une con elevada afinidad y especificidad a la biotina de las sondas, de manera que se identifican las regiones genómicas de interés, y el resto, las no unidas a sonda, se desestiman.

Seguidamente, las regiones de DNA unidas a las sondas específicas se unieron a *primers* para ser amplificadas mediante una PCR y posteriormente secuenciadas. Para este paso, se utilizó la plataforma de HiSeq2000 (Illumina), con una cobertura de x415 y que permite generar hasta 200 Gigabites de información por lectura.

5.5. Análisis bioinformático

El procesamiento bioinformático de los resultados obtenidos de los estudios genómicos se realizó mediante el panel VHIO-Card_300 v2 (Figura M1), el cual se trata de un panel customizado diseñado por el Grupo de Genómica del Cáncer de VHIO para el estudio genómico de DNA tumoral en muestras parafinadas, con un tamaño de 1.35 Mb.

El panel VHIO-Card_300 v2 analiza las llamadas *high –confidence regions* de los genes, en las cuales no se encuentran variantes estructurales relevantes y las mutaciones de interés pueden ser constatadas con elevada probabilidad [92]. De hecho, captura las regiones exónicas de 431 genes relevantes para el estudio del cáncer además de SNPs distribuidos a lo largo del genoma, con una frecuencia media poblacional de 0.5. Los resultados del panel VHIO-Card_300 v2 se especifican en variantes patogénicas o probablemente patogénicas, variantes de significado incierto (con la fracción mutacional alélica) y alteraciones en el número de copias (pérdidas y ganancias).

ABL1	BRAF	CSF1R	FAM123B	GATA6	IRS1	MDM2	NTRK3	PRKAR1A	RUNX1T1	TERC
ABL2	BRCA1	CTCF	FAM175A	GID4	IRS2	MDM4	NUP93	PRKCI	RYBP	TERT
ACVR1B	BRCA2	CTLA4	FAM46C	GLI1	JAK1	MED12	PAK1	PRKDC	SDHA	TET1
AKT1	BRD4	CTNNA1	FANCA	GNA11	JAK2	MEF2B	PAK3	PRSS8	SDHAF2	TET2
AKT2	BRIP1	CTNNB1	FANCC	GNA13	JAK3	MEN1	PAK7	PTCH1	SDHB	TGFBR1
AKT3	BTG1	CUL3	FANCD2	GNAQ	JUN	MET	PALB2	PTEN	SDHC	TGFBR2
ALK	BTK	CYLD	FANCE	GNAS	KAT6A	MITF	PARK2	PTPN11	SDHD	TMEM127
ALOX12B	C11orf30	DAXX	FANCF	GPR124	KDM5A	MLH1	PARP1	PTPRD	SETD2	TMPRSS2
AMER1	CARD11	DCUN1D1	FANCG	GREM1	KDM5C	MLL	PAX5	PTPRS	SF3B1	TNFAIP3
APC	CASP8	DDR2	FANCL	GRIN2A	KDM6A	MLL2	PBRM1	PTPRT	SH2D1A	TNFRSF14
AR	CBFB	DICER1	FANCM	GRM3	KDR	MLL3	PDCD1	QKI	SHH	TOP1
ARAF	CBL	DIS3	FAS	GSK3B	KEAP1	MPL	PDCD1LG2	RAC1	SHQ1	TOP2A
ARFRP1	CCND1	DNMT1	FAT1	H3F3A	KEL	MRE11A	PDGFRA	RAD50	SLIT2	TP53
ARID1A	CCND2	DNMT3A	FBXW7	H3F3C	KIT	MSH2	PDGFRB	RAD51	SMAD2	TP63
ARID1B	CCND3	DNMT3B	FGF10	HGF	KLF4	MSH6	PDK1	RAD51B	SMAD3	TRAF7
ARID2	CCNE1	DOT1L	FGF14	HIST1H1C	KLHL6	MTOR	PDPK1	RAD51C	SMAD4	TSC1
ARID5B	CD274	E2F3	FGF19	HIST1H2BD	KMT2A	MUTYH	PHOX2B	RAD51D	SMARCA4	TSC2
ASXL1	CD276	EED	FGF23	HIST1H3B	KMT2C	MYC	PIK3C2B	RAD52	SMARCB1	TSHR
ASXL2	CD79A	EGFL7	FGF3	HNF1A	KMT2D	MYCL	PIK3C2G	RAD54L	SMARCD1	U2AF1
ATM	CD79B	EGFR	FGF4	HRAS	KRAS	MYCL1	PIK3C3	RAF1	SMD	VEGFA
ATR	CDC73	EIF1AX	FGF6	HSD3B1	LATS1	MYCN	PIK3CA	RANBP2	SNCAIP	VHL
ATRX	CDH1	EP300	FGFR1	HSP90AA1	LATS2	MYD88	PIK3CB	RARA	SOCS1	VTCN1
AURKA	CDK12	EPCAM	FGFR2	ICOSLG	LMO1	MYO10	PIK3CD	RASA1	SOX10	WISP3
AURKB	CDK4	EPHA3	FGFR3	IDH1	LRP1B	NBN	PIK3CG	RB1	SOX17	WT1
AXIN1	CDK6	EPHA5	FGFR4	IDH2	LYN	NCOR1	PIK3R1	RBM10	SOX2	XIAP
AXIN2	CDK8	EPHA7	FH	IFNGR1	LZTR1	NF1	PIK3R2	RECQL4	SOX9	XPO1
AXL	CDKN1A	EPHB1	FLCN	IGF1	MAD2L2 (REV)	NF2	PIK3R3	REL	SPEN	YAP1
B2M	CDKN1B	ERBB2	FLT1	IGF1R	MAGI2	NFE2L2	PIM1	RET	SPOP	YES1
BAP1	CDKN2A	ERBB3	FLT3	IGF2	MALT1	NFKBIA	PLCG2	RFWD2	SPTA1	ZBTB2
BARD1	CDKN2B	ERBB4	FLT4	IKBKE	MAP2K1	NIX2-1	PLK2	RHEB	SRC	ZNF217
BBC3	CDKN2C	ERCC2	FOXA1	IKZF1	MAP2K2	NIX3-1	PMAIP1	RHOA	STAG2	ZNF703
BCL2	CEBPA	ERCC3	FOXL2	IL10	MAP2K4	NOTCH1	PMS1	RICTOR	STAT3	
BCL2L1	CHD2	ERCC4	FOXP1	IL7R	MAP3K1	NOTCH2	PMS2	RIT1	STAT4	
BCL2L11	CHD4	ERCC5	FRS2	INHBA	MAP3K13	NOTCH3	PNRC1	RNF43	STK11	
BCL2L2	CHEK1	ERG	FUBP1	INPP4A	MAP3K5	NOTCH4	POLD1	ROS1	STK40	
BCL6	CHEK2	ERRF1	GABRA6	INPP4B	MAPK1	NPM1	POLE	RP56KA4	SUFU	
BCOR	CIC	ESR1	GATA1	INSR	MAPK7	NRAS	PPP2R1A	RP56KB2	SUZ12	
BCORL1	CREBBP	ETV1	GATA2	IRAK4	MAX	NSD1	PPP2R2A	RPTOR	SYK	
BLM	CRKL	ETV6	GATA3	IRF2	MCL1	NTRK1	PRDM1	RSPO2	TAF1	
BMPR1A	CRLF2	EZH2	GATA4	IRF4	MDC1	NTRK2	PREX2	RUNX1	TBX3	

Figura M1. Panel VHIO-Card_300 v2.

En los datos de secuenciación obtenidos se aplicaron filtros específicos para asegurar la calidad de los resultados. Concretamente, dicho control se llevó a cabo con FastQC y contrastado con el *pipeline* humano de

referencia (hg19) mediante bwa (v.0.7.17). Como resultado de este proceso, se generaron archivos BAM que fueron procesados mediante SAMtools (v.1.7) y *Genome Analysis Toolkit* (GATK) versión 3.7. Para desestimar las variantes germinales, se utilizaron datos *in silico* de VarScan (v2.4.3), Mutect (v2) y Strelka, con los siguientes parámetros: frecuencia variante alélica de mínimo 5%, cobertura mínima de 8 secuencias, un mínimo de 7 secuencias que confirmaran la mutación con un p-valor inferior al 0.05. Debido a que los tumores MSI-H/dMMR son hipermutados, sólo las mutaciones detectadas en un mínimo de 2 de los 3 *pipelines* mencionados, se consideraron relevantes para la interpretación de resultados.

Para el filtro de los SNPs frecuentes en la población, se utilizaron las bases de datos 1000 *Genome* [93], *Exome Variant Server Database* [94], y *GnomAD database* [95], de acuerdo a una frecuencia variante alélica > 0.0001 descrita en *GnomAD* [96].

La clasificación del significado clínico de las variantes se llevó a cabo mediante las siguientes bases de datos: COSMIC [97], cBioPortal [98], ClinVarCL [99], OncoKB [100] y VarSome [101]. Asimismo, se realizó una revisión manual de los datos de las diferentes bases con el fin de armonizar criterios entre ellas.

Se estima que la secuenciación genómica mediante la plataforma Agilent y tras la aplicación de los filtros específicos, cubre casi el 100% de los fragmentos de DNA de interés, la cual es una de las proporciones más elevadas comparadas con otras plataformas [92]. Otras ventajas de la plataforma Agilent's son la muy buena cobertura de las mutaciones

frameshift, y los pocos duplicados en los fragmentos de DNA a estudiar [92].

Para el cálculo de las alteraciones en el número de copias, se utilizó la herramienta CNVkit, basada en la técnica *Parent-Specific Copy Number Segmentation Method* (PSCBS). Concretamente, dicha técnica consiste en que los resultados obtenidos para cada tumor analizado se compararon con un modelo creado internamente a partir del *pool* de DNA extraído de muestras parafinadas de más de 150 tumores diferentes, y mezclado en las mismas proporciones.

Para el análisis de pérdida de heterocigosidad se utilizaron los datos obtenidos de los SNPs, se realizaron mediante SAMtools (v.1.7.) y los resultados fueron procesados a través de ggplot2.

El TMB fue calculado de acuerdo al número de variantes no-sinónimas (filtrando los SNPs) por Megabase, es decir, computó las mutaciones codificantes.

Las mutaciones que de ahora en adelante se referirán como mutaciones *indels*, son las mutaciones *frameshift* causadas por inserciones o pérdidas de nucleótidos no múltiples de tres que modifican el marco de lectura del DNA, por lo que ambos términos (*indels* y *frameshift*) se utilizarán indistintamente.

Las firmas mutacionales por NGS para el diagnóstico del fenotipo MSI-H/dMMR se definieron de acuerdo a la versión 3.1. de Junio 2020 del *Catalog of Somatic Mutations in Cancer* [97].

Finalmente, con el fin de determinar la prevalencia general en cáncer colorrectal MSI-H/dMMR del perfil mutacional que se considerara de interés

tras el estudio genómico, también se planeó la consulta a la base de datos cBioPortal [98].

5.6. Análisis de poblaciones linfocitarias y PD-L1

El estudio de parámetros relacionados con microambiente tumoral se realizó mediante IHQ en cortes consecutivos de las muestras tumorales parafinadas y utilizando anticuerpos contra CD3, CD8, FOXP3 y PD-L1, con el fin de determinar la presencia de linfocitos T (CD3⁺), linfocitos T citotóxicos (CD8⁺), linfocitos T reguladores (FOXP3⁺), así como la expresión de PD-L1 en células tumorales y células inmunes (macrófagos y linfocitos) infiltrantes de tumor. Concretamente, los cortes con representación tumoral de cada paciente fueron desparafinados con el fin de conseguir la exposición de los antígenos de interés, para la posterior aplicación de los anticuerpos dirigidos (Tabla M2).

Antígeno	Clon	Dilución	Productor	Tiempo incubación (minutos)	Temperatura
CD3	2GV6	Listo para usar	Ventana Medical Systems	32	36°C
CD8	144B	1/100	Dako Agilent	32	Ambiente
PD-L1	SP263	Listo	Ventana	16	36°C

		para usar	Medical Systems		
FOXP3	SP97	1/100	ABCAM	60	Ambiente
Pan Queratina	AE1/AE3 PCK26	Listo para usar	Ventana Medical Systems	36	Ambiente

Tabla M2. Descripción de los anticuerpos y de sus protocolos de aplicación utilizados para el estudio IHQ del microambiente tumoral.

Las reacciones de los anticuerpos contra los antígenos de interés se detectaron mediante *UltraView Universal DAB Detection kit*. Finalmente, los cortes fueron contrateñidos con Hematoxilina y montados con un medio de Xilol. Los cortes de interés fueron digitalizados utilizando un escáner específico (NanoZoomer 2.0-HT, Hamamatsu Photonics, Japón) y la calidad de la imagen fue comprobada por un patólogo antes de la valoración definitiva.

Para determinar la densidad intratumoral de las diferentes subpoblaciones linfocitarias, se realizó una cuantificación de las tinciones inmunohistoquímicas utilizando diferentes algoritmos de análisis de imagen creados mediante el módulo AuthorTM de Visiopharm®. El área tumoral fue dibujada de manera manual por los patólogos, donde se calcularon las densidades de las células inmunes teñidas con anticuerpos dirigidos a CD3, CD8 y FOXP3, y excluyendo el resto de tejidos como el normal. Para el análisis de PD-L1, el *Composite Positive Score* (CPS) se

calculó dividiendo el número de células PD-L1 positivas (tumor, linfocitos y macrófagos) entre el total de las células tumorales viables positivas para Pan Queratina y multiplicado por 100 [102].

Las densidades de las poblaciones linfocitarias se expresaron mediante su valor por mm², y la expresión de PD-L1 mediante su valor.

Todos los procedimientos anteriormente descritos se realizaron en el laboratorio de Oncología Molecular del VHIO.

5.7. Análisis de *Fusobacterium nucleatum*

El análisis de *Fusobacterium nucleatum* se llevó a cabo mediante la técnica de RNA-ISH, con el soporte de la tecnología RNAscope® (*Advanced Cell Diagnostics, USA*), tal y como se detalla a continuación.

Se realizaron cortes de 5 µm de las muestras tumorales parafinadas, para posterior desparafinización durante 30 minutos a 60°C, con el fin de obtener la exposición del antígeno bacteriano de interés. La secuencia de la sonda utilizada para la detección de dicho antígeno fue:

AATATGTCAAGGATACAGCCGTTGTATTTAAGGGGTTGAG

GGACAAAGTAGTGAAGAACTGTAAGATATTCAATATAGTGTATTGATGA

ATTAGAATTGTATGGAAAGATAAACCGCAGAAGGTGAGAGTCCTGTAT

AAGTAAATCTTTACACATATAACT

El tiempo de hibridación de la sonda con cada muestra tumoral procesada fue de 120 minutos a 43°C, seguido de la amplificación de la señal y visualización mediante un cromógeno rojo (Figura M3). Seguidamente, se realizó una contratinción mediante Hematoxilina II, y se montaron de nuevo las laminillas en un medio acuoso. La calidad de estas laminillas fue

revisada por un patólogo del equipo, antes de proceder a su digitalización utilizando el NanoZoomer 2.0 – HT scanner (Hamamatsu Photonics, Japón), la cual permitió el estudio de *Fusobacterium nucleatum* mediante análisis digital. Para la cuantificación de la señal de la bacteria, se utilizó un algoritmo creado mediante el *software* de análisis de imagen Visiopharm® (Author™, Hoersholm, Alemania), el cual permite la detección automática y la cuantificación individual de la señal roja emitida por moléculas de RNA mensajero de las bacterias en una región de interés. Los resultados se expresaron en forma de variable continua de acuerdo a la densidad (número de células bacterianas por mm² de tejido), y en forma de variable categórica, es decir, *Fusobacterium nucleatum* positivo o *Fusobacterium nucleatum* negativo, con un dintel de positividad de 4 células bacterianas por mm². Este dintel fue definido en el propio laboratorio antes de la valoración de los resultados, de acuerdo a estudios propios de validación del punto de corte en líneas celulares y tejidos, y es el utilizado en otros trabajos relacionados con *Fusobacterium nucleatum* [103].

Todos los procedimientos descritos se realizaron en el laboratorio de Oncología Molecular del VHIO.

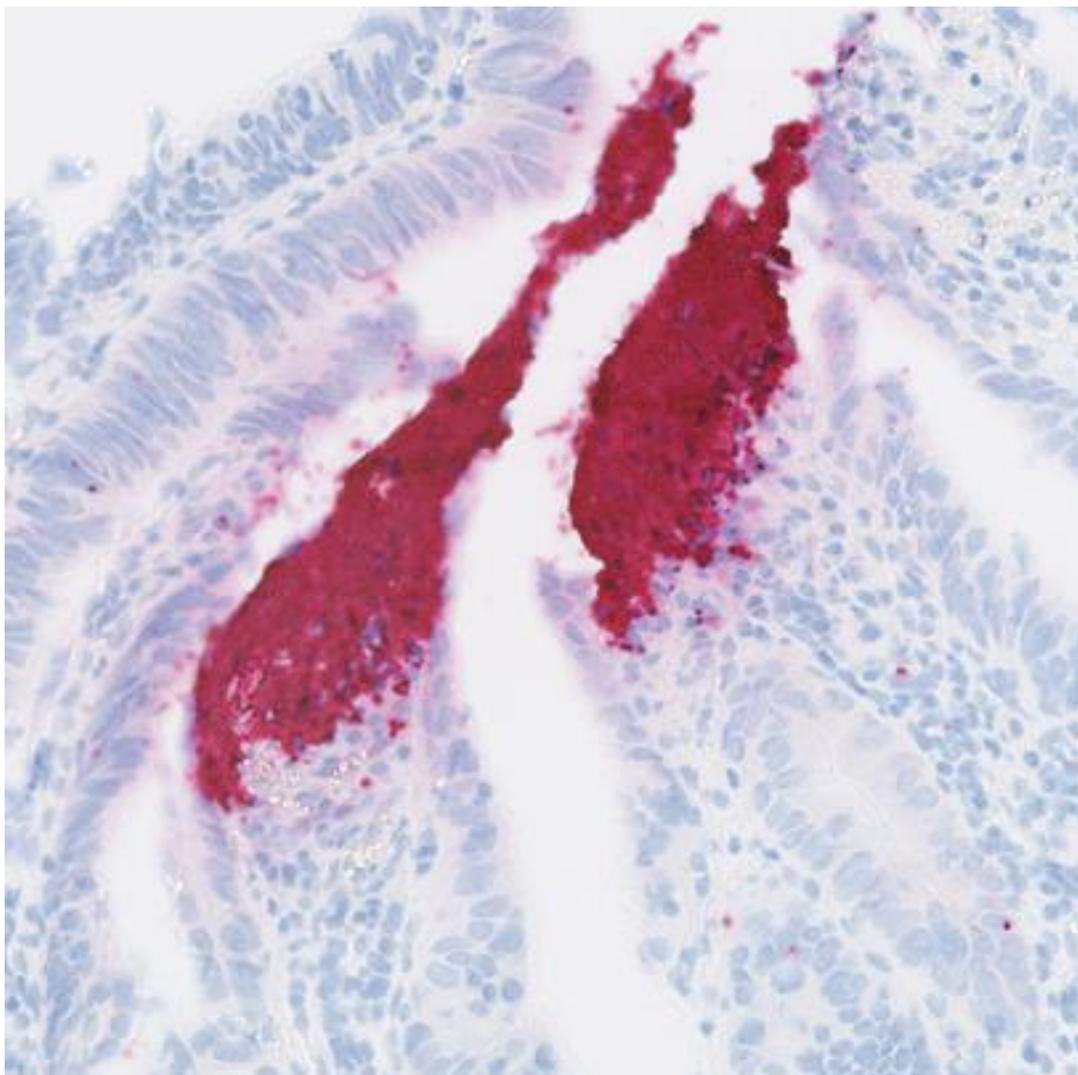


Figura M3. Visualización de *Fusobacterium nucleatum* en tejido de cáncer colorrectal mediante la técnica RNA-ISH. Adaptado de [97].

5.8. Análisis del fenotipo MSI-H/dMMR por IHQ y PCR

Para la inclusión en la cohorte de estudio, el diagnóstico del fenotipo MSI-H/dMMR podía haberse realizado por protocolo asistencial en el propio centro, o bien en otros centros desde los cuales se remitieron a los pacientes para tratamientos específicos, mediante IHQ y/o mediante PCR. No obstante, se planteó también realizar una revisión central en el

laboratorio de Oncología Molecular de VHIO y en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron mediante IHQ y PCR, con el fin de analizar la concordancia entre ambas técnicas en relación al diagnóstico del fenotipo MSI-H/dMMR.

En relación a la técnica de IHQ, se utilizaron anticuerpos de PharMingen Biosciences dirigidos a MSH2 (clon G219-1129), MLH1 (clon G168-728), MSH6 (clon 44) y PMS2 (clon A16-A).

Para la realización de la PCR, la extracción del DNA a partir de tejido tumoral se realizó mediante el DNA Tissue Kit de QIAGEN. La calidad del DNA se comprobó mediante la amplificación del gen de Actina, y se determinó la presencia de inestabilidad en los siguientes microsatélites: BAT25, BAT26, NR-21, NR-24 y MONO-27, mediante el protocolo del Kit de *MSI Analysis System* de la casa PROMEGA.

El diagnóstico del fenotipo MSI-H/dMMR se realizó de acuerdo a las recomendaciones de la ESMO, es decir: pérdida de expresión nuclear de al menos 1 de las 4 proteínas definidas anteriormente en el análisis inmunohistoquímico, e inestabilidad en mínimo 2 de los 5 microsatélites estudiados en el análisis por PCR [26].

5.9. Análisis estadísticos

Si bien la finalidad del presente proyecto fue exploratoria, es importante remarcar que el tamaño de la muestra de estudio no se definió en base a los objetivos por diferentes dos motivos: 1. Por la baja prevalencia del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR que limita la estimación precisa del tamaño de la muestra. 2. Ninguna de las variables a correlacionar con el beneficio a

PD-1/PD-L1 inh según los objetivos del estudio tiene un punto de corte validado, por lo que no fue posible estimar el número de pacientes con niveles altos o bajos de cada variable. En su lugar, se utilizaron las medianas de cada variable en cada grupo de beneficio a PD-1/PD-L1 inh para compararlas entre ellas. De entre las diferentes opciones de representación de datos en estadística descriptiva, se utilizó la mediana para las comparaciones entre grupos por tratarse de una muestra pequeña, porque las variables no siguieron una distribución normal y, dado que se obtuvieron algunos valores extremos en los diferentes análisis, la media podría no representar adecuadamente los resultados dado que se modifica con valores extremos. La categorización del beneficio presentado a PD-1/PD-L1 inh, se definió de acuerdo a las recomendaciones del panel de expertos de la *Society for Immunotherapy of Cancer*, las cuales postulan que los pacientes que presentan PD como mejor respuesta a la inmunoterapia o SD durante un máximo de 6 meses, asocian resistencia primaria a la misma [104]. Por dicho motivo, los pacientes se dividieron en dos grupos: IT-resist, si la PFS a la inmunoterapia había sido de 6 meses o menos, e IT-respond, si la PFS a la inmunoterapia había sido de más de 6 meses.

La PFS fue definida como el periodo de tiempo comprendido entre la fecha de inicio del tratamiento con PD-1 / PD-L1 inh, y la fecha en la que se documentó la progresión al tratamiento de acuerdo con los criterios RECIST v1.1 [66], o bien la fecha del último seguimiento (censura), lo que ocurriera primero. Cabe resaltar que la pseudoprogresión se descartó por la evolución clínica tórpida que presentaron los pacientes.

En relación a la OS, se calculó la OS del periodo metastásico para evitar el sesgo derivado del hecho que los pacientes de la cohorte habían sido diagnosticados en diferentes estadios de cáncer colorrectal. Concretamente, fue definida como el periodo de tiempo comprendido entre la fecha del diagnóstico de la enfermedad metastásica, y la fecha de muerte por cáncer, o bien la fecha del último seguimiento (censura), lo que ocurriera primero.

La fecha del último seguimiento de todos los pacientes de la cohorte fue el 30 de octubre de 2020.

Todos los análisis de supervivencia se realizaron mediante la versión R 4.0.3 de un *software* estadístico, utilizando el método de Kaplan-Meier para estimar las curvas de supervivencia, y el *log-rank test* para comparaciones estadísticas. Los modelos proporcionales de Cox fueron usados para la obtención de las *hazard ratios* (HRs), con un intervalo de confianza del 95%. Todos los P valores fueron *two-sided*, y los valores menores de 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. En el caso de comparaciones múltiples, los P valores fueron ajustados por el método de Benjamini and Hochberg.

La mediana de seguimiento se calculó mediante el método de Kaplan-Meier reverso.

En relación a las diferentes variables de interés incluidas en el estudio, se abordaron mediante un análisis descriptivo y se expresaron según su naturaleza continua o categórica. Las variables continuas se expresaron como medias, medianas y rangos intercuartílicos (TMB, mutaciones *indels*, firma *indels* por NGS, densidad de linfocitos CD3⁺, densidad de linfocitos

CD8⁺, densidad de linfocitos FOXP3⁺, PD-L1, densidad de *Fusobacterium nucleatum*). Las variables categóricas se expresaron mediante valores absolutos y porcentajes (mutación en genes concretos presencia/ausencia, fenotipo MSI-H/dMMR presencia/ausencia, presencia de *Fusobacterium nucleatum* positivo/negativo).

Para los análisis univariados, se utilizó el test exacto de Fisher para variables categóricas, y el test de la *t* de Student o el test de Mann-Whitney para las variables continuas, después de comprobar la normalidad con el test de Shapiro-Wilk. Para evaluar la asociación mediante variables continuas, se utilizó el test de correlación de Spearman.

Los análisis estadísticos descritos se realizaron en el seno del grupo ODYSSEY (*Oncology Data Science*) de VHIO.

6. Resultados

Para su mejor comprensión, el orden de los resultados no sigue la prioridad establecida en los objetivos, si no que se detallan de acuerdo a la disciplina a la que pertenecen, es decir, en primer orden aparecen los resultados relacionados con análisis genómicos y, posteriormente, el resto.

6.1. Perfil clínico de la cohorte y patrones de beneficio a PD-1/PD-L1 inh

La cohorte de estudio está formada por 16 pacientes cuyas características clínicas y patológicas más relevantes se encuentran detalladas en la tabla R1. La media de edad al diagnóstico fue de 55 años (rango: 30-90 años) y la distribución por géneros fue de un 43.7% de hombres *versus* un 56.3% de mujeres. En relación al estadio de la enfermedad según el sistema TNM [91], el 6.2% de los pacientes habían sido diagnosticados de cáncer colorrectal estadio II al debut, en comparación con el 50% y el 43.7% de estadios III y IV, respectivamente. La localización tumoral más frecuente fue colon derecho en el 56.2% de los casos, seguido de colon izquierdo o recto en el 25% de los casos, y de colon transversal en un 18.7% de los casos. Considerando la carga de enfermedad en el momento de la inclusión en el estudio, el 37.5% de los pacientes tenían metástasis en una localización, el 43.7% de los pacientes en dos localizaciones y el 18.7% de los pacientes en 3 localizaciones. El escenario de administración de PD-1/PD-L1 inh fue variable, dado que el 18.7% de los pacientes los recibieron en primera línea de enfermedad metastásica, el 25% en segunda línea y el

56.2% de los pacientes en tercera línea o posteriores. Concretamente, los regímenes de tratamiento incluyeron un anticuerpo anti-PD-1 en un 43.7% de los casos, y un anticuerpo anti-PD-L1 en el 56.3% restante. Todos los esquemas que incluyeron un anti-PD-1 consistieron en una monoterapia, pero los anticuerpos anti-PD-L1 se administraron en monoterapia en 3 pacientes (18.7% del total de casos incluidos en la cohorte), y se combinaron con bevacizumab en 3 pacientes (18.7% del total de casos incluidos en la cohorte), con un agonista CD40 en 1 paciente (6.2% del total de casos incluidos en la cohorte), y con un anticuerpo anti-CEA-CD3 en 2 pacientes (12.5% del total de casos incluidos en la cohorte).

	Pacientes n=16	%	IT- respond n=9	%	IT- resist n=7	
Media de edad y rango	55.4	(30-90)	57.22	(31-90)	53.14	(30-71)
Sexo						
Varón	7	43.7%	4	44.4%	3	42.8%
Mujer	9	56.3%	5	55.5%	4	57.1%
Estadio al diagnóstico						
II	1	6.2%	1	11.1%	0	0%
III	8	50%	3	33.3%	5	71.4%
IV	7	43.7%	5	55.5%	2	28.6%
Localización tumor primario						
Colon derecho	9	56.2%	5	55.5%	4	57.1%
Colon transverso	3	18.7%	1	11.1%	2	28.6%
Colon izquierdo-recto	4	25%	3	33.3%	1	14.3%

Número de sitios con metastásis						
1	6	37.5%	4	44.4%	2	28.6%
2	7	43.7%	4	44.4%	3	42.8%
3	3	18.7%	1	11.1%	2	28.6%
Escenario de PD-1/PD-L1 inh						
1ª línea	3	18.7%	3	33.3%	0	0%
2ª línea	4	25%	2	22.2%	2	28.6%
> 2ª línea	9	56.2%	4	44.4%	5	71.42%
Mutación en KRAS						
Sí	5	31.2%	3	33.3%	2	28.6%
No	11	68.7%	6	66.6%	5	71.4%
Mutación en NRAS						
Sí	0	0%	0	0%	0	0%
No	0	0%	0	0%	0	0%
Mutación BRAF V600E						
Sí	6	37.5%	3	33.3%	3	42.8%
No	10	62.5%	6	66.6%	4	57.1%
SL						
Sí	4	25%	4	44.4%	0	0%
No	12	75%	5	55.5%	7	100%
Régimen PD-1/PD-L1 inh						
PD-1 inh	7	43.7%	5	55.5%	2	28.6%
PD-L1 inh	3	18.7%	1	11.1%	2	28.6%
PD-L1 inh con:	6	37.5%	3	33.3%	3	42.8%
+ <i>Bevacizumab</i>	3	18.7%	2	22.2%	1	14.3%
+ <i>agonista CD40</i>	1	6.2%	0	0%	1	14.3%
+ <i>anticuerpo</i>	2	12.5%	1	11.1%	1	14.3%

<i>anti-CEA-CD3</i>						
Respuesta a PD-1/PD-L1 inh [63]						
CR	3	18.7%	3	33.3%	0	0%
PR	4	25%	4	44.4%	0	0%
SD	4	25%	2	22.2%	2	28.6%
PD	5	31.2%	0	0%	5	71.4%

Tabla R1. Descripción de la cohorte de estudio. Las diferentes variables están especificadas para la población general y para cada grupo (IT-respond e IT-resist)

Todos los pacientes que recibieron PD-1/PD-L1 inh en primera línea de tratamiento para enfermedad avanzada fueron clasificados en el grupo IT-respond, así como los pacientes diagnosticados de SL en una unidad de consejo genético. En relación a las mutaciones en *KRAS* y *BRAF* V600E determinadas por práctica clínica asistencial, la distribución fue similar en ambos grupos (Tabla R1).

La mediana de PFS a PD-1/PD-L1 inh fue de 14.54 meses (IC del 95%, 2.14 – NR) (Figura R2), y la mediana de OS de 63.9 meses (IC del 95%, 45.6 – NR) (Figura R3), tras 56.4 meses de mediana de seguimiento (mínimo-máximo: 22.2 – 87.8).

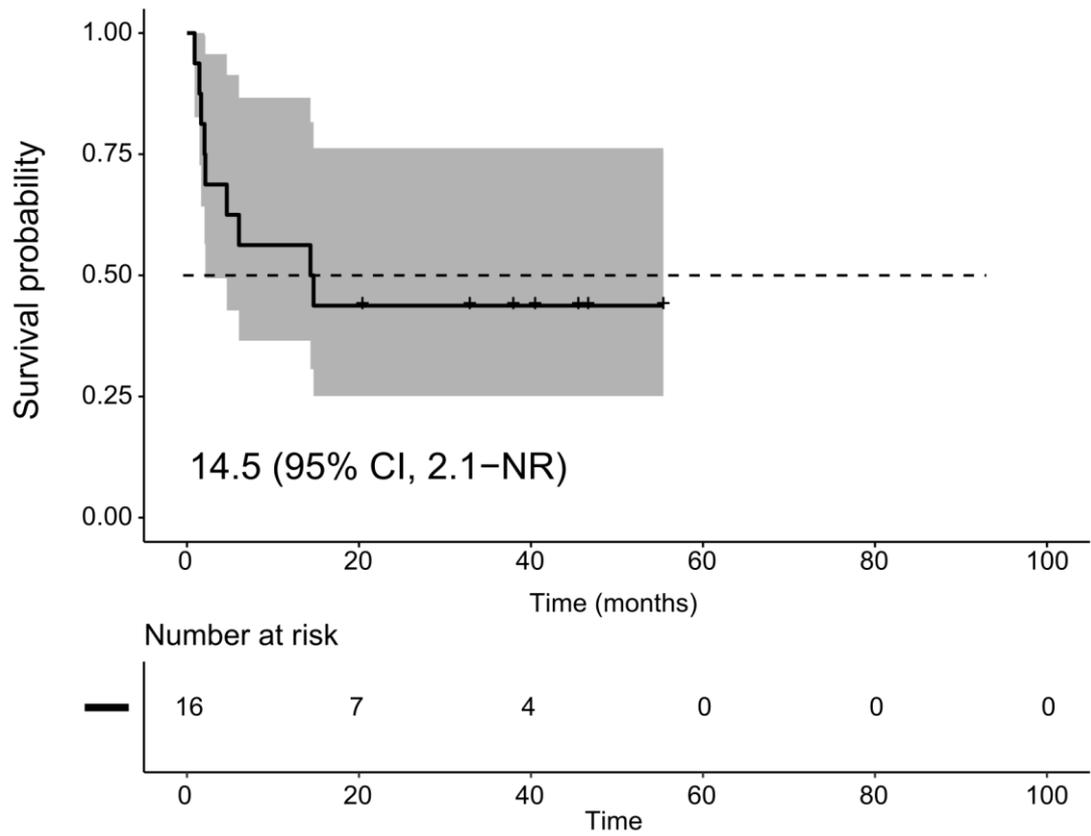


Figura R2. Curva de PFS presentada a PD-1/PD-L1 inh e intervalos de confianza (área gris) de toda la cohorte. La mediana de PFS fue de 14.5 meses.

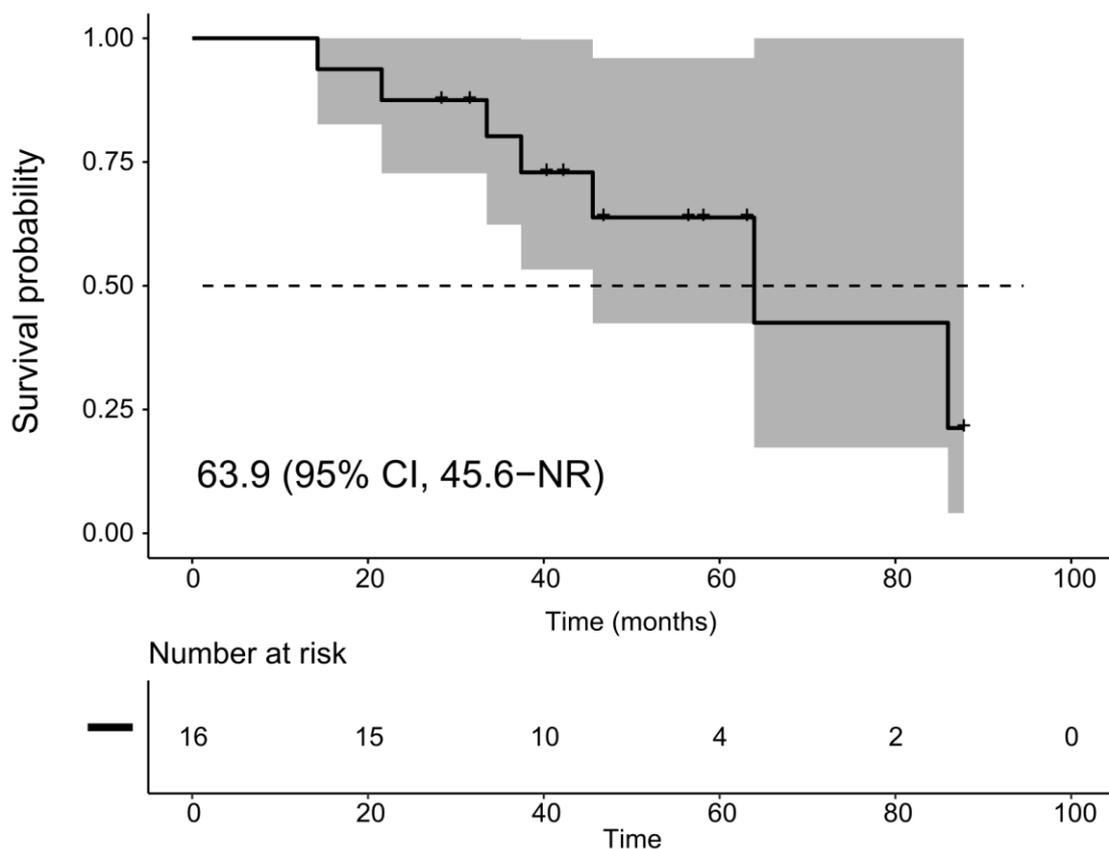


Figura R3. Curva de OS del periodo metastásico e intervalos de confianza (área gris) de toda la cohorte. La mediana de OS fue de 63.9 meses.

Desde un punto de vista individual, la tabla R4 resume las principales características de los pacientes incluidos en la cohorte de estudio en relación a sexo, edad al diagnóstico, localización tumoral, extensión de la enfermedad metastásica, esquema de PD-1/PD-L1 inh recibido (todos en contexto de ensayo clínico, excepto en el paciente 10), líneas previas de tratamiento para enfermedad avanzada (en caso de progresión dentro de los 6 meses posteriores al fin de quimioterapia adyuvante, ésta se

contabilizó como una línea de enfermedad avanzada), y estatus mutacional de *RAS* y *BRAF V600E*.

A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	M	39	D	3	2	Pembrolizumab	S	N
2	M	31	R	1	3	Atezolizumab + antiCEA-CD3	S	N
3	V	54	T	0	1	Pembrolizumab	N	N
4	V	72	D	0	2	Pembrolizumab	N	S
5	M	90	D	0	2	Pembrolizumab	N	S
6	M	73	R	2	1	Atezolizumab + Bevacizumab	N	N
7	V	52	I	2	2	Atezolizumab	S	N
8	V	51	D	2	1	Cemiplimab	N	S
9	M	53	D	1	1	Atezolizumab + Bevacizumab	N	N
10	M	46	D	2	2	Atezolizumab + antiCEA-CD3	S	N
11	M	71	D	1	1	Atezolizumab + Bevacizumab	N	N
12	V	66	T	1	1	Pembrolizumab	N	S
13	M	47	D	3	3	Atezolizumab + agonista CD40	S	N
14	V	30	T	3	2	Pembrolizumab	N	S
15	M	61	I	3	3	Atezolizumab	N	S
16	V	51	D	3	2	Anti-PD-L1	N	N

Tabla R4. Variables individuales de la cohorte de estudio. Columna A: número de paciente. Columna B: sexo (M: mujer, V: varón). Columna C: edad al diagnóstico. Columna D: localización tumoral (D: colon derecho, I: colon izquierdo, R: recto, T: colon transverso). Columna E: número de líneas previas recibidas para enfermedad avanzada. Columna F: número de localizaciones metastásicas. Columna G: esquema de PD-1/PD-L1 inh administrado. Columna H: presencia de

mutación en gen *RAS* (S: sí, N: no). **Columna I: presencia de mutación en gen *BRAF* (V600E) (S: sí, N:no).**

La PFS individual a PD-1/PD-L1 inh está representada en la figura R5 , así como la mejor respuesta presentada al tratamiento de acuerdo a criterios RECIST v1.1 [66] y el estatus en relación al mismo en la fecha del último seguimiento.

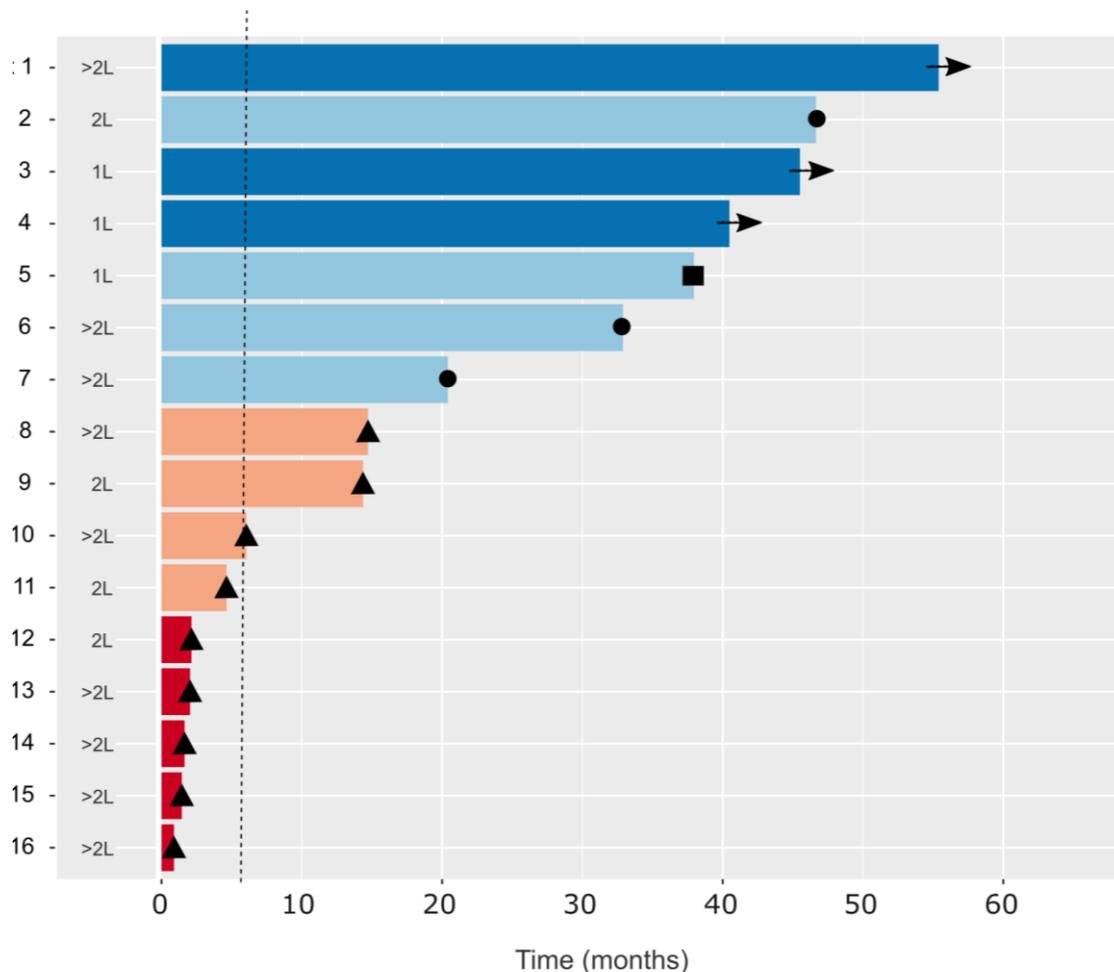


Figura R5. Swimmer plot que representa la PFS individual en meses a PD-1/PD-L1 inh de los pacientes 1 a 16 (eje vertical). En relación a la mejor respuesta presentada a PD-1/PD-L1 inh, las barras azul oscuro representan CR, las azul claro PR, las naranja SD y las rojas PD. La

línea discontinua señala los 6 meses de PFS a PD-1/PD-L1 inh que definen los grupos de IT-respond e IT-resist. En relación al estatus del tratamiento, los triángulos indican los pacientes a los cuales se paró por progresión, los cuadrados a los que se paró por toxicidad, las flechas a los que se paró por protocolo pese a seguir en respuesta, y los puntos a los que seguían en tratamiento en el momento del último seguimiento.

Cabe destacar que los pacientes que presentaron CR o PR a PD-1/PD-L1 inh como mejor respuesta, clasificados en el grupo IT-respond, no desarrollaron posterior resistencia secundaria, aunque el tratamiento se discontinuara por protocolo de estudio clínico (pacientes 1, 3 y 4), o bien por toxicidad hepática inmunomediada (paciente 5) (Figura R5). Todos los pacientes que presentaron SD como mejor respuesta a PD-1/PD-L1 inh, finalmente desarrollaron PD, pero los pacientes 8 y 9 mostraron una PFS mayor a 6 meses por lo que fueron clasificados en el grupo IT-respond (casos de resistencia secundaria), a diferencia de los pacientes 10 y 11 que fue igual o menor a 6 meses (casos de resistencia primaria), por lo que fueron clasificados en el grupo IT-resist. Los pacientes que presentaron PD como mejor respuesta, es decir, resistencia primaria (pacientes 12 a 16), se clasificaron en el grupo IT-resist (Figura R5).

6.2. Características de las muestras de estudio

Antes de proseguir con la descripción de los resultados, en este apartado se describen las características de las muestras utilizadas en relación a su procedencia y a la influencia previa de quimioterapia y/o radioterapia, descritas en la Tabla R6. Todas las muestras analizadas procedieron de tumores primarios de los pacientes, excepto en la paciente 11, y todas eran *naïve* de quimioterapia y/o radioterapia, excepto en los pacientes 6 y 14. En la Tabla R6 también se especifican los análisis que se pudieron llevar a cabo en cada caso según la disponibilidad de muestra de archivo, atendiendo que se priorizó la obtención de información genómica, y que no se contempló la biopsia *de novo* como procedimiento de estudio.

A	B	C	CD3	CD8	FOXP3	PD-L1	Fn	IHQ	PCR
1	P	N	S	S	S	S	S	S	S
2	P	N	S	S	S	S	S	S	S
3	P	N	S	S	S	S	N	S	S
4	P	N	S	S	S	S	S	S	S
5	P	N	S	N	S	S	S	S	S
6	P	A	N	N	N	N	N	S	NE
7	P	N	S	S	S	N	S	S	S
8	P	N	N	N	N	N	N	N	S
9	P	N	S	S	S	S	S	S	S
10	P	N	S	S	S	N	S	S	S
11	Pe	N	N	N	N	N	S	S	S
12	P	N	S	S	S	S	S	S	S
13	P	N	S	S	S	S	S	S	S
14	P	B	S	S	S	S	S	S	S
15	P	N	S	S	S	S	S	S	S
16	P	N	N	N	N	N	N	S	S

Tabla R6. Características de las muestras analizadas y procedimientos realizados. Columna A: número de paciente. Columna B: procedencia de la muestra analizada (P: tumor primario. Pe: metástasis peritoneal). Columna C: tratamientos administrados previo a la adquisición de la muestra tumoral (N: ninguno. a: radioterapia y capecitabina. b: quimioterapia basada en FOLFOX + panitumumab y FOLFIRI + bevacizumab). En el resto de columnas, S indica que sí se ha analizado la variable especificada, N que no, y NE significa no evaluable. Fn: *Fusobacterium nucleatum*.

6.3. TMB, mutaciones *indels* y beneficio a PD-1/PD-L1 inh

La determinación del TMB en los tumores de los pacientes incluidos en la cohorte de estudio se realizó tal y como se es específica en los apartados 5.4. y 5.5. La mediana del valor de TMB en el global de la cohorte fue de 41.4 mutaciones/Mb (rango 8.4 – 70), y según los grupos, fue de 47.2 mutaciones/Mb (rango 26.6 - 70.0) en el grupo IT-resist, y 38.8 mutaciones/Mb (rango 8.4 – 60.1) en el grupo IT-respond. La correlación entre el TMB y el beneficio a PD-1/PD-L inh fue negativa dado que los niveles fueron mayores en el grupo IT-resist, aunque sin alcanzar la significación estadística ($p=0.125$), tal y como se refleja en la figura R7.

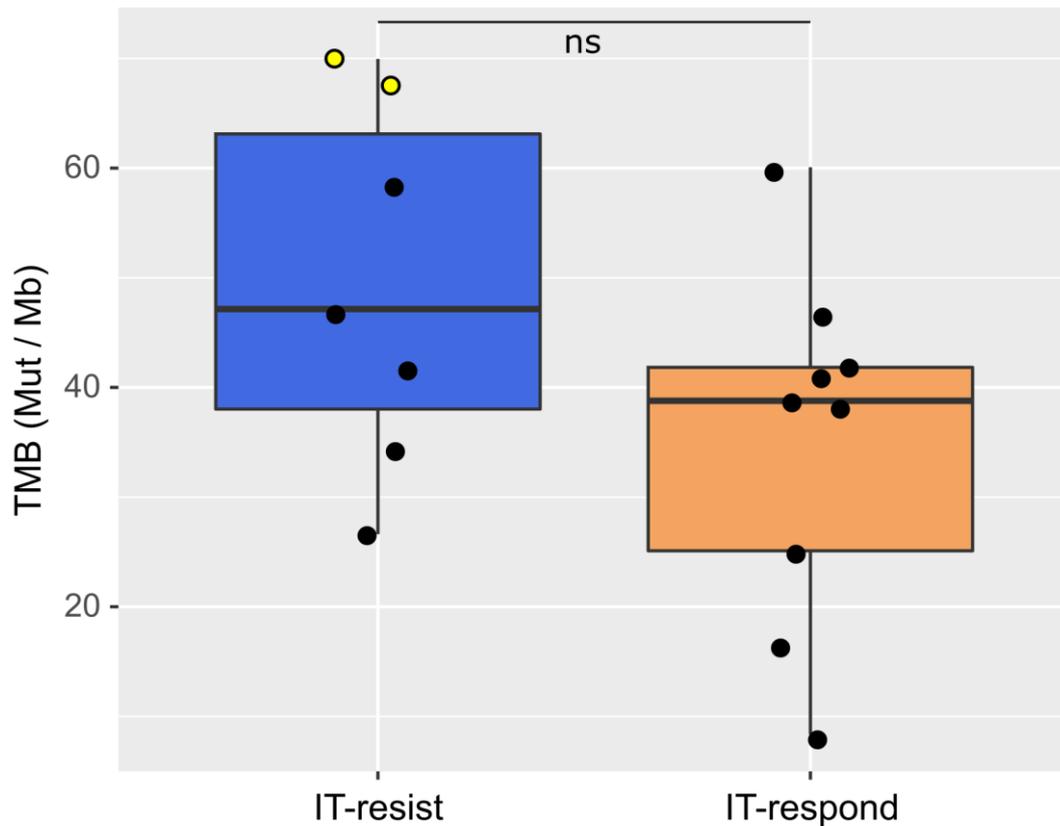


Figura R7. *Boxplot* que representa el TMB segregado de acuerdo a los grupos IT-resist e IT-respond, indicando la mediana de TMB en cada uno de ellos. Cada punto representa un paciente de la cohorte. Los puntos amarillos representan los pacientes con los valores más elevados de TMB de la cohorte

Cabe destacar que los pacientes 10 y 14 presentaron los valores más altos de TMB de toda la cohorte (valores de 69.96 mutaciones/Mb y de 67.68 mutaciones/Mb, respectivamente), pese a que ambos pertenecían al grupo de IT-resist, y presentaron SD y PD como mejor respuesta a PD-1/PD-L1 inh, respectivamente (Figura R5).

La mediana de mutaciones *indels* en el global de la cohorte fue de 13.5 mutaciones/Mb (rango 2 – 24), representando un 25% del total de mutaciones. No se observaron diferencias significativas entre la mediana de *indels* en el grupo IT-respond que fue de 11 mutaciones/Mb (rango 2 – 20), en comparación con la mediana en el grupo IT-resist que fue de 16 mutaciones/Mb (rango 7 - 24) ($p= 0.138$), ni tampoco en la mediana de la proporción que estas mutaciones representaban del total (22% en el grupo IT-respond *versus* 25.5% en el grupo IT-resist, $p= 0.832$).

En relación a las firmas mutacionales obtenidas mediante el análisis realizado a través de COSMIC [97], toda la cohorte presentó una firma destacable de *small indels* compatible con el fenotipo MSI-H/dMMR. La mediana de la proporción que dicha firma representó del total de firmas definidas por COSMIC fue de 0.5 para el global de la cohorte, y también el mismo valor para los grupos IT-respond e IT-resist, sin hallar por tanto diferencias significativas entre ellos ($p= 0.936$). Otras firmas COSMIC objetivadas en la cohorte de estudio fueron la firma BRCA1/BRCA2, la firma de luz ultravioletada, la firma POLE, la firma de agentes alquilantes, la firma APOBEC y la firma de aflatoxinas, aunque no se observó predominancia de ninguna de ellas en el grupo IT-respond o en el grupo IT-resist.

En el Anexo 1 se encuentra la tabla donde se especifican todos los valores obtenidos en relación a los parámetros descritos para el global de la cohorte y para cada grupo (media, desviación estándar, mediana, valor mínimo, valor máximo y rango intercuartílico)

6.4. Perfil genómico de la cohorte y beneficio a PD-1/PD-L1 inh

Tal y como se ha comentado en el apartado 5.5, la secuenciación de los tumores MSI-H/dMMR de los pacientes incluidos en la cohorte de estudio se llevó a cabo mediante el panel VHIO-Card_300 v2. Los genes que con mayor prevalencia asociaron mutaciones patogénicas están representados en la Figura R8, contemplando tanto mutaciones monoalélicas o bialélicas (Figura R8A), como únicamente mutaciones bialélicas (Figura R8B). Las mutaciones bialélicas fueron determinadas con fiabilidad porque no se identificaron alteraciones significativas en relación a ganancias o pérdidas en número de copias y/o pérdida de heterocigosidad. Los genes destacados por la frecuencia de mutaciones patogénicas pertenecen a vías de señalización relacionadas con la carcinogénesis del cáncer colorrectal, como la de Wnt (genes *APC*, *RNF43*, *CTNNB1*), la de MAPK (genes *KRAS*, *BRAF*, *EGFR*) o la de PI3K (genes *PTEN*, *PIK3CA*), vías de señalización relacionadas con el procesamiento y presentación antigénica (*B2M*) y con la respuesta mediada por interferón (*JAK1*, *JAK2*, *JAK3*), y también destacaron genes codificantes de reguladores genéticos (*TP53*) y epigenéticos (*ARID1A*) y genes pertenecientes al sistema MMR (*MLH1*, *MSH6*, *MSH2*) (Figura R8).

Se desestimó realizar comparaciones estadísticas en relación a genes individuales mutados entre el grupo IT-respond e IT-resist por el número limitado de pacientes. No obstante, las mutaciones patogénicas en los genes *CTNNB1*, *EGFR* y *B2M* se hallaron enriquecidas en el grupo IT-resist (2 pacientes, 2 pacientes, 4 pacientes, respectivamente), en

comparación con el grupo IT-respond (0 pacientes, 0 pacientes, 2 pacientes, respectivamente) (Figura R8A). Las mutaciones bialélicas en el gen supresor tumoral *APC* y en los genes relacionados con el sistema del MMR se relacionaron con los mecanismos subyacentes de carcinogénesis. Concretamente, mutaciones bialélicas en *MLH1*, *MSH2* y *MSH6* se objetivaron en 3 de los 4 pacientes afectados de SL (pacientes 1, 3 y 7) (Figura R8B).

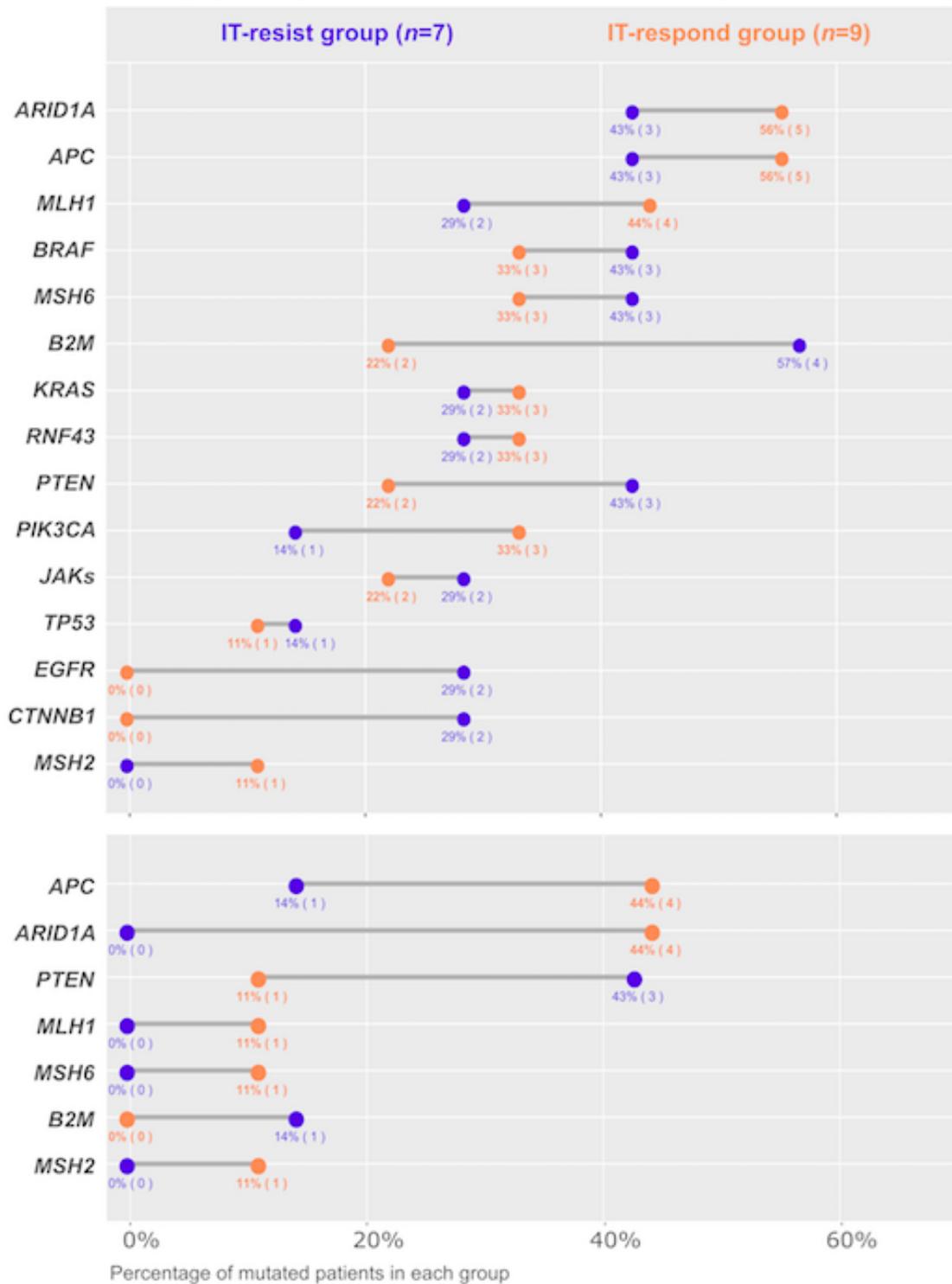


Figura R8. *Dumbbell plot* que representa el perfil mutacional de la cohorte de estudio. El porcentaje de pacientes que presentaron mutación en un determinado gen y el número absoluto de pacientes

entre paréntesis están representados en naranja para el grupo IT-respond y en azul para el grupo IT-resist. La figura R8A (parte superior) contempla cualquier mutación (monoalélica o bialélica). La figura R8B (parte inferior de la figura) contempla sólo mutaciones bialélicas.

Las mutaciones patogénicas en *PTEN* y *ARID1A* se distribuyeron entre el grupo de IT-resist e IT-respond, con una frecuencia general del 31% (5 de 16 pacientes del total de la cohorte) y del 50% (8 de 16 pacientes del total de la cohorte), respectivamente (Figura R8A). No obstante, fue destacable que las mutaciones bialélicas en *ARID1A* fueron halladas únicamente en el grupo IT-respond, concretamente en el 44% de los pacientes de dicho grupo (4 de 9 pacientes del total del grupo IT-respond *versus* 0 pacientes en el grupo IT-resist). Por el contrario, las mutaciones bialélicas en *PTEN* estaban enriquecidas en el grupo de IT-resist, concretamente, en el 43% de los pacientes de dicho grupo *versus* el 11% de los pacientes del grupo IT-respond (3 pacientes de 7 del total del grupo IT-resist *versus* 1 paciente de 9 del total del grupo IT-respond, respectivamente) (Figura R8B). Con el fin de contextualizar estos resultados, se realizó una consulta a la base de datos pública cBioportal [98], la cual dispone de información de 1134 tumores colorrectales con el estatus del sistema del MMR conocido, aunque no sobre si los pacientes han sido tratados con inmunoterapia. La tasa de mutaciones globales identificadas en *ARID1A* y *PTEN* tras analizar 105 pacientes con cáncer colorrectal MSI-H/dMMR mediante la plataforma MSK-IMPACT [105] fue del 55.2% y 32.4%, respectivamente. En la cohorte

de estudio y como se ha mencionado, el 50% y el 31% de los tumores asociaban mutaciones en *ARID1A* y *PTEN*, respectivamente, indicando por tanto una diversidad adecuada de la muestra, pese al tamaño de la misma. No obstante, cuando se consideraron únicamente las mutaciones bialélicas, se constataron más divergencias entre la cohorte de estudio y cBioportal, dado que la tasa de mutaciones bialélicas en *ARID1A* y *PTEN* fue del 25% en ambos casos en la cohorte de estudio (4 de 16 pacientes del total de la cohorte para cada gen) (Figura R8B), pero del 14.3% y del 13.3% según cBioportal, respectivamente [98].

6.5. Densidades linfocitarias, expresión de PD-L1, y beneficio a PD-1/PD-L1 inh

Los análisis de las densidades linfocitarias y expresión de PD-L1 se llevaron a cabo mediante los procedimientos especificados en el apartado 5.6.

En relación a las poblaciones linfocitarias, los linfocitos CD3⁺ se pudieron determinar en 12 de los 16 pacientes de la cohorte (en 7 de 9 pacientes del grupo IT-respond y en 5 de 7 pacientes del grupo IT-resist), los linfocitos CD8⁺ en 11 de los 16 pacientes de la cohorte (en 6 de 9 pacientes del grupo IT-respond y en 5 de 7 pacientes del grupo IT-resist), y los linfocitos FOXP3⁺ en 12 de 16 pacientes de la cohorte (en 7 de 9 pacientes del grupo IT-respond y en 5 de 7 pacientes del grupo IT-resist) (Tabla R6).

Las medianas de densidad de linfocitos CD3⁺, de linfocitos CD8⁺ y de linfocitos FOXP3⁺ fueron de 857/mm² (rango 282 – 1517), de 413/mm² (rango 110 - 1081) y de 41/mm² (rango 9 – 142), respectivamente, para el

global de la cohorte. La mediana de densidad de todas las poblaciones linfocitarias fue mayor en los tumores de los pacientes clasificados en el grupo IT-respond, en comparación con el grupo IT-resist. Concretamente, la mediana de densidad linfocitaria para CD3⁺, CD8⁺ y FOXP3⁺ en el grupo de IT-respond *versus* IT-resist fue de 885/mm² (rango 507-1517) *versus* 541/mm² (rango 282-925) ($p= 0.106$), 459/mm² (rango 334-1081) *versus* 242/mm² (rango 110-496) ($p= 0.126$), y 69/mm² (rango 34-142) *versus* 16/mm² (rango 9 – 42) ($p = 0.01$), respectivamente, siendo las diferencias estadísticamente significativas en linfocitos FOXP3⁺ (Figura R9).

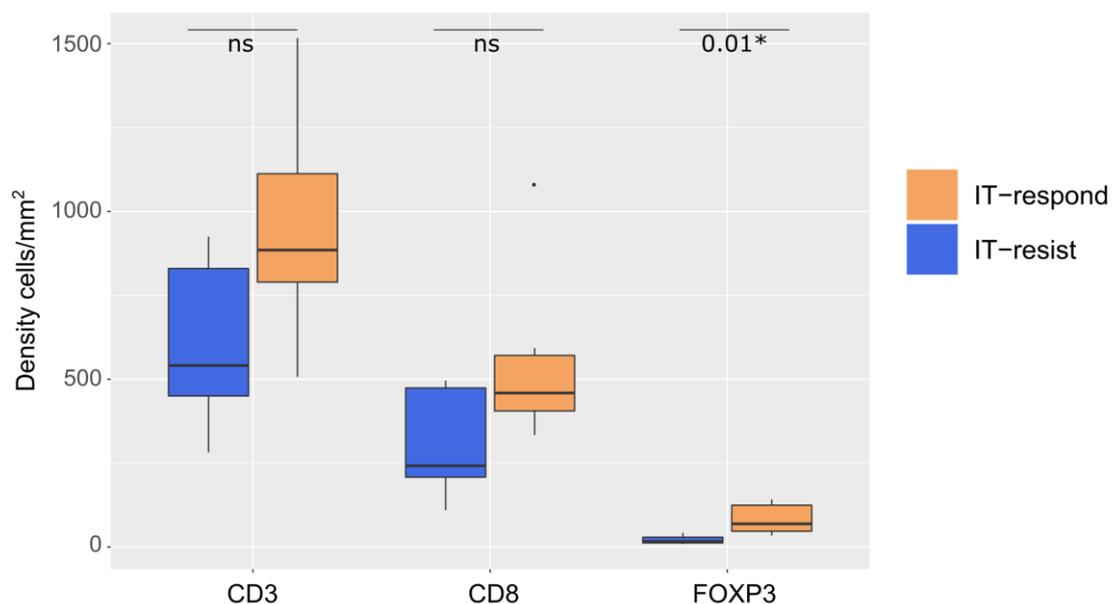


Figura R9. *Boxplot* que representa las densidades de linfocitos CD3⁺, CD8⁺ y FOXP3⁺ de acuerdo al grupo IT-respond e IT-resist. Para cada subpoblación linfocitaria, se indica la mediana de densidad en cada grupo, así como la comparación estadística entre ellos.

La determinación de PD-L1 se realizó en 10 de 16 pacientes de la cohorte (en 6 de 9 pacientes del grupo IT-respond y en 4 de 7 pacientes del grupo IT-resist)(Tabla R6). La mediana de PD-L1 de la cohorte según el CPS fue de 5 (rango 1 – 90), y se observaron diferencias no significativas entre la mediana del grupo IT-respond, que fue de 7.5 (rango 1 – 90), comparada con la del grupo IT-resist, que fue de 3.5 (rango 1 – 5) ($p= 0.444$), siendo por tanto el grupo IT-respond el que presentó unos niveles mayores de PD-L1.

En el Anexo 1 se encuentra la tabla donde se especifican todos los valores obtenidos en relación a los parámetros descritos para el global de la cohorte y para cada grupo (media, desviación estándar, mediana, valor mínimo, valor máximo y rango intercuartílico)

6.6. *Fusobacterium nucleatum* y beneficio a PD-1/PD-L1 inh

Los análisis de *Fusobacterium nucleatum* se realizaron mediante los procedimientos especificados en el apartado 5.7. y, concretamente, en 12 de los 16 pacientes de la cohorte (en 6 pacientes de 9 del grupo IT-respond, y en 6 pacientes de 7 del grupo IT-resist) (Tabla R6).

La presencia de *Fusobacterium nucleatum* se detectó en todas las muestras analizadas, excepto en el caso de la paciente 11, aunque con un rango de densidad muy variable de entre 0 y 467 bacterias/mm², con una mediana de 4.5 bacterias/mm² para el global de la cohorte. Entre el grupo IT-respond e IT-resist no hubo diferencias significativas en los niveles de *Fusobacterium nucleatum*, con una mediana de densidad de 2.5

bacterias/mm² y 6.5 bacterias/mm², respectivamente ($p=0.936$). No obstante, cuando se tuvo en cuenta la positividad de la bacteria de acuerdo al dintel definido en el apartado 5.7, 4 pacientes del grupo IT- respond presentaron *Fusobacterium nucleatum* positivo, en comparación con los 2 pacientes del grupo IT-respond.

En el Anexo 1 se encuentra la tabla donde se especifican todos los valores obtenidos en relación al análisis como variable continua de *Fusobacterium nucleatum* para el global de la cohorte y para cada grupo (media, desviación estándar, mediana, valor mínimo, valor máximo y rango intercuartílico)

6.7. Discordancias entre IHQ y PCR y beneficio a PD-1/PD-L1 inh

La determinación del fenotipo MSI-H/dMMR por IHQ y PCR se realizó tal y como está expuesto en el apartado 5.8. El análisis mediante IHQ pudo llevarse a cabo en todos los pacientes de la cohorte, excepto en el paciente 8, y también el análisis mediante PCR, excepto en la paciente 6, cuyo resultado fue no evaluable (Tabla R6). Pese a que tal y como se ha comentado en el apartado 6.3. toda la cohorte presentó una firma *indels* compatible con el fenotipo MSI-H/dMMR de acuerdo con el análisis mediante COSMIC [97], se detectaron discordancias entre los resultados obtenidos mediante PCR y los obtenidos mediante IHQ. Específicamente, en 3 de los 14 casos de la cohorte en los que fue factible realizar ambas técnicas a nivel central, los resultados de la PCR fueron compatibles con MSS, si bien la IHQ fue concluyente con dMMR (Tabla R10). Estos 3 casos

corresponden al grupo IT-resist. En el caso del paciente 12 del cual se disponía de la pieza quirúrgica, se determinó la homogeneidad del fenotipo dMMR en diferentes puntos representativos de la pieza tumoral, obteniendo los mismos resultados en todos ellos (es decir, pérdida de expresión nuclear de MLH1/PMS2).

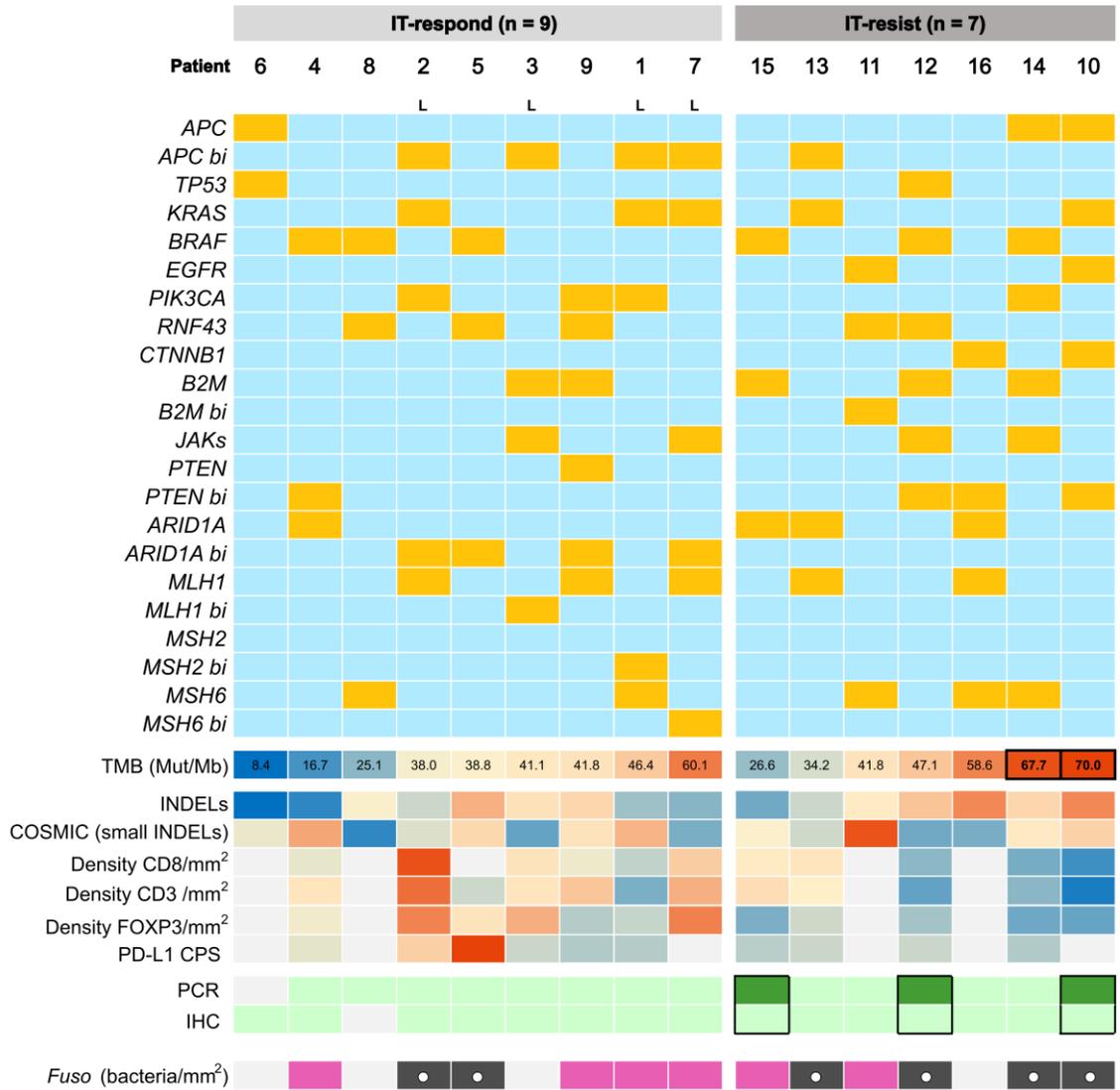
	IHQ	PCR
1	MSH2	BAT25,BAT26,NR-21,NR-24,MONO-27
2	MLH1/PMS2	BAT25,NR-21,NR-24,MONO-27
3	MLH1/PMS2	BAT25,BAT26,NR-21,NR-24,MONO-27
4	MLH1/PMS2	BAT25,BAT26,NR-21,NR-24,MONO-27
5	MLH1/PMS2	BAT25,BAT26,NR-21,NR-24,MONO-27
6	MLH1	No evaluable
7	MSH6	BAT25, BAT26,MONO27
8	No determinado	BAT26,NR21,NR24,MONO27
9	MLH1/PMS2	BAT25,NR21,NR24,MONO-27
10	MLH1/PMS2	Ninguno
11	MLH1/PMS2	BAT25,BAT26,MONO27
12	MLH1/PMS2	MONO27
13	MLH1/PMS2	BAT25,NR-21,NR-24,MONO-27
14	PMS2	MONO27,NR24,BAT25
15	MLH1/PMS2	Ninguno
16	MLH1/PMS2	MONO27,NR24,NR21,BAT25

Tabla R10. Resultados del análisis del fenotipo MSI-H/dMMR en cada paciente de la cohorte (en la columna izquierda se indica el número de paciente). Para la IHQ, se detallan las proteínas que presentaron pérdida de expresión nuclear. Para la PCR, se detallan los MS que

presentaron inestabilidad. En rojo están señalados los pacientes con discordancias entre técnicas.

6.8. Descripción integrada de resultados

En la Figura R11 están representados para cada paciente los resultados del perfil mutacional, tanto para mutaciones monoalélicas como bialélicas (especificadas con *bi* detrás del gen), los valores de TMB, la proporción que las mutaciones *indels* representan del total de mutaciones, la proporción que la firma *indels* de COSMIC [97] representa del total de firmas, las densidades de las diferentes subpoblaciones linfocitarias, los valores de PD-L1, si el resultado de la PCR fue compatible según la revisión central con MSS o MSI, si el resultado de la IHQ fue compatible según la revisión central con dMMR o pMMR, así como la positividad/negatividad de *Fusobacterium nucleatum* como variable categórica según el dintel descrito en el apartado 5.7. Los datos utilizados para la realización de la figura R11 se encuentran en el Anexo 2.



Status

- mutated
- wild type
- dMMR/MSI-H
- pMMR/MSS
- Missing value
- Positive
- Negative

Z-scores & TMB values

min median max

Figura R11. *Heatmap* que representa los resultados obtenidos a partir de los múltiples análisis. Destacar que para TMB, rojo indica el valor máximo de la cohorte, amarillo la mediana de la cohorte, y azul el valor mínimo. Para el resto de parámetros numéricos, los valores se transformaron a *z-score* (número de desviaciones estándar respecto la media de un determinado parámetro) para facilitar su representación gráfica.

Como se puede observar, en el grupo IT-respond se encontraron los tumores con mayor densidad linfocitaria, tanto para CD3⁺, CD8⁺ y FOXP3⁺, así como los tumores con mayores niveles de PD-L1 según el CPS. A destacar que los tumores de los pacientes 2 y 7, ambos afectados de SL, son los que presentaron los mayores niveles de infiltración linfocitaria de las tres subpoblaciones de toda la cohorte, y ambos son portadores de mutaciones bialélicas en *ARID1A*. Asimismo, el tumor del paciente 5, también portador del mencionado perfil mutacional, es el que presentó el nivel más elevado de PD-L1 de la cohorte. Por el contrario, en el grupo IT-resist, se hallaron los tumores con menor densidad linfocitaria de las tres subpoblaciones (pacientes 10 y 12), destacando que fueron los que presentaron mutaciones bialélicas en *PTEN*. Es reseñable que los pacientes con mayor TMB de la cohorte (pacientes 10 y 14), fueron clasificados en el grupo IT-resist y, además, la paciente 10 es la que presentó la densidad linfocitaria más baja de la cohorte para el global de subpoblaciones. En este caso en concreto, a parte de la mutación bialélica en *PTEN*, también se constató una mutación patogénica en *CTNNB1*.

Finalmente, en el grupo IT-resist hay una mayor representación de tumores con *Fusobacterium nucleatum* positivo, siendo la paciente 10 la que asoció los valores más altos, con 467 bacteria/mm².

7. Discusión

7.1. Perfil clínico de la cohorte de estudio y patrones de respuesta a PD-1/PD-L1 inh

La cohorte de estudio está formada por 16 pacientes afectados de cáncer colorrectal avanzado con fenotipo MSI-H/dMMR, tratados con PD-1/PD-L1 inh en el Hospital Vall d'Hebron. La media de edad al diagnóstico fue de 55 años, en relación al sexo, el 56.3% fueron mujeres, y en relación a la localización tumoral, el 56.2% estaban localizados en colon derecho. Este perfil fue el esperable, dado que el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR es más común en mujeres y se localiza con mayor frecuencia en colon derecho [5] [6] [57]. La mediana de seguimiento de la cohorte fue de 56.4 meses, y se obtuvo una mediana de OS del periodo metastásico de 63.9 meses. El tratamiento con PD-1/PD-L1 inh claramente contribuyó a alcanzar una supervivencia global tan elevada, dado que el fenotipo MSI-H/dMMR se postula como un factor pronóstico negativo en el cáncer colorrectal avanzado. De hecho, un meta-análisis reciente que incluyó más de 92000 pacientes, 11746 de ellos con tumores MSI-H/dMMR, ha concluido que dicho fenotipo se asocia a mejor OS en estadios II y III, en parte por el mayor grado de inmunovigilancia al que están sometidos los tumores, pero no tiene ninguna influencia en estadios IV sin el efecto de la inmunoterapia [58]. El análisis del fenotipo MSI-H/dMMR como factor pronóstico en el cáncer colorrectal metastásico es complicado dada su baja incidencia [57][83], y asocia la duda de la potencial influencia de las mutaciones en el gen *BRAF*, las cuales claramente implican un pronóstico ominoso [106]. Un

pooled análisis de cuatro estudios fase III en primera línea de tratamiento para enfermedad avanzada concluyó que el fenotipo MSI-H/dMMR se correlaciona con una menor OS, pero con un insignificante efecto negativo de la mutación en *BRAF* [107], de forma similar a un estudio retrospectivo francés [108]. Contrariamente, otros estudios apuntan que la OS de pacientes con cáncer colorrectal avanzado MSI-H/dMMR es de alrededor de 11 meses, y debido a la frecuente coexistencia de la mutación V600E en *BRAF* [109]. De todas formas, es importante destacar que los trabajos mencionados no incluyeron pacientes tratados con inmunoterapia, la cual ha supuesto un cambio de paradigma para los tumores colorrectales MSI-H/dMMR, también en los que asocian mutaciones en *BRAF*. Por ejemplo, en la cohorte de estudio, los pacientes 4 y 5 presentan una larga supervivencia pese a tener tumores con el mencionado perfil molecular.

En relación a la mediana de PFS de la cohorte, ésta fue de 14.54 meses, similar a la obtenida en la cohorte de nivolumab del estudio CHECKMATE-142 [68], aunque las comparaciones con los ensayos clínicos descritos en el apartado 1.5.1. deben interpretarse con cautela dado que el presente estudio ha incluido diferentes regímenes de tratamiento, en diferentes escenarios de la enfermedad metastásica.

Por el número de pacientes incluidos en los grupos IT-resist e IT-respond se descartó hacer comparaciones formales en relación a las diferentes características mencionadas en la Tabla R1. No obstante, cabe destacar que todos los pacientes con SL se clasificaron en el grupo IT-respond, aunque los estudios clínicos no han determinado este antecedente como un factor predictivo de respuesta a inmunoterapia [64][68][69], así como

todos los pacientes que recibieron PD-1/PD-L1 inh en primera línea de enfermedad avanzada, coincidiendo con los mejores resultados que se han obtenido en los estudios clínicos que han evaluado la inmunoterapia *upfront* [70][72]. La administración de PD-1/PD-L1 inh en combinación con otras drogas no aportó mayor tasa de pacientes clasificados como IT-respond (Tabla R1), aunque ninguna de estas combinaciones incluyó un inhibidor de CTLA4. En relación a las combinaciones con bevacizumab, un estudio fase Ib evaluó la combinación de bevacizumab 15 mg/kg con atezolizumab 1200 mg cada 3 semanas en 10 pacientes pre-tratados con cáncer colorrectal MSI-H/dMMR. La RR según criterios RECIST v1.1 fue del 30%, la cual no difiere de las de los estudios que evaluaron PD-1/PD-L1 inh en monoterapia, aunque se trata de comparaciones indirectas [110]. Actualmente, se encuentran pendientes los resultados del estudio clínico con atezolizumab y bevacizumab para pacientes con firma transcriptómica *MSI-like*, englobado dentro del proyecto europeo MOTRICOLOR. Finalmente, la toxicidad a PD-1/PD-L1 inh grado 3 o mayor concuerda con la reportada, dado que sólo una paciente (6.2% del global), presentó una hepatitis inmunomediada grado 3 resuelta tras parar pembrolizumab.

7.2. Discusión de TMB, mutaciones *indels* y beneficio a PD-1/PD-L1 inh.

La mediana del valor de TMB de la cohorte obtenido mediante el panel VHIO-Card_300 v.2 fue de 41.4 mutaciones/Mb, un valor elevado y por encima de 12 mutaciones/Mb, que es el valor de TMB a partir del cual el proyecto TCGA de cáncer colorrectal define los tumores hipermutados [5].

Uno de los objetivos primarios del estudio fue correlacionar el valor del TMB con el beneficio a PD-1/PD-L1 inh, y se objetivó que la mediana de TMB del grupo IT-resist fue mayor que la del grupo IT-respond, de 47.2 mutaciones/Mb versus 38.8 mutaciones/Mb, respectivamente, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura R7). De entrada, estos resultados no fueron los esperados dado que el TMB se ha postulado como un biomarcador de sensibilidad a inmunoterapia y, de hecho, la FDA aprobó en junio de 2020 pembrolizumab para tumores avanzados refractarios a tratamiento estándar en pacientes adultos o pediátricos y con TMB igual o mayor a 10 mutaciones/Mb. Esta aprobación parte de un análisis retrospectivo aunque planeado de forma prospectiva de 10 cohortes de pacientes con diferentes tumores incluidos dentro del estudio KEYNOTE-158. De 1066 pacientes tratados, el valor del TMB estuvo disponible para su análisis en tejido mediante *Foundation One CDx* assay en 805 de ellos, observando que la RR en los pacientes con TMB elevado según el dintel especificado fue del 29%, mientras que en el grupo de TMB bajo fue del 6% [111]. Focalizando en el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR, en un trabajo en modelos murinos singénicos tratados con PD-1 inh observaron que los tumores que habían acumulado mayor número de mutaciones presentaron mejor respuesta al tratamiento [112]. En el contexto clínico, un estudio que incluyó 22 pacientes tratados con PD-1/PD-L1 inh objetivó que un punto de corte de TMB comprendido entre 37-41 mutaciones/Mb discriminó significativamente a los pacientes que habían presentado CR o PR como mejor respuesta a la inmunoterapia, de aquellos que habían presentado SD/PD [113]. Asimismo, concluyeron que un valor

de TMB de 61.8 mutaciones/Mb correspondía al percentil 75 de TMB del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR, tras analizar este parámetro en más de 800 tumores con dicha histología utilizando la base de datos de *Foundation Medicine*. Cabe destacar que los pacientes con los valores de TMB más altos de nuestra cohorte (pacientes 10 y 14) tenían un TMB por encima de 61.8 mutaciones/Mb, pese al cual se clasificaron en el grupo IT-resist, aunque en el paciente 14 la influencia de la quimioterapia previa en la muestra analizada pudo haber contribuido a un valor tan elevado [114]. Los resultados de nuestro estudio, por tanto, ponen de manifiesto las limitaciones del TMB como factor predictivo de respuesta a inmunoterapia de forma aislada por diferentes motivos. Es un parámetro altamente variable entre tumores, dependiendo de si son tumores con elevada carga mutacional *per se*, como los relacionados con los rayos ultravioleta, el tabaco o los que presentan fenotipo MSI-H/dMMR, o no, dificultando por tanto que pueda existir un dintel de TMB “universal” [115]. Además, hay tumores en los que los PD-1/PD-L1 inh ya son parte de la práctica clínica habitual con un promedio de TMB más bajo que otros resistentes a inmunoterapia, siendo ejemplo de los primeros el carcinoma renal de células claras y el carcinoma de Merkel [116]. En un análisis reciente que evaluó el TMB como factor predictivo de OS a inhibidores de *immune checkpoint* en cáncer colorrectal, el TMB no demostró capacidad predictiva de OS cuando se estratificaron los pacientes de acuerdo a fenotipo MSI-H/dMMR o MSS/pMMR, indicando por tanto que el beneficio al tratamiento no estaba determinado por el TMB, si no por la alteración de dicho sistema de reparación del DNA [117]. El cálculo del TMB tampoco contempla la

inmunogenicidad de las mutaciones, dado que si bien las *frameshift* generan una mayor ratio de neoantígenos [42], las mutaciones no sinónimas menos inmunogénicas son las que suelen marcar las determinaciones de TMB. Tampoco existe un consenso claro acerca de las técnicas a utilizar para la determinación del TMB. Inicialmente, se analizaba mediante WES, que cubre 30 Mb, pero dado su coste económico y de proceso, los paneles génicos han emergido como potenciales alternativas. Es importante que dichos paneles incluyan un tamaño genómico a analizar adecuado, el cual permita extrapolar con exactitud la carga mutacional global [118]. El tamaño del panel VHIO-Card_300v2 es de 1.35 Mb, a diferencia del panel *FoundationOne CDx*, que cubre 0.8 Mb. Otra limitación añadida es que el TMB en los tumores MSI-H/dMMR puede variar según la causa subyacente. Por ejemplo, en una serie de 1057 tumores con diferentes histologías MSI-H/dMMR, la pérdida expresión de MLH1/PMS2 se asoció a un TMB estimado de 25.03 mutaciones/Mb, a diferencia de los tumores con pérdida de MSH2/MSH6, cuyo TMB fue de 46.83 mutaciones/Mb, siendo estas diferencias estadísticamente significativas [119]. Por último, la muestra sobre la cual se determina el TMB también es importante, dado que la influencia de la quimioterapia, sobre todo la basada en platinos, puede inducir la generación de mutaciones sin ser éstas inmunogénicas [114], como podría haber sido el caso del paciente 14.

En relación a la correlación de las mutaciones *frameshift* con el beneficio a PD-1/PD-L1 inh, uno de los objetivos secundarios del estudio, no se observaron diferencias entre el grupo IT-resist e IT-respond en las

medias de mutaciones *indels*, ni en las de la proporción que las mutaciones *indels* representaban del total. No obstante, el valor de las mutaciones *frameshift* como factor predictivo de respuesta a inmunoterapia en cáncer colorrectal MSI-H/dMMR podría ser dudoso, dado que un trabajo reciente realizado en muestras de pacientes con tumores colorrectales y de endometrio MSI-H/dMMR apunta a que a lo largo de la evolución de los tumores MSI-H/dMMR, hay una selección negativa de las mutaciones *frameshift* que darían lugar a neoantígenos inmunogénicos, los cuales se perderían durante la progresión tumoral [120]. De hecho, una mayor carga de neoantígenos asociados a mutaciones se correlacionó con una mejor PFS a pembrolizumab en el estudio KEYNOTE-016 [64], tal y como se ha mencionado en el apartado 2. En el presente trabajo, la determinación de neoantígenos se desestimó por limitaciones técnicas sobre todo en obtener el HLA clase 1 en una muestra representativa de pacientes. No obstante, el análisis de neoantígenos se ve limitado porque no tiene en cuenta la clonalidad del receptor de células T para un determinado antígeno tumoral, factor importante en la respuesta inmune antitumoral [121]. A modo exploratorio, la expansión de linfocitos T específicos contra ciertos antígenos tumorales de forma temprana se asoció a una mejor respuesta a pembrolizumab en múltiples histologías MSI-H/dMMR [67].

7.3. Discusión del perfil genómico de la cohorte y beneficio a PD-1/PD-L1 inh

El perfil genómico de la cohorte de estudio se determinó mediante el panel VHIO-Card_300 v2 y, de forma general, los genes que con mayor

frecuencia presentaron mutaciones patogénicas (Figura R8) fueron los previamente descritos en el apartado 1.3.4. para los tumores colorrectales MSI-H/dMMR.

En relación a las diferencias observadas entre el grupo IT-respond e IT-resist, destacar que las mutaciones en *RAS* y *BRAF* se distribuyeron en ambos grupos sin un patrón específico. Estos hallazgos concuerdan con los resultados de los estudios clínicos CHECKMATE-142 [68][69], KEYNOTE-164 [71] y KEYNOTE-177 [72] expuestos en el apartado 1.5.2., aunque a raíz del último ha emergido la hipótesis de la sensibilidad a pembrolizumab en tumores colorrectales MSI-H/dMMR y *KRAS* mutados. En este sentido, nuestro análisis no aporta nuevos datos al respecto, pero se dispone de evidencia preliminar que apunta a una menor inmunogenicidad de la enfermedad *RAS* mutada. Por ejemplo, un trabajo realizado mediante análisis de expresión de una firma inmune focalizada en la respuesta *T helper 1*, el cual incluyó más de 500 muestras procedentes de dos cohortes diferentes, objetivó que los tumores colorrectales *KRAS* mutados tenían menor *score* de la firma en los 4 grupos CMS, siendo las diferencias más marcadas en el CMS2 [122]. No obstante, estos hallazgos requieren de mayor validación, además considerando que se desconoce el estatus mutacional de *RAS* en un tercio de los pacientes randomizados en el brazo de pembrolizumab del estudio KEYNOTE-177 [72] y, por tanto, este hecho podría influir en el resultado del análisis de subgrupos.

El estudio del perfil mutacional potencialmente asociado a la respuesta a PD-1/PD-L1 inh era uno de los objetivos secundarios del estudio. Si bien no se realizaron comparaciones estadísticas formales en relación a los genes

mutados entre el grupo IT-respond e IT-resist, en el segundo las mutaciones en *CTNNB1*, *EGFR* y *B2M* se encontraron enriquecidas (Figura R8A). De entre los genes mencionados, únicamente la relación entre las mutaciones en *B2M* y la respuesta a inmunoterapia en cáncer colorrectal MSI-H/dMMR ha sido discutida en la literatura. *B2M* es una proteína esencial para la presentación antigénica por parte del CMH tipo I, y su pérdida de expresión como consecuencia de alteraciones en el gen codificante se estima en el 19% del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR localizado, dado que los MS que se encuentran en los exones son particularmente vulnerables a ser inestables [123]. Las mutaciones en *B2M* han sido postuladas como un mecanismo de resistencia a pembrolizumab tanto primaria en un caso, como secundaria en otro [67][124]. Dichas mutaciones se tratarían, por tanto, de un mecanismo de resistencia inmune adaptativa mediada por la disfunción en la presentación antigénica para contrarrestar el mayor grado de inmunovigilancia al cual están sometidos los tumores MSI-H/dMMR. En este sentido, mutaciones en *B2M* se han asociado con otros mecanismos de resistencia adaptativa, como la mayor expresión de PD-1 en los linfocitos del infiltrado tumoral [125], aunque estos resultados son discordantes según otra serie [126]. Por otro lado, un estudio descriptivo ha relacionado la elevada presencia de las llamadas *high endothelial venules*, especializadas en el tráfico linfocitario al nicho tumoral, con la presencia de mutaciones *B2M*, ejemplificando de nuevo la importancia de este fenómeno de evasión de respuesta inmune tumoral y de la interrelación entre las alteraciones intrínsecas y extrínsecas de las células tumorales [127]. No obstante y pese a la base molecular detallada,

las mutaciones en *B2M* podrían no ser suficientes para mediar la inmunoresistencia, o bien ésta podría estar condicionada según si las mutaciones son monoalélicas o bien bialélicas, determinando así una pérdida completa de expresión proteica [128]. De hecho, en una serie de 13 pacientes con cáncer colorrectal MSI-H/dMMR tratados con inmunoterapia, un 85% de los que presentaban mutaciones en dicho gen presentó beneficio clínico definido por SD o PR [126]. De forma similar, en nuestro estudio los pacientes 3 y 9 se clasificaron en el grupo IT-respond pese a presentar mutaciones monoalélicas en *B2M*, aunque el que presentó una mutación bialélica se clasificó en el grupo IT-resist (paciente 11) (Figura R8B y Figura 11). La presencia de mutaciones patogénicas en otros genes involucrados en el procesamiento y presentación antigénica como *TAP1*, *TAP2* y *NLRC5* no se observaron en la cohorte de estudio, aunque su frecuencia oscila entre el 3% y 6% en los tumores colorrectales MSI-H/dMMR [129], y hasta la fecha no se ha descrito su relación con la respuesta a inmunoterapia.

Las mutaciones en los genes *PTEN* y *ARID1A* presentaron una prevalencia general en la cohorte del 31% y 50%, respectivamente, y concordante con los datos publicados para cáncer colorrectal MSI-H/dMMR en cBioportal [98]. Concretamente, las mutaciones bialélicas en ambos genes se consideraron un hallazgo relevante, dado que las de *ARID1A* fueron objetivadas únicamente en el grupo IT-respond (4 de 9 pacientes), y las de *PTEN* estaban enriquecidas en el grupo IT-resist (3 pacientes de 7 del total del grupo IT-resist *versus* 1 paciente de 9 del total del grupo IT-respond, respectivamente) (Figura R8B). Si estos resultados se validaran en un futuro como factores predictivos de respuesta a PD-1/PD-L1 inh,

aproximadamente un 27% de pacientes con cáncer colorrectal MSI-H/dMMR asociarían un biomarcador de respuesta a PD-1/PD-L1 inh, atendiendo las estimaciones realizadas mediante cBioportal (14.3% de mutaciones bialélicas en *ARID1A* y 13.3% en *PTEN*) [98].

En relación al gen *ARID1A*, la proteína resultante forma parte de los complejos humanos remodeladores de cromatina SWI/SNF, la composición de los cuales es altamente variable para conferir especificidad de función y que, a su vez, se pueden dividir en complejos BAF, del cual forman parte *ARID1A* y *ARID1B*, y PBAF [130]. Los complejos remodeladores de cromatina están formados por varias subunidades que utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para romper los enlaces del DNA con la cromatina, movilizar los nucleosomas y alterar la accesibilidad del DNA. Las mutaciones en genes que codifican proteínas miembros de los complejos SWI/SNF son frecuentes en los tumores malignos, con una frecuencia aproximada del 20%, siendo *ARID1A* el gen más comúnmente mutado [131]. Asimismo, suelen ser mutaciones inactivadoras (*nonsense* y *frameshift*) que resultan en la pérdida de expresión proteica y promueven la carcinogénesis, dado que *ARID1A* se postula como un gen supresor tumoral [132]. Las mutaciones de *ARID1A* en cáncer colorrectal ocurren en alrededor de un 10% de los tumores [5], siendo esta frecuencia mucho más elevada en el fenotipo MSI-H/dMMR. Un estudio con 7370 tumores colorrectales concluyó que aquellos con mutaciones en genes del complejo SWI/SNF presentaban una mayor proporción de tumores con fenotipo MSI-H/dMMR (40.9% versus 2.4%, $p < 0.001$), mayor proporción de tumores con TMB > 10 mutaciones/Mb (56.8% versus 21.6%, $p < 0.001$) y mayor

expresión de PD-L1 (17.9% versus 5.5%, $p < 0.001$), en comparación con aquellos tumores sin mutaciones en dicho complejo. Concretamente, entre los tumores con mutaciones en *ARID1A*, un 46.1% eran MSI-H/dMMR y un 60.3% presentaban elevado TMB [38]. En otras series de cáncer colorrectal, la pérdida de *ARID1A* se ha correlacionado con fenotipo esporádico MSI-H/dMMR, con la presencia de mutaciones en *BRAF*, y con tumores de mayor tamaño con histología medular, aunque la influencia en el pronóstico no está claramente establecida [133] [134]. Acerca de si las mutaciones en *ARID1A* se relacionan con el beneficio a inmunoterapia, hasta la fecha no hay datos clínicos en cáncer colorrectal MSI-H/dMMR, y en otros tumores la evidencia es contradictoria, dado que hay series que las postulan como potenciales biomarcadores de sensibilidad a los inhibidores de *immune checkpoints* [135], mientras que otras no objetivan dicha asociación [136]. La justificación desde un punto de vista genómico de la relación objetivada en el presente estudio entre las mutaciones bialélicas en *ARID1A* y el beneficio a PD-1/PD-L1 inh radica en un análisis proteómico en líneas celulares de diferentes tumores que observó que MSH2, a través de su extremo N-terminal, puede interactuar con el extremo C-terminal de *ARID1A*, es decir, una interacción proteína – proteína. Curiosamente, las líneas celulares con *ARID1A* deplecionado presentaban una menor capacidad funcional del sistema del MMR, indicando que *ARID1A* regula la actividad del sistema del MMR [133]. Es importante subrayar que dicha regulación no se produjo a través de la modulación de los *enhancers*, por tanto, no afectaba la expresión proteica de MSH2. En este mismo trabajo, los autores constataron en modelos

animales que la pérdida de función de *ARID1A* se correlacionaba con una mayor expresión de linfocitos CD8⁺, y que presentaban una mejor respuesta anti-tumoral a tratamiento con anti-PD-L1 [137]. Por tanto, las mutaciones en *ARID1A* podrían seleccionar un subgrupo de tumores colorrectales MSI-H/dMMR con una menor capacidad funcional del sistema del MMR que la que ya tendrían por el mecanismo genómico subyacente que ha generado dicho fenotipo, con un microambiente tumoral asociado a priori más favorable a la respuesta a inmunoterapia. De forma similar, la pérdida de expresión de *PBRM1*, otra proteína que forma parte de los complejos SWI/SNF, también se ha correlacionado con una mejor respuesta a PD-1 / PD-L1 inh, en líneas celulares de melanoma [138] y en una serie clínica de carcinoma renal de células claras [139].

Con respecto a *PTEN*, las mutaciones en dicho gen se han asociado con resistencia tanto primaria como secundaria a inhibidores de *immune checkpoints* en melanoma, leiomiocarcinoma uterino, glioblastoma y cáncer de pulmón de célula no pequeña [140], aunque no hay datos en cáncer colorrectal MSI-H/dMMR. Según los resultados del presente estudio, las mutaciones bialélicas inactivadoras en *PTEN* emergen como un potencial factor de resistencia a PD-1/PD-L1 inh en esta población, y los mecanismos que subyacen esta relación probablemente son multifactoriales, dada la complejidad de la señalización mediada por *PTEN*. Desde un punto de vista genómico y de acuerdo a estudios pre-clínicos, *PTEN* tiene funciones citoplasmáticas, concretamente actúa como fosfatasa y como antagonista directo de la señalización de la vía de PI3K, aunque también tiene funciones nucleares, dado que regula la integridad

del genoma y la estabilidad de la reparación del DNA mediante la regulación de la expresión de Rad51, entre otros mecanismos [141]. Por tanto, la pérdida de función de *PTEN* induciría aneuploidía, que se ha correlacionado con menor beneficio a inhibidores de *immune checkpoints* en diversos tumores [142]. Dado que en la cohorte de estudio no se objetivaron alteraciones significativas en el número de copias génicas, este mecanismo no justificaría los resultados, si no más bien lo haría la alteración en el microambiente tumoral inducida por *PTEN*, como se especificará en apartados posteriores. No obstante, el hecho de la múltiple señalización a través del mismo, sí que explica que las mutaciones en *PIK3CA* en la cohorte se hayan distribuido tanto entre el grupo IT-respond como IT-resist.

7.4. Discusión de densidades linfocitarias, expresión de PD-L1, y beneficio a PD-1/PD-L1 inh

El estudio focalizado en el microambiente tumoral se llevó a cabo mediante la determinación por IHQ de las subpoblaciones linfocitarias CD3⁺, CD8⁺, FOXP3⁺ y de PD-L1 por CPS. Las medianas de densidad de linfocitos CD3⁺, de linfocitos CD8⁺ y de linfocitos FOXP3⁺ fueron de 857/mm², de 413/mm² y de 41/mm², respectivamente, para el global de la cohorte. La mediana de densidad de la población linfocitaria CD8⁺ representa, en proporción, casi la mitad de la densidad del total de población linfocitaria CD3⁺. Este resultado está en relación a la evidencia disponible acerca del microambiente tumoral de los tumores MSI-H/dMMR descrita en el

apartado 1.3.5., la cual indica que son neoplasias con una elevada densidad de linfocitos infiltrantes de tumor y, en particular, de citotóxicos CD8⁺ [51] [52][143], en comparación con los tumores MSS/pMMR. En relación a los linfocitos FOXP3⁺, se trata linfocitos T reguladores con función inmunosupresora, cuya presencia en los tumores colorrectales MSI-H/dMMR ha sido también descrita. Un estudio realizado en 37 tumores colorrectales MSI-H/dMMR y 33 tumores MSS/pMMR, objetivó que la infiltración por linfocitos CD8⁺ se correlacionaba positivamente con la de los linfocitos FOXP3⁺, ambas determinadas mediante IHQ, en la población MSI-H/dMMR, sugiriendo así el potencial rol de los linfocitos T reguladores en la evasión inmune en los tumores MSI-H/dMMR [144]. De hecho, en nuestra cohorte se observó esta misma tendencia, a mayor densidad de linfocitos CD8⁺, mayor densidad de FOXP3⁺ (Figura R11).

Si la infiltración tumoral linfocitaria y la expresión de PD-L1 son factores predictivos de respuesta a PD-1/PD-L1 inh era un objetivo principal del estudio. Nuestros resultados constataron que los tumores de los pacientes clasificados en el grupo IT-respond presentaban mayor densidad de las tres subpoblaciones linfocitarias, en comparación con el grupo IT-resist, siendo las diferencias estadísticamente significativas para los linfocitos FOXP3⁺ (Figura R9). En el estudio KEYNOTE-016 se observó una tendencia entre los niveles de linfocitos CD8⁺ en nicho tumoral y el beneficio de pembrolizumab, tal y como se ha comentado en el apartado 2 [64]. En una serie de 85 pacientes con cáncer colorrectal avanzado MSI-H/dMMR tratados con inhibidores de *immune checkpoints*, la mediana de infiltración por linfocitos infiltrantes de tumor fue superior en los pacientes

que presentaron respuesta a inmunoterapia que en los que no. Asimismo, la RR en los pacientes con un valor elevado de linfocitos infiltrantes de tumor según el punto de corte propio del estudio fue del 70.6%, en comparación con el 42.9% en los pacientes con un valor bajo de dichos linfocitos, siendo las diferencias estadísticamente significativas [145]. Por tanto, tanto los datos de nuestro análisis como los procedentes de los otros estudios mencionados, apuntan a que la infiltración linfocitaria en los tumores colorrectales MSI-H/dMMR se podría correlacionar con un mayor beneficio a los PD-1/PD-L1 inh. No obstante, y teniendo en cuenta el rol inmunosupresor de los linfocitos T reguladores FOXP3⁺, es destacable que su densidad mediana también fuera mayor en el grupo de IT-respond. Una de las posibles justificaciones a este hecho, es que se ha postulado la existencia de diferentes subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ FOXP3⁺ en cáncer colorrectal. Un trabajo realizado a partir de muestras tumorales de pacientes con cáncer colorrectal describió una subpoblación de linfocitos FOXP3⁺ denominada *low* y caracterizada por la ausencia de expresión del marcador de células T CD45RA [146]. La presencia de dichos linfocitos, que parece estar condicionada por la regulación paracrina por parte de tejidos circundantes, no tendría un efecto deletéreo en la respuesta inmune antitumoral, a diferencia de los linfocitos FOXP3⁺ *high*. Dado que en nuestro trabajo no se han determinado las diferentes subpoblaciones FOXP3⁺, la potencial influencia de los linfocitos FOXP3⁺ *low* en el beneficio a PD1/PD-L1 inh no se ha podido concluir.

En relación al análisis de PD-L1 según el CPS, la mediana de la cohorte fue de 5, sin observar diferencias significativas entre el grupo IT-respond y

el grupo IT-resist, aunque la mediana fue superior en el primero (7.5 versus 3.5). Los resultados de los estudios KEYNOTE-016 y CHECKMATE-142 no observaron diferencias significativas en el beneficio a PD-1/PD-L1 inh de acuerdo a PD-L1. En el primero, la expresión de mínimo un 1% de PD-L1 en el margen invasivo tumoral no se correlacionó con una mejor PFS a pembrolizumab [64]. En el segundo, la expresión de PD-L1 en células tumorales e inmunes mayor o menor al 1% no implicó una mejor RR a nivolumab, en monoterapia o combinado con ipilimumab [68][69]. Si bien tal y como se ha comentado en el apartado 1.3.5. los tumores MSI-H/dMMR presentan mayor expresión de diferentes *immune checkpoints* [54], hasta la fecha sólo PD-L1 ha sido evaluado como potencial biomarcador de respuesta a inmunoterapia en cáncer colorrectal MSI-H/dMMR. Además, la determinación de PD-L1 tiene limitaciones, como los diferentes test disponibles para su análisis, los puntos de corte, las diferencias de predicción que puede conllevar si la evaluación se basa en la expresión en células tumorales y/o en células del microambiente [102] y el sesgo según observador [147].

7.5. Discusión de *Fusobacterium nucleatum* y beneficio a PD-1/PD-L1 inh

La determinación de *Fusobacterium nucleatum* en la cohorte de estudio se llevó a cabo mediante RNA-ISH. De entre las bacterias asociadas al cáncer colorrectal, *Fusobacterium nucleatum* es una de las más destacadas. Su porcentaje de detección en tejido tumoral y/o heces de pacientes con

cáncer colorrectal es altamente variable, entre el 8 y el 75% [85][86][87][88][148], aunque su presencia está enriquecida en tumores con fenotipo MSI-H/dMMR y pertenecientes al subtipo CMS1 [149]. En la cohorte de estudio, la presencia de *Fusobacterium nucleatum* fue observada en todas las muestras tumorales, excepto en la paciente 11. No obstante, el análisis de la bacteria en esta paciente se realizó en una muestra procedente de un implante peritoneal y, hasta la fecha, *Fusobacterium nucleatum*, más allá de en heces y en tumor primario, sólo se ha observado en metástasis hepáticas cuyos tumores colorrectales primarios eran positivos para la misma bacteria [150]. En cuanto a los niveles de bacteria/mm² observados, éstos fueron altamente variables, con un rango comprendido de entre 0, en el caso de la paciente 11, y 467/mm². Esta variabilidad dificulta la interpretación de los resultados, y más teniendo en cuenta que los niveles de *Fusobacterium nucleatum* pudieron haber variado entre la muestra donde se determinaron y sus valores reales en el momento del inicio de PD-1/PD-L1 inh por la influencia de tratamientos oncológicos (excepto en los pacientes 3, 4 y 5 que fueron tratados con PD-1/PD-L1 inh en primera línea), y otras variables extrínsecas al huésped (dieta, antibióticos recientes...) que pueden influir en el estudio del microbioma [151], y que no fueron recogidas. Por ejemplo y en relación a tratamientos oncológicos, un trabajo reciente en cáncer de recto localmente avanzado, constató un descenso de los niveles de *Fusobacterium nucleatum* en algunos pacientes entre las muestras diagnósticas y la pieza quirúrgica posterior al tratamiento neoadyuvante con radioterapia y quimioterapia [103]. Asimismo, y en relación a uno de los objetivos

secundarios del estudio, entre el grupo IT-respond e IT-resist no hubo diferencias significativas en las medianas de densidad de *Fusobacterium nucleatum*, aunque cuando se consideró un dintel de positividad de 4 bacterias/mm², en el grupo IT-resist había 4 pacientes positivos, y 2 en el grupo IT-respond. De hecho, la preclínica plantea *Fusobacterium nucleatum* como un biomarcador atractivo en el escenario de la inmunoterapia en el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR dado que modula el microambiente tumoral favoreciendo un contexto inmunosupresor. La presencia de esta bacteria en tumores intestinales generados en ratones APC^{Min/+} condiciona un incremento de los niveles en suero de diferentes factores inflamatorios englobados en la firma NF-κB, los cuales inducen una marcada presencia de células mieloides supresoras y macrófagos tipo 2 en tejido tumoral [152]. Por otro lado, también se ha descrito en líneas celulares que *Fusobacterium nucleatum* se une a través de sus proteínas de virulencia a reguladores negativos del ciclo de la inmunidad, como TIGIT [153] y CEACAM1 [154].

7.6. Discusión de las discordancias entre IHQ y PCR y beneficio a PD-1/PD-L1 inh

La revisión central del fenotipo MSI-H/dMMR se pretendió realizar en toda la cohorte mediante IHQ y PCR, dado que las discordancias entre los resultados de ambas técnicas, cada vez más descritas en la literatura aunque sin un porcentaje de detección bien definido todavía, pueden influir en la respuesta objetivada a la inmunoterapia, y por este motivo se incluyó

como objetivo secundario. Si bien el análisis genómico reveló que toda la cohorte de estudio presentaba una firma *indels* compatible con el fenotipo MSI-H/dMMR de acuerdo a la base de datos COSMIC [97], se observaron discordancias en 3 de los 14 casos para los que los resultados de la IHQ y la PCR fueron evaluables. Concretamente, los 3 pacientes presentaron un resultado de PCR compatible con MSS, pese a que la IHQ local concluyó dMMR (Tabla R10). Los 3 casos pertenecían al grupo IT-resist, resultados en concordancia con los de un estudio francés con 38 pacientes, el cual concluyó que alrededor del 60% de los casos de resistencia primaria a inmunoterapia en cáncer colorrectal MSI-H/dMMR definida como PD como mejor respuesta por criterios RECIST v1.1 [66], pueden ser debidos a falsos positivos en una de las técnicas de diagnóstico del fenotipo MSI-H/dMMR y, por tanto, cuando se completa el estudio diagnóstico mediante ambas técnicas, se objetivan los resultados discordantes [90]. En base a este trabajo, la ESMO recomienda analizar el estatus del sistema MMR mediante PCR e IHQ a todos los pacientes que sean candidatos a recibir inmunoterapia [26]. En la misma línea están los resultados de un ensayo fase II con avelumab para pacientes con cáncer colorrectal avanzado MSI-H/dMMR o *POLE* mutado previamente tratados. De entre los 23 pacientes del total de 33 a los cuales se les pudo realizar el análisis por IHQ y por PCR en tumor, 6 tenían un diagnóstico de MSS por PCR o NGS, pese a que la IHQ había sido concluyente de dMMR, y 4 de ellos presentaron SD o PD como mejor respuesta a avelumab. Asimismo, en 2 pacientes la IHQ fue compatible con pMMR, pese a que la PCR era compatible con MSI-H, y estos 2 pacientes presentaron SD y PR como mejor respuesta [155]. Cabe

destacar pero que en ninguno de los estudios pivotaes que han condicionado la aprobación de PD-1/PD-L1 inh por parte de las entidades reguladoras, la confirmación central del fenotipo MSI-H/dMMR era un requisito indispensable, y que un resultado compatible mediante IHQ o PCR, ya era suficiente para la inclusión en el estudio [64][68][69]. En sentido contrario a nuestro estudio y a los anteriormente mencionados, están los resultados del estudio CHECKMATE-142, en el que 14 pacientes de 74 se clasificaron como MSS por PCR, tras una revisión realizada de forma central en una muestra obtenida previo al inicio del estudio y, pese a ello, no se observó ningún impacto en el beneficio presentado al tratamiento [68]. Actualmente, se están desarrollando otros métodos de detección del fenotipo MSI-H/dMMR, como diferentes aproximaciones por NGS [156] e inteligencia artificial [157], aunque no están todavía implementados.

En el paciente 12, uno de los casos con discordancias entre el resultado de la IHQ y la PCR, se determinó la homogeneidad del fenotipo dMMR en diferentes puntos representativos de la pieza quirúrgica. Este análisis se llevó a cabo para descartar la coexistencia de fenotipo MSI-H/dMMR y MSS/pMMR en el mismo tumor que pudiera justificar las discordancias entre IHQ y PCR, dado que este fenómeno de coexistencia fue descrito durante el transcurso del proyecto, aunque de forma muy anecdótica. Concretamente, a partir de un caso clínico de un paciente con un tumor primario en el cual coexistían áreas MSI-H/dMMR y MSS/pMMR, los autores del estudio revisaron 1855 muestras de cáncer colorrectal, 201 de los cuales presentaban fenotipo MSI-H/dMMR, y en 2 de ellos se

observaron áreas MSI-H/dMMR que coexistían con áreas MSS/pMMR [158].

7.7. Discusión de la descripción integrada de resultados

El enfoque multimodal (Figura R11) que han permitido los diferentes análisis realizados es uno de los aspectos más interesantes del presente estudio.

Entre el grupo IT-respond, fue destacable que los pacientes cuyos tumores presentaron los niveles más elevados de densidades linfocitarias y de PD-L1, asociaron también mutaciones bialélicas en *ARID1A*. De hecho, en la serie mencionada en el apartado 7.2. en la cual se analizaron las mutaciones en el complejo SWI/SNF en más de 7000 tumores colorrectales, las mutaciones en *ARID1A* se correlacionaron con mayor expresión de PD-L1 y con mayor infiltración estimada de linfocitos T citotóxicos, en comparación con aquellos tumores sin mutaciones en dicho gen [38].

En el grupo IT-resist destacaron los pacientes 10 y 14, dado que fueron los que presentaron los valores más elevados de TMB de toda la cohorte, a la vez que los valores más bajos de las diferentes densidades linfocitarias en el caso de la paciente 10. Este hallazgo, tal y como se ha comentado en el apartado 7.2., pone en duda el valor del TMB como biomarcador aislado de respuesta a inmunoterapia en el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR. De hecho, un estudio reciente que incluyó más de 10000 pacientes con diferentes tumores, el TMB determinado mediante *Foundation One CDx* y con un punto de corte de 10 mutaciones/Mb, sólo discriminaba las

respuestas a los inhibidores de *immune checkpoints* en los subtipos tumorales en los que los niveles de linfocitos T CD8⁺ se correlacionaron con la carga de neoantígenos [159], si bien en este análisis no se contemplaba el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR. En el caso del paciente 14, como potencial causa de resistencia primaria a PD-1/PD-L1 inh pese a un TMB elevado, se encuentra la mutación en el gen *JAK* (Figura R11), la cual es una alteración que se estima según series en un 20% de los pacientes con cáncer colorrectal MSI-H/dMMR, sobre todo en *JAK1* [160]. Mutaciones en estos genes alteran la señalización a través de interferón, dificultando por tanto la infiltración linfocitaria, la presentación antigénica y la expresión de PD-L1 [161][162]. Hasta el momento, sólo la mutación bialélica *JAK1*^{W690*} se ha asociado con resistencia primaria a un PD-1/PD-1 inh en un paciente con cáncer colorrectal MSI-H/dMMR [162]. No obstante, se hipotetiza que las mutaciones monoalélicas, que sería el caso de nuestro paciente, no implicarían dicha resistencia, probablemente porque el alelo no mutado aportaría cierta capacidad de señalización a través de interferón [162].

En relación a los potenciales mecanismos moleculares subyacentes a la pobre infiltración linfocitaria tumoral de la paciente 10 y también del paciente 12, destacar que ambos presentaron una mutación bialélica en *PTEN*. Este gen asocia múltiples vías de señalización ya expuestas en el apartado 7.3., pero también puede modular el microambiente hacia un contexto inmunosupresor por diferentes mecanismos no del todo conocidos y que podrían haber contribuido en la resistencia a PD-1/PD-L1 inh en los dos casos mencionados. De entre estos mecanismos cuya evidencia

procede sobre todo de trabajos pre-clínicos en diferentes tumores, destacan que la pérdida de función de *PTEN* en células cancerígenas se asocia a un aumento de expresión de PD-L1, de liberación de citoquinas pro-inflamatorias como Il-8, y de factores relacionados con la angiogénesis, como VEGF y CCL-2. Como consecuencia, se promueve la proliferación y diferenciación de células mieloides supresoras y de macrófagos tipo 2, la expansión de células T reguladoras, y la reducción de infiltración por células *Natural Killer* [140][141][163]. En el caso de la paciente 10 se observó también una mutación patogénica en *CTNNB1*, la cual activa la vía de Wnt. Si bien la activación de la vía de Wnt es más frecuente en el cáncer colorrectal MSS/pMMR [5] y sobre todo en el grupo CMS2 [6], no es exclusiva de este fenotipo. De forma interesante, la activación de la vía de Wnt se ha relacionado con la menor infiltración tumoral de linfocitos citotóxicos [164], que sería el caso de la paciente 10. Un análisis reciente *in silico* de diferentes tumores malignos clasificados como “tumores fríos”, objetivó que alrededor del 15% de dichos tumores presentan alteraciones en la vía de Wnt, sobre todo mutaciones activadoras en *CTNNB1* y de pérdida de función en *APC* en el cáncer colorrectal [165]. La base de dicha exclusión linfocitaria, según análisis en modelos murinos de melanoma y en muestras de pacientes, radica en que la translocación nuclear de Beta-catenina promueve la transcripción del factor ATF3, que a su vez, reduce la expresión de CCL4, una quemoquina destacada en el reclutamiento de células dendríticas y, por tanto, la consecuencia final es la disminución en la activación e infiltración de linfocitos T [166]. Aunque se precisan más datos para correlacionar la activación de la vía de Wnt con la resistencia a

inmunoterapia, resultados preliminares en una cohorte de 9 pacientes con tumores intestinales MSI-H/dMMR tratados con inhibidores de *immune checkpoints*, apuntaron a que los pacientes que presentan mutaciones en *RNF43* y en *APC* o *CTNNB1* determinadas en cfDNA no se beneficiarían del tratamiento [167]. No obstante y en relación a las mutaciones en el gen *RNF43*, el cual también pertenece a la vía de Wnt, éstas no siguieron un patrón claro entre el grupo IT-respond y el grupo IT-resist en la cohorte de estudio (Figura R11). Esta observación concuerda con la de un trabajo reciente realizado en líneas celulares que postula que la mutación p.Gly659fs en *RNF43*, la más frecuente en población MSI-H/dMMR, no tiene implicación funcional en lo que concierne a la señalización a través de Wnt [168].

Finalmente, y en relación a *Fusobacterium nucleatum* la paciente 10 también presentó los niveles más altos de bacterias/mm² de toda la cohorte. Este resultado tiene interés dado que un trabajo realizado en líneas celulares de cáncer colorrectal objetivó que *Fusobacterium nucleatum* se une a E-cadherina a través de su proteína de virulencia FadA. Dicha unión implica un descenso en la fosforilación de Beta-catenina por parte de E-cadherina, y la primera se acumula al citoplasma y posteriormente se transloca al núcleo, activando la transcripción de genes relacionados con la vía de Wnt [169]. Si *Fusobacterium nucleatum* tuvo implicación en la activación tumoral de la vía de Wnt en el caso de la paciente no pudo ser demostrado, pero requiere de investigación en futuros estudios. Asimismo, y en relación a que la paciente 10 presentó los menores niveles de densidad de las 3 subpoblaciones linfocitarias de la

cohorte, existen diferentes estudios que correlacionan *Fusobacterium nucleatum* con la infiltración linfocitaria tumoral. En un análisis realizado en muestras de 598 pacientes con cáncer colorrectal ya detallado en el apartado 2, niveles altos de *Fusobacterium nucleatum* determinados mediante PCR cuantitativa y definidos según un dintel propio de la cohorte, se correlacionaron inversamente con la densidad de linfocitos CD3⁺, aunque no con la de linfocitos CD8⁺ ni FOXP3⁺[89]. Un estudio más reciente en muestras de 933 pacientes con cáncer colorrectal y con la misma metodología que el anterior en relación a la cuantificación de *Fusobacterium nucleatum*, también correlacionó de forma inversa los niveles de la bacteria con la infiltración estromal de linfocitos CD3⁺ y, más concretamente, de los linfocitos *T helper* de memoria (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺), y de forma independiente a si los tumores eran MSI-H/dMMR o no [170]. Por último, un trabajo realizado en 126 enfermos de cáncer colorrectal MSI-H/dMMR, los niveles elevados de *Fusobacterium nucleatum* analizados mediante PCR cuantitativa se relacionaron inversamente con la densidad de linfocitos FOXP3⁺, tanto en el centro tumoral como en el margen invasivo [171]. Aunque el presente proyecto se ha centrado en *Fusobacterium nucleatum*, cabe enfatizar también la importancia de profundizar en el estudio del microbioma intestinal de los pacientes con cáncer colorrectal MSI-H/dMMR como factor predictivo de respuesta a PD-1/PD-L1 inh. De hecho, en los últimos años, la mayor abundancia relativa de ciertas especies bacterianas en el intestino se ha relacionado con mayor beneficio a inmunoterapia en diferentes tumores por la modulación que ejercen dichas bacterias en la señalización inmunitaria del huésped e,

incluso, el trasplante fecal se contempla como una estrategia para optimizar los resultados [172]. .

Por último, subrayar que el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR es una entidad compleja desde un punto de vista biológico, tal y como se ha reflejado en el presente trabajo. El análisis multimodal incluyendo el perfil genómico con la consecuente activación de vías de señalización específicas y no sólo el TMB, además del microambiente tumoral y microbioma asociados, probablemente tenga mayor rendimiento en la selección de pacientes para tratamiento con PD-1/PD-L1 inh, aunque sea más costoso. Por ejemplo, en un trabajo en el cual se estudiaron más de 300 pacientes con diferentes tumores tratados con pembrolizumab, incluyendo cáncer colorrectal MSI-H/dMMR, los pacientes cuyos tumores presentaban un TMB elevado (determinado mediante análisis de exomas y con un punto de corte elevado/bajo definido por el propio estudio) y actividad citolítica intensa definida mediante una firma de expresión de linfocitos T inflamados, son los que presentaron mayor RR a pembrolizumab, de entre el 37-57%, a diferencia de los tumores que tenían TMB alto pero actividad citolítica moderada, cuya RR estaba entre el 11-42%, y de los que tenían un TMB bajo pero una actividad citolítica intensa, cuya RR fue de entre el 12 y 35% [173]. De forma similar, un meta-análisis evaluó la precisión de diferentes parámetros potencialmente capaces de predecir respuesta a los PD-1/PD-L1 inh, como la expresión por IHQ de PD-L1, el TMB, el perfil de expresión génica y los análisis *multiplex* de IHQ e inmunofluorescencia. Todas las opciones demostraron un valor predictivo negativo similar, pero el uso de varias de ellas ofreció un mayor rendimiento [174]. Asimismo, también se

precisa estudiar la evolución tumoral en todas sus vertientes bajo presión terapéutica, sobre todo para conocer si los factores de resistencia primaria y secundaria son o no concordantes. El mayor conocimiento en estas direcciones permitirá el diseño de nuevas estrategias terapéuticas en el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR, bien para revertir los potenciales mecanismos de resistencia o bien para obtener sinergias. Ejemplos de ello son la combinación de inhibidores de *immune checkpoints* con inhibidores de TGFβ, dado que se ha descrito que un subgrupo de tumores colorrectales MSI-H/dMMR expresan firmas estromales enriquecidas con la señalización a través de TGFβ [175], o bien con inhibidores de la degradación proteica vía Nedd8, que inducen la muerte celular inmunogénica por acúmulo de proteínas alteradas como consecuencia del mal funcionamiento del sistema MMR [176].

7.8. Limitaciones del estudio

Las principales limitaciones del estudio se describen a continuación. En primer lugar, el carácter exploratorio y el número limitado de pacientes incluidos en la cohorte de estudio, justificado por el hecho de que se trató de un proyecto unicéntrico y basado en una población muy poco prevalente, como es el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR. En segundo lugar, por limitaciones de disponibilidad de muestra, los análisis de poblaciones linfocitarias, PD-L1, *Fusobacterium nucleatum* y de concordancia entre técnicas diagnósticas de fenotipo MSI-H/dMMR no pudieron realizarse en el global de la cohorte. En tercer lugar, los análisis de microambiente tumoral no incluyeron resolución espacial, ni otras poblaciones más allá de

los linfocitos T, ni funcionalidad, por motivos presupuestarios y de limitación de muestra, aunque se tendrá en cuenta para futuros estudios. En cuarto lugar, los esquemas de tratamiento que recibieron los pacientes no fueron uniformes en cuanto al tipo, si bien todos incluyeron un PD-1/PD-L1 inh, ni en cuanto al escenario de administración.

8. Conclusiones

En el contexto del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR avanzado:

1.El valor del TMB no es un factor predictivo de respuesta a PD-1/PD-L1 inh, a diferencia de la infiltración tumoral por linfocitos T y la expresión de PD-L1, que se asocian a un mayor beneficio, aunque se necesitan más estudios para seleccionar la o las subpoblaciones linfocitarias más representativas, así como el punto de corte óptimo de PD-L1.

2.Las mutaciones *frameshift* no son factores predictivos de respuesta a PD-1/PD-L1 inh.

3.Los tumores con mutaciones bialélicas en *ARID1A* presentan un marcado infiltrado linfocitario de células T, al contrario que los tumores con mutaciones bialélicas en *PTEN* y con activación de la vía de Wnt mediante mutaciones en *CTNNB1*. Estos hallazgos requieren de mayor investigación dado su potencial rol como factores predictivos de beneficio y resistencia a PD-1/PD-L1 inh, respectivamente.

4.Las discordancias diagnósticas de fenotipo MSI-H/dMMR entre las técnicas de PCR y de IHQ se asocian a un beneficio limitado a los PD-1/PD-L1 inh, pero no son motivo suficiente para no indicar dicho tratamiento a los pacientes.

5.El desarrollo de biomarcadores de sensibilidad/resistencia a inmunoterapia debe contemplar el abordaje multimodal mediante análisis integrales que incluyan genómica, microambiente tumoral y microbioma, con especial interés en *Fusobacterium nucleatum*.

9. Líneas futuras

El objetivo principal del presente proyecto ha sido la búsqueda de potenciales factores predictivos de respuesta a inmunoterapia en el cáncer colorrectal MSI-H/dMMR mediante un análisis de parámetros genómicos, de microambiente tumoral y de microbioma centrado en *Fusobacterium nucleatum*. Si bien las limitaciones mencionadas en el apartado 7.8. no han permitido extraer conclusiones de aplicación clínica inmediata, los resultados han generado hipótesis relevantes y, sobre todo, han puesto de manifiesto la relevancia del abordaje multimodal en el diseño de biomarcadores. Actualmente, y fruto de las conclusiones del proyecto, se está trabajando en:

1. Ampliación de la cohorte de pacientes con los mismos criterios de inclusión que los del presente estudio con el fin de obtener mayor robustez de los resultados.

2. Diseño de estudios prospectivos que incluirán pacientes con cáncer colorrectal MSI-H/dMMR tratados con inmunoterapia, y con obtención de muestras tumorales secuenciales. El fin será evaluar la dinámica de los análisis *multiomics*, incluyendo estudios de resolución espacial y funcional en la valoración del microambiente tumoral.

Estas líneas futuras se desarrollarán en colaboración con otros centros de índole nacional e internacional que permitirán un reclutamiento adecuado de pacientes, atendiendo la baja prevalencia del cáncer colorrectal MSI-H/dMMR. También se contará con la colaboración del *TaskForce* de cáncer colorrectal del VHIO, en el cual están implicados investigadores clínicos y básicos de diferentes disciplinas que cubren todo el enfoque *multiomics*

necesario. Asimismo, los resultados de estos trabajos supondrán la base de futuras tesis doctorales.

10. Referencias bibliográficas

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. cancer.* 2015; 136(5):E359-86.
2. Pilleron S, Sarfati D, Janssen-Heijnen M et al. Global cancer incidence in older adults, 2012 and 2035: A population-based study. *Int. J. cancer.* 2019;144(1):49-58.
3. Printz C. Declines in death from colorectal cancer in Europe deemed major success. *Cancer* 2018; 124(14):2876.
4. Vilar E, Taberero J, Gruber SB. Micromanaging the classification of colon cancer: the role of the microRNAome. *Clin. Cancer Res.* 2011; 17(23):7207–9.
5. Muzny DM, Bainbridge MN, Chang K et al. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 2012; 487(7407):330–337.
6. Guinney J, Dienstmann R, Wang X et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* 2015; 21(11):1350–6.
7. Becht E, Giraldo NA, Beuselinck B et al. Prognostic and therapeutic impact of molecular subtypes and immune classifications in renal cell cancer (RCC) and colorectal cancer (CRC). *Oncoimmunology* 2015; 4(12):e1049804.
8. Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL. DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms. *Chem. Rev.* 2006; 106(2):302–323.
9. Germano G, Amirouchene-Angelozzi N, Rospo G, Bardelli A. The Clinical Impact of the Genomic Landscape of Mismatch Repair-Deficient Cancers. *Cancer Discov.* 2018; 8(12):1518–1528.
10. Larrea AA, Lujan SA, Kunkel TA. SnapShot: DNA mismatch repair. *Cell* 2010; 141(4):730.e1.
11. Viguera E, Canceill D, Ehrlich SD. Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *EMBO J.* 2001; 20(10):2587–95.
12. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat. Med.* 2016; 22(11):1342–1350.
13. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260(5109):812–6.
14. Cortes-Ciriano I, Lee S, Park W-Y et al. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat. Commun.* 2017; 8:15180.
15. Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer—the stable evidence. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2010; 7(3):153–62.
16. Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS et al. Cancer Susceptibility Gene Mutations in Individuals With Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2017; 35(10):1086–1095.
17. Nilbert M, Planck M, Fernebro E et al. Microsatellite instability is rare in rectal carcinomas and signifies hereditary cancer. *Eur. J. Cancer* 1999;

- 35(6):942–5.
18. Seth S, Ager A, Arends M, Frayling IM. Lynch Syndrome - Cancer Pathways, Heterogeneity and Immune Escape. *J. Pathol.* 2018; 246(2):129-133.
 19. Durno CA, Sherman PM, Aronson M et al. Phenotypic and genotypic characterisation of biallelic mismatch repair deficiency (BMMR-D) syndrome. *Eur. J. Cancer* 2015; 51(8):977–83.
 20. Wimmer K, Etzler J. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg? *Hum. Genet.* 2008; 124(2):105–22.
 21. Binder H, Hopp L, Schweiger MR et al. Genomic and transcriptomic heterogeneity of colorectal tumours arising in Lynch syndrome. *J. Pathol.* 2017; 243(2):242-254.
 22. Miyakura Y, Sugano K, Konishi F et al. Extensive methylation of hMLH1 promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology* 2001; 121(6):1300–9.
 23. Issa J-P. Colon Cancer: It's CIN or CIMP. *Clin. Cancer Res.* 2008; 14(19):5939–5940.
 24. Wang T, Stadler ZK, Zhang L et al. Immunohistochemical null-phenotype for mismatch repair proteins in colonic carcinoma associated with concurrent MLH1 hypermethylation and MSH2 somatic mutations. *Fam Can.* 2018; 17(2):225-228.
 25. Mensenkamp AR, Vogelaar IP, Van Zelst-Stams WAG et al. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology.* 2014; 146(3):643-646.
 26. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach. *Ann. Oncol.* 2019; 30(8):1232-1243.
 27. Funkhouser WK, Lubin IM, Monzon FA et al. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J. Mol. Diagn.* 2012; 14(2):91–103.
 28. Middha S, Zhang L, Nafa K et al. Reliable Pan-Cancer Microsatellite Instability Assessment by Using Targeted Next-Generation Sequencing Data. *JCO Precis. Oncol.* 2017; 2017(1):1–17.
 29. Niu B, Ye K, Zhang Q et al. MSIsensor: microsatellite instability detection using paired tumor-normal sequence data. *Bioinformatics* 2014; 30(7):1015–6.
 30. Jung J, Kang Y, Lee YJ et al. Comparison of the Mismatch Repair System between Primary and Metastatic Colorectal Cancers Using Immunohistochemistry. *J. Pathol. Transl. Med.* 2017; 51(2):129–136.
 31. Campbell BB, Light N, Fabrizio D et al. Comprehensive Analysis of Hypermutation in Human Cancer. *Cell* 2017; 171(5): 1042-1055.
 32. Woerner SM, Kloor M, Mueller A et al. Microsatellite instability of

- selective target genes in HNPCC-associated colon adenomas. *Oncogene* 2005; 24(15):2525–35.
33. Farchoukh L, Kuan S-F, Dudley B et al. MLH1-deficient Colorectal Carcinoma With Wild-type BRAF and MLH1 Promoter Hypermethylation Harbor KRAS Mutations and Arise From Conventional Adenomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 2016; 40(10):1390–9.
 34. Fang M, Ou J, Hutchinson L, Green MR. The BRAF oncoprotein functions through the transcriptional repressor MAFG to mediate the CpG Island Methylator phenotype. *Mol. Cell* 2014; 55(6):904–915.
 35. Gylfe AE, Kondelin J, Turunen M et al. Identification of Candidate Oncogenes in Human Colorectal Cancers With Microsatellite Instability. *Gastroenterology* 2013; 145(3):540-543.e22.
 36. Choi EJ, Kim MS, Song SY et al. Intratumoral Heterogeneity of Frameshift Mutations in MECOM Gene is Frequent in Colorectal Cancers with High Microsatellite Instability. *Pathol. Oncol. Res.* 2017.
 37. Grasso CS, Giannakis M, Wells DK et al. Genetic Mechanisms of Immune Evasion in Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* 2018; 8(6):730–749.
 38. Tokunaga R; Xiu J; Goldberg RM; et al. Gene mutation of SWI/SNF complex and molecular profile in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 37, no.15_suppl (May 20, 2019) 3600-3600.
 39. Cocco E, Benhamida J, Middha S et al. Colorectal Carcinomas Containing Hypermethylated MLH1 Promoter and Wild-Type BRAF/KRAS Are Enriched for Targetable Kinase Fusions. *Cancer Res.* 2019; 79(6):1047–1053.
 40. Sato K, Kawazu M, Yamamoto Y et al. Fusion Kinases Identified by Genomic Analyses of Sporadic Microsatellite Instability-High Colorectal Cancers. *Clin. Cancer Res.* 2019; 25(1):378–389.
 41. Wang J, Yi Y, Xiao Y et al. Prevalence of recurrent oncogenic fusion in mismatch repair-deficient colorectal carcinoma with hypermethylated MLH1 and wild-type BRAF and KRAS. *Mod. Pathol.* 2019; 32(7):1053–1064.
 42. Turajlic S, Litchfield K, Xu H et al. Insertion-and-deletion-derived tumour-specific neoantigens and the immunogenic phenotype: a pan-cancer analysis. *Lancet Oncol.* 2017; 18(8):1009–1021.
 43. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* 2013; 39(4):782–95.
 44. Becht E, de Reyniès A, Giraldo NA et al. Immune and Stromal Classification of Colorectal Cancer Is Associated with Molecular Subtypes and Relevant for Precision Immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2016; 22(16):4057–4066.
 45. Yuan W, Deng D, Jiang H et al. Hyperresponsiveness to interferon gamma exposure as a response mechanism to anti-PD-1 therapy in microsatellite instability colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 2019; 68(2):257–268.
 46. Trujillo JA, Sweis RF, Bao R, Luke JJ. T Cell-Inflamed versus Non-T

- Cell-Inflamed Tumors: A Conceptual Framework for Cancer Immunotherapy Drug Development and Combination Therapy Selection. *Cancer Immunol. Res.* 2018; 6(9):990–1000.
47. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. THE IFN γ RECEPTOR: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 1997; 15(1):563–591.
 48. Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2005; 54(8):721–728.
 49. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y et al. Up-Regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8+ T Cells. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5(200):200ra116-200ra116.
 50. www.minnlab.org/cancer-immunotherapy. Año 2021.
 51. Hamada T, Soong TR, Masugi Y et al. TIME (Tumor Immunity in the MicroEnvironment) classification based on tumor *CD274* (PD-L1) expression status and tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinomas. *Oncoimmunology* 2018; 7(7):e1442999.
 52. Jenkins MA, Hayashi S, O’Shea AM et al. Pathology Features in Bethesda Guidelines Predict Colorectal Cancer Microsatellite Instability: A Population-Based Study. *Gastroenterology* 2007; 133(1):48–56.
 53. Maby P, Tougeron D, Hamieh M et al. Correlation between Density of CD8+ T-cell Infiltrate in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers and Frameshift Mutations: A Rationale for Personalized Immunotherapy. *Cancer Res.* 2015; 75(17):3446–55.
 54. Llosa NJ, Cruise M, Tam A et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov.* 2015; 5(1):43–51.
 55. Angelova M, Charoentong P, Hackl H et al. Characterization of the immunophenotypes and antigenomes of colorectal cancers reveals distinct tumor escape mechanisms and novel targets for immunotherapy. *Genome Biol.* 2015; 16(1):64.
 56. Brouwer-Visser J, Cheng W-Y, Bauer-Mehren A et al. Regulatory T-cell Genes Drive Altered Immune Microenvironment in Adult Solid Cancers and Allow for Immune Contextual Patient Subtyping. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2018; 27(1):103–112.
 57. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6):2073-2087.e3.
 58. Toh JWT, Phan K, Reza F et al. Rate of dissemination and prognosis in early and advanced stage colorectal cancer based on microsatellite instability status: systematic review and meta-analysis. *Int. J. Colorectal Dis.* 2021.
 59. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2016; 27(8):1386-422.
 60. NCCN Practice Guidelines in Oncology. Colon Cancer. Version 2.2021 - January 21, 2021. Disponible en: <https://www.nccn.org>.

61. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQM et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366(26):2455–65.
62. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* 2012; 366(26):2443–54.
63. Chung KY, Gore I, Fong L et al. Phase II study of the anti-cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody, tremelimumab, in patients with refractory metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28(21):3485–90.
64. Le DT, Uram JN, Wang H et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372(26):2509–2520.
65. Seymour L, Bogaerts J, Perrone A et al. iRECIST: guidelines for response criteria for use in trials testing immunotherapeutics. *Lancet. Oncol.* 2017; 18(3):e143–e152.
66. Schwartz LH, Litière S, de Vries E et al. RECIST 1.1-Update and clarification: From the RECIST committee. *Eur. J. Cancer* 2016; 62:132–7.
67. Le DT, Durham JN, Smith KN et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science.* 2017; 357(6349):409–413.
68. Overman MJ, McDermott R, Leach JL et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2017; 18(9):1182–1191.
69. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM et al. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Metastatic Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2018; 36(8):773–779.
70. Lenz, Heinz-Josef; Lonardi Sara, Zagonel Vittorina et al. Nivolumab (NIVO) + low-dose ipilimumab (IPI) as first-line (1L) therapy in microsatellite instability-high/DNA mismatch repair deficient (MSI-H/dMMR) metastatic colorectal cancer (mCRC): Clinical Update. *J Clin Oncol* 37, no.15_suppl (May 20, 2019)
71. Le DT, Kim TW, van Cutsem E et al. Phase II open-label study of pembrolizumab in treatment-refractory, microsatellite instability-high/mismatch repair-deficient metastatic colorectal cancer: KEYNOTE-164. *J. Clin. Oncol.*, American Society of Clinical Oncology, 2020; 38(1):11–19.
72. André T, Shiu K-K, Kim TW et al. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability-High Advanced Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(23):2207–2218.
73. Shiu K-K, André T, Kim TW et al. KEYNOTE-177: Phase III randomized study of pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 39, no.3_suppl (January 20, 2021)

74. Andre T, Amonkar M, Norquist JM et al. Health-related quality of life in patients with microsatellite instability-high or mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer treated with first-line pembrolizumab versus chemotherapy (KEYNOTE-177): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet. Oncol.* 2021.
75. Lenz H-J, Lonardi S, Zagonel V, et al. Nivolumab plus low-dose ipilimumab as first-line therapy in microsatellite instability-high/DNA mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer: Clinical update. *J Clin Oncol* 38, no.4_suppl (February 1, 2020)
76. Chalabi M, Fanchi LF, Dijkstra KK et al. Neoadjuvant immunotherapy leads to pathological responses in MMR-proficient and MMR-deficient early-stage colon cancers. *Nat. Med.* 2020; 26(4):566–576.
77. Clinical Trials. Disponible en [https:// www.clinicaltrials.gov](https://www.clinicaltrials.gov). Año 2021.
78. Roy S, Trinchieri G. Microbiota: a key orchestrator of cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2017; 17(5):271-285.
79. Schalper KA, Kaftan E, Herbst RS. Predictive Biomarkers for PD-1 Axis Therapies: The Hidden Treasure or a Call for Research. *Clin Cancer Res.* 2016; 22(9): 2102-4.
80. Cremolini C, Schirripa M, Antoniotti C et al. First-line chemotherapy for mCRC—a review and evidence-based algorithm. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2015; 12(10):607–19.
81. Kopetz S, Grothey A, Yaeger R et al. Encorafenib, Binimetinib, and Cetuximab in BRAF V600E–Mutated Colorectal Cancer . *N. Engl. J. Med.* 2019; 381(17):1632–1643.
82. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016; 17(6):738–746.
83. Koopman M, Kortman GAM, Mekenkamp L et al. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 2009; 100(2):266–73.
84. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014; 515(7528):563–567.
85. Flanagan L, Schmid J, Ebert M et al. *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2014; 33(8):1381–90.
86. Tahara T, Yamamoto E, Suzuki H et al. *Fusobacterium* in colonic flora and molecular features of colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 2014; 74(5):1311–1318.
87. Nosho K, Sukawa Y, Adachi Y et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22(2):557–566.
88. Ito M, Kanno S, Nosho K et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. *Int.*

- J. cancer 2015; 137(6):1258–68.
89. Mima K, Sukawa Y, Nishihara R et al. *Fusobacterium nucleatum* and T cells in colorectal carcinoma. *JAMA Oncol.* 2015; 1(5):653–661.
 90. Cohen R, Hain E, Buhard O et al. Association of Primary Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Metastatic Colorectal Cancer With Misdiagnosis of Microsatellite Instability or Mismatch Repair Deficiency Status. *JAMA Oncol.* 2019; 5(4):551.
 91. Sorbin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. International Union against Cancer (UICC). TNM classification of malignant tumours. 7 edition., West Sussex: 2009.
 92. Warr A, Robert C, Hume D et al. Exome Sequencing: Current and Future Perspectives. *Genes|Genomes|Genetics.* 2015; 5(8):1543–1550.
 93. Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012; 491(7422):56–65.
 94. Exome Variant Server Database. Disponible en: <https://www.esp.gs.washington.edu/drupal/>. Año 2021.
 95. Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V. et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016; 536(7616):285–291.
 96. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 2020; 581(7809):434–443.
 97. COSMIC. Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. Disponible en: <https://cancer.sanger.ac.uk>. Año 2021.
 98. cBioPortal for cancer genomics. Disponible en: <https://cbioportal.org>. Año 2021.
 99. ClinVar -NCBI-NIH. Disponible en: <https://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. Año 2021.
 100. OncoKB. Disponible en: <https://oncokb.org/>. Año 2021.
 101. The Human Genomic Variant. Disponible en: <https://varsome.com>. Año 2021.
 102. Kulangara K, Zhang N, Corigliano E et al. Clinical Utility of the Combined Positive Score for Programmed Death Ligand-1 Expression and the Approval of Pembrolizumab for Treatment of Gastric Cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2019; 143(3):330–337.
 103. Serna G, Ruiz-Pace F, Hernando J et al. *Fusobacterium nucleatum* persistence and risk of recurrence after preoperative treatment in locally advanced rectal cancer. *Ann. Oncol.* 2020; 31(10):1366–1375.
 104. Kluger HM, Tawbi HA, Ascierto ML et al. Defining tumor resistance to PD-1 pathway blockade: Recommendations from the first meeting of the SITC Immunotherapy Resistance Taskforce. *J. Immunother. Cancer* 2020; 8(1):398.
 105. Yaeger R, Chatila WK, Lipsyc MD et al. Clinical Sequencing Defines the Genomic Landscape of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Cell* 2018; 33(1):125-136.e3.

106. Tran B, Kopetz S, Tie J et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer* 2011; 117(20):4623–32.
107. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies. *Clin. Cancer Res.* 2014; 20(20):5322–30.
108. Cohen R, Buhard O, Cervera P et al. Clinical and molecular characterisation of hereditary and sporadic metastatic colorectal cancers harbouring microsatellite instability/DNA mismatch repair deficiency. *Eur. J. Cancer* 2017; 86:266–274.
109. Goldstein J, Tran B, Ensor J et al. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). *Ann. Oncol.* 2014; 25(5):1032–8.
110. Hochster H; Bendell JC; Cleary JM; et al. Efficacy and safety of atezolizumab (atezo) and bevacizumab (bev) in a phase Ib study of microsatellite instability (MSI)-high metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol* 2017; 35(4_suppl):673–673.
111. Marabelle A, Fakih M, Lopez J et al. Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *Lancet Oncol.* 2020; 21(10):1353–1365.
112. Mandal R, Samstein RM, Lee K-W et al. Genetic diversity of tumors with mismatch repair deficiency influences anti-PD-1 immunotherapy response. *Science.* 2019; 364(6439):485–491.
113. Schrock AB, Ouyang C, Sandhu J et al. Tumor mutational burden is predictive of response to immune checkpoint inhibitors in MSI-high metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 2019; 30(7):1096–1103.
114. Pich O, Muiños F, Lolkema MP et al. The mutational footprints of cancer therapies. *Nat. Genet.* 2019; 51(12):1732–1740.
115. 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(1):34.
116. Yarchoan M, Hopkins A, Jaffee EM. Tumor Mutational Burden and Response Rate to PD-1 Inhibition. *N. Engl. J. Med.* 2017; 377(25):2500–2501.
117. Rousseau B, Foote MB, Maron SB, et al. The Spectrum of Benefit from Checkpoint Blockade in Hypermutated Tumors. *N Engl J Med.* 2021; 384(12):1168-1170.
118. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: Utility for the oncology clinic. *Ann. Oncol.* 2019; 30(1):44–56.
119. Salem ME, Bodor JN, Puccini A et al. Relationship between MLH1, PMS2, MSH2 and MSH6 gene-specific alterations and tumor mutational burden in 1057 microsatellite instability-high solid tumors. *Int. J. Cancer*

- 2020; 147(10):2948–2956.
120. Ballhausen A, Przybilla MJ, Jendrusch M et al. The shared frameshift mutation landscape of microsatellite-unstable cancers suggests immunoediting during tumor evolution. *Nat. Commun.* 2020.
 121. Trinh A, Polyak K. Tumor Neoantigens: When Too Much of a Good Thing Is Bad. *Cancer Cell* 2019; 36(5):466–467.
 122. Lal N, White BS, Goussous G et al. KRAS Mutation and Consensus Molecular Subtypes 2 and 3 Are Independently Associated with Reduced Immune Infiltration and Reactivity in Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* 2018; 24(1):224–233.
 123. Koelzer VH, Baker K, Kassahn D et al. Prognostic impact of β -2-microglobulin expression in colorectal cancers stratified by mismatch repair status. *J. Clin. Pathol.* 2012; 65(11):996–1002.
 124. Gurjao C, Liu D, Hofree M et al. Intrinsic Resistance to Immune Checkpoint Blockade in a Mismatch Repair-Deficient Colorectal Cancer. *Cancer Immunol. Res.* 2019; 7(8):1230–1236.
 125. Janikovits J, Müller M, Krzykalla J et al. High numbers of PDCD1 (PD-1)-positive T cells and B2M mutations in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Oncoimmunology* 2018; 7(2):e1390640.
 126. Middha S, Yaeger R, Shia J et al. Majority of B2M-Mutant and -Deficient Colorectal Carcinomas Achieve Clinical Benefit From Immune Checkpoint Inhibitor Therapy and Are Microsatellite Instability-High. *JCO Precis. Oncol.* 2019; 3(3):1–14.
 127. Pfuderer PL, Ballhausen A, Seidler F et al. High endothelial venules are associated with microsatellite instability, hereditary background and immune evasion in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 2019. 121(5):395-404.
 128. Wei J; Fangfang Z; Weifeng W et al. Effect of exonic microsatellite instability of B2M on the predictability of MSI/dMMR for immunotherapy. *J Clin Oncol*, no.15_suppl (May 20, 2019): 2576-2576.
 129. Ozcan M, Janikovits J, von Knebel Doeberitz M, Kloor M. Complex pattern of immune evasion in MSI colorectal cancer. *Oncoimmunology.* 2018; 7(7):e1445453.
 130. Mathur R. ARID1A loss in cancer: Towards a mechanistic understanding. *Pharmacol. Ther.* 2018; 190:15–23.
 131. Kadoch C, Hargreaves DC, Hodges C et al. Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy. *Nat. Genet.* 2013; 45(6):592–601.
 132. Huang J, Zhao Y-L, Li Y et al. Genomic and functional evidence for an ARID1A tumor suppressor role. *Genes, Chromosom. Cancer* 2007; 46(8):745–750.
 133. Ye J, Zhou Y, Weiser MR et al. Immunohistochemical detection of ARID1A in colorectal carcinoma: loss of staining is associated with sporadic microsatellite unstable tumors with medullary histology and high TNM stage. *Hum. Pathol.* 2014; 45(12):2430–6.
 134. Chou A, Toon CW, Clarkson A et al. Loss of ARID1A expression in

- colorectal carcinoma is strongly associated with mismatch repair deficiency. *Hum. Pathol.* 2014; 45(8):1697–703.
135. Okamura R, Kato S, Lee S et al. ARID1A alterations function as a biomarker for longer progression-free survival after anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy. *J. Immunother. Cancer.* 2020;8(1):e000438.
 136. Abou Alaiwi S, Nassar AH, Xie W et al. Mammalian SWI/SNF complex genomic alterations and immune checkpoint blockade in solid tumors. *Cancer Immunol. Res.* 2020:canimm.0866.2019.
 137. Shen J, Ju Z, Zhao W et al. ARID1A deficiency promotes mutability and potentiates therapeutic antitumor immunity unleashed by immune checkpoint blockade. *Nat. Med.* 2018; 24(5):556–562.
 138. Pan D, Kobayashi A, Jiang P et al. A major chromatin regulator determines resistance of tumor cells to T cell-mediated killing. *Science* 2018; 359(6377):770–775.
 139. Miao D, Margolis CA, Gao W et al. Genomic correlates of response to immune checkpoint therapies in clear cell renal cell carcinoma. *Science.* 2018; 359(6377):801–806.
 140. Piro G, Carbone C, Carbognin L et al. Revising PTEN in the era of immunotherapy: New perspectives for an old story. *Cancers (Basel).* 2019; 11(10):1525.
 141. Vidotto T, Melo CM, Castelli E et al. Emerging role of PTEN loss in evasion of the immune response to tumours. *Br. J. Cancer* 2020; 122(12):1732–1743.
 142. Davoli T, Uno H, Wooten EC, Elledge SJ. Tumor aneuploidy correlates with markers of immune evasion and with reduced response to immunotherapy. *Science.* 2017; 20;355(6322):eaaf8399.
 143. Boissière-Michot F, Lazennec G, Frugierz H et al. Characterization of an adaptive immune response in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Oncoimmunology.* 2014 25;3:e29256.
 144. Michel S, Benner A, Tariverdian M et al. High density of FOXP3-positive T cells infiltrating colorectal cancers with microsatellite instability. *Br. J. Cancer* 2008; 99(11):1867–1873.
 145. Loupakis F, Depetris I, Biondi P et al. Prediction of Benefit from Checkpoint Inhibitors in Mismatch Repair Deficient Metastatic Colorectal Cancer: Role of Tumor Infiltrating Lymphocytes. *Oncologist* 2020; 25(6):481–487.
 146. Saito T, Nishikawa H, Wada H et al. Two FOXP3 + CD4 + T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat. Med.* 2016; 22(6):679–684.
 147. Rimm DL, Han G, Taube JM et al. A Prospective, Multi-institutional, Pathologist-Based Assessment of 4 Immunohistochemistry Assays for PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 2017; 3(8):1051–1058.
 148. Yamaoka Y, Suehiro Y, Hashimoto S et al. *Fusobacterium nucleatum* as a prognostic marker of colorectal cancer in a Japanese population. *J. Gastroenterol.* 2018; 53(4):517–524.
 149. Purcell R V., Visnovska M, Biggs PJ et al. Distinct gut microbiome

- patterns associate with consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Sci. Rep.* 2017; 7(1):11590.
150. Bullman S, Peadarallu CS, Sicinska E et al. Analysis of *Fusobacterium* persistence and antibiotic response in colorectal cancer. *Science* 2017; 358(6369):1443–1448.
 151. McQuade J, Daniel CR, Helmink BA, Wargo JA. Modulating the microbiome to improve therapeutic in cancer. *Lancet Oncol.* 2019; 20(2):e77-e91.
 152. Yang Y, Weng W, Peng J et al. *Fusobacterium nucleatum* Increases Proliferation of Colorectal Cancer Cells and Tumor Development in Mice by Activating Toll-Like Receptor 4 Signaling to Nuclear Factor- κ B, and Up-regulating Expression of MicroRNA-21. *Gastroenterology* 2017; 152(4):851-866.e24.
 153. Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B et al. Binding of the Fap2 protein of *fusobacterium nucleatum* to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. *Immunity* 2015; 42(2):344–355.
 154. Gur C, Maalouf N, Shhadeh A et al. *Fusobacterium nucleatum* suppresses anti-tumor immunity by activating CEACAM1. *Oncoimmunology* 2019. doi:10.1080/2162402X.2019.1581531.
 155. Kim JH, Kim SY, Baek JY et al. A Phase II Study of Avelumab Monotherapy in Patients with Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High or *POLE*-Mutated Metastatic or Unresectable Colorectal Cancer. *Cancer Res. Treat.* 2020. doi:10.4143/crt.2020.218.
 156. Papke DJ, Nowak JA, Yurgelun MB et al. Validation of a targeted next-generation sequencing approach to detect mismatch repair deficiency in colorectal adenocarcinoma. *Mod. Pathol.* 2018; 31(12):1882-1890.
 157. Hildebrand LA, Pierce CJ, Dennis M et al. Artificial intelligence for histology- based detection of microsatellite instability and prediction of response to immunotherapy in colorectal cancer. *Cancers (Basel).* 2021; 13(3):1–24.
 158. Loupakis F, Maddalena G, Depetris I et al. Treatment with checkpoint inhibitors in a metastatic colorectal cancer patient with molecular and immunohistochemical heterogeneity in MSI/dMMR status. *J. Immunother. Cancer.* 2019; 7(1):297.
 159. McGrail DJ, Pilié PG, Rashid NU et al. High tumor mutation burden fails to predict immune checkpoint blockade response across all cancer types. *Ann. Oncol.* 2021; 32(5):661-672.
 160. Sveen A, Johannessen B, Tengs T et al. Multilevel genomics of colorectal cancers with microsatellite instability-clinical impact of JAK1 mutations and consensus molecular subtype 1. *Genome Med.* 2017;9(1):46.
 161. Albacker LA, Wu J, Smith P et al. Loss of function JAK1 mutations occur at high frequency in cancers with microsatellite instability and are suggestive of immune evasion. *PLoS One* 2017; 12(11):e0176181.
 162. Shin DS, Zaretsky JM, Escuin-Ordinas H et al. Primary Resistance to PD-1 Blockade Mediated by *JAK1/2* Mutations. *Cancer Discov.* 2017;

- 7(2):188–201.
163. Conciatori F, Bazzichetto C, Falcone I et al. PTEN Function at the Interface between Cancer and Tumor Microenvironment: Implications for Response to Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(15):5337.
 164. Dangaj D, Barras D, Coukos G. Tumor landscapes: B-catenin drives immune desertification. *Clin. Cancer Res.* 2019; 25(10):2943–2945.
 165. Luke JJ, Bao R, Sweis RF et al. WNT/ β -catenin Pathway Activation Correlates with Immune Exclusion across Human Cancers. *Clin. Cancer Res.* 2019; 25(10):3074–3083.
 166. Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* 2015; 523(7559):231–235.
 167. James I; Nixon AB; Bolch E; et al. Blood-based genomic profiling of cell-free DNA (cfDNA) to identify microsatellite instability (MSI-H), tumor mutational burden (TMB) and Wnt/B-Catenin pathway alterations in patients with gastrointestinal (GI) tract cancers. *J Clin Oncol* 37, no.15_suppl (May 20, 2019) 3552-3552.
 168. Li S, Lavrijsen M, Bakker A et al. Commonly observed RNF43 mutations retain functionality in attenuating Wnt/ β -catenin signaling and unlikely confer Wnt-dependency onto colorectal cancers. *Oncogene* 2020; 39(17):3458–3472.
 169. Rubinstein MR, Wang X, Liu W et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ β -catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe* 2013; 14(2):195–206.
 170. Borowsky J, Haruki K, Lau MC et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with Specific T Cell Subsets in the Colorectal Carcinoma Microenvironment. *Clin. Cancer Res.* 2021. doi:10.1158/1078-0432.
 171. Lee JA, Yoo SY, Oh HJ et al. Differential immune microenvironmental features of microsatellite-unstable colorectal cancers according to *Fusobacterium nucleatum* status. *Cancer Immunol. Immunother.* 2021;70(1):47-59.
 172. Oliva M, Mulet-Margalef N, Ochoa de Olza M, et al. Tumor Associated Microbiome: Where Do We Stand? *Int J Mol Sci.* 2021; 22(3):1446.
 173. Cristescu R, Mogg R, Ayers M et al. Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science.* 2018;362(6411):eaar3593.
 174. Lu S, Stein JE, Rimm DL et al. Comparison of Biomarker Modalities for Predicting Response to PD-1/PD-L1 Checkpoint Blockade. *JAMA Oncol.* 2019; 5(8):1195-1204.
 175. Endo E, Okayama H, Saito K et al. A TGF β -dependent stromal subset underlies immune checkpoint inhibitor efficacy in DNA mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high colorectal cancer. *Mol. Cancer Res.* 2020; 18(9):1402–1413.
 176. McGrail DJ, Garnett J, Yin J et al. Proteome Instability Is a Therapeutic Vulnerability in Mismatch Repair-Deficient Cancer. *Cancer Cell* 2020; 37(3):371-386.e12.

ANEXO 1

Valores obtenidos en relación a los diferentes parámetros anaizados para el global de la cohorte y para cada grupo (media, desviación estándar, mediana, valor mínimo, valor máximo y rango intercuartílico)

* *U Mann - Whitney test*

** *Benjamini – Hochberg adjusted p-values*

Variables	All pts.							IT - respond (n=9)							IT - resist (n=7)								
	Mean	Std.Dev	Min	Max	Median	IQR		Mean	Std.Dev	Min	Max	Median	IQR		Mean	Std.Dev	Min	Max	Median	IQR		p-value*	adjusted p**
TMB (Mut/Mb)	41,4	17,3	8,4	70,0	41,4	17,7		35,2	15,8	8,4	60,1	38,8	16,7		49,4	16,6	26,6	70,0	47,2	25,1		0,125	0,385
fs (Indels)	13,3	6,5	2,0	24,0	13,5	7,8		10,9	5,8	2,0	20,0	11,0	7,0		16,3	6,3	7,0	24,0	16,0	8,5		0,138	0,385
% fs vs TOTAL	24,6	8,1	10,1	39,4	25,0	10,8		24,3	10,4	10,1	39,4	22,0	10,9		24,9	4,7	18,0	31,2	25,5	5,4		0,832	0,936
COSMIC signature Defective DNA MMR / MSI (small INDELS)	0,5	0,2	0,2	1,0	0,5	0,3		0,5	0,2	0,2	0,7	0,5	0,3		0,5	0,2	0,3	1,0	0,5	0,2		0,918	0,936
COSMIC signature Others	0,5	0,2	0,1	0,8	0,5	0,3		0,5	0,2	0,3	0,8	0,5	0,3		0,5	0,2	0,1	0,7	0,5	0,2		0,918	0,936
DENSITY CD8 /mm ²	441,7	256,5	110,0	1081,0	413,0	212,5		554,8	273,0	334,0	1081,0	459,0	165,5		306,0	170,6	110,0	496,0	242,0	266,0		0,126	0,385
DENSITY CD3 /mm ²	811,8	343,8	282,0	1517,0	857,0	425,0		959,0	329,2	507,0	1517,0	885,0	323,0		605,6	267,2	282,0	925,0	541,0	390,0		0,106	0,385
DENSITY FOXP3 /mm ²	58,0	47,5	9,0	142,0	41,0	53,3		84,0	46,0	34,0	142,0	69,0	77,5		21,6	13,7	9,0	42,0	16,0	17,0		0,010	0,141
PD-L1 CPS	15,0	27,8	1,0	90,0	5,0	7,5		22,8	34,6	1,0	90,0	7,5	23,0		3,3	2,1	1,0	5,0	3,5	3,3		0,444	0,778
PROLIFERATING CD3	12,5	10,2	1,0	36,0	9,0	7,8		16,1	11,8	3,0	36,0	13,0	13,5		7,4	4,7	1,0	14,0	7,0	3,0		0,167	0,388
PROLIFERATING CD8	14,2	9,5	2,0	35,0	12,0	6,0		16,6	11,6	5,0	35,0	12,0	9,0		11,3	6,5	2,0	17,0	13,0	5,3		0,806	0,936
PROLIFERATING FOXP3	15,4	9,2	0,0	33,0	15,0	7,8		17,9	10,4	5,0	33,0	16,0	15,5		12,0	6,9	0,0	17,0	15,0	2,0		0,515	0,801
Fusobacterium nucleatum (bacterial/mm ²)	67,1	144,2	0,0	467,0	4,5	22,5		52,5	97,9	0,0	246,0	2,5	47,3		81,7	188,8	0,0	467,0	6,5	8,3		0,936	0,936

ANEXO 2

Datos utilizados para la elaboración de la figura R11 (a excepción de la proliferación linfocitaria)

Patient	IT-respond										IT-resist					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Mechanism of dMMR/MSI-H phenotype	Germine	Germine	Germine	Sporadic	Sporadic	Sporadic	Germine	Sporadic	Sporadic	Sporadic	Sporadic	Sporadic	Sporadic	Sporadic	Sporadic	Sporadic
APC	wt	wt	wt	wt	wt	mut	wt	wt	wt	mut	wt	wt	wt	wt	wt	wt
APC BI	mut	mut	mut	wt	wt	wt	mut	wt	wt	wt	wt	wt	mut	wt	wt	wt
TP53	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
KRAS	mut	mut	wt	wt	wt	wt	mut	wt	wt	mut	wt	wt	mut	wt	wt	wt
BRAF V600E	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
EGFR	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	mut	wt	wt	wt	wt	wt	wt
PIK3CA	mut	mut	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
RNF43	wt	wt	wt	wt	mut	wt	wt	mut	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
CTNNB1	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
B2M BI	wt	wt	mut	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
B2M BI	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
JAK 1,2,3	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
PTEN	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
PTEN BI	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
ARID1A	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
ARID1A BI	wt	mut	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
MLH1	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
MLH1 BI	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
MSH2	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
MSH2 BI	mut	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
MSH6	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
MSH6 BI	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt	wt
TMB (Mut/Mb)	46.39	38.02	41.08	16.73	38.78	8.37	60.08	25.10	41.93	69.98	41.83	47.15	34.22	67.68	28.62	88.56
fs (Indels)	9.0	11.0	15.0	4.0	20.0	2.0	8.0	13.0	16.0	24.0	14.0	18.0	11.0	16.0	7.0	24.0
% fs vs TOTAL	14.8	22.0	27.8	18.2	39.2	18.2	10.1	39.4	29.1	26.1	25.5	29.0	24.4	18.0	20.0	31.2
COSMIC signature Defective DNA MMR / MSI (small INDELS)	0.7	0.4	0.3	0.7	0.6	0.5	0.3	0.2	0.5	0.6	0.9	0.3	0.4	0.5	0.5	0.3
COSMIC signature Others	0.3	0.6	0.7	0.3	0.4	0.5	0.7	0.8	0.5	0.4	0.1	0.7	0.6	0.5	0.5	0.7
DENSITY CD8/mm ²	334.0	1081.0	505.0	403.0	NA	NA	593.0	NA	413.0	110.0	NA	242.0	496.0	208.0	474.0	NA
DENSITY CD3 /mm ²	507.0	1517.0	885.0	884.0	695.0	NA	1170.0	NA	1055.0	282.0	NA	450.0	830.0	541.0	925.0	NA
DENSITY FOXP3/mm ²	40.0	140.0	109.0	54.0	69.0	NA	142.0	NA	34.0	9.0	NA	29.0	42.0	12.0	16.0	NA
PD-L1 CPS	1.0	30.0	5.0	10.0	90.0	NA	NA	NA	0.5	NA	NA	5.0	5.0	0.5	2.0	NA
IHC results (prot expression lost)	MSH2	MLH1/MSI2	MLH1/MSI2	MLH1/MSI2	MLH1/MSI2	MLH1	MSH6	NA	MLH1/MSI2	MLH1/MSI2	MLH1/MSI2	MLH1/MSI2	MLH1/MSI2	MSI2	MLH1/MSI2	MLH1/MSI2
Number of unstable microsatellites (PCR)	5	4	5	5	5	NA	3	4	4	0	3	1	4	3	0	4
PROLIFERATING CD3	9	16	36	3	13	NA	28	NA	8	1	NA	14	9	7	6	NA
PROLIFERATING CD8	12	20	NA	5	NA	NA	35	NA	11	2	NA	14	17	12	NA	NA
PROLIFERATING FOXP3	8	24	27	5	16	NA	33	NA	12	0	NA	17	15	13	15	NA
Fusobacterium nucleatum (bacteria/mm ²)	0.9	246.3	NA	3.7	63.2	NA	0.1	NA	0.6	466.7	0	10.2	5	8.2	0.2	NA

ANEXO 3

Financiación del trabajo

El presente trabajo ha sido financiado por Ayudas Merck de Investigación 2018 en el Área de Investigación Clínica en Cáncer Colorrectal. Los detalles de la mencionada ayuda se detallan a continuación.

Título: Identificación de patrones genómicos y de respuesta a tratamiento en pacientes con cáncer colorrectal avanzado e inestabilidad de microstélites (IMS), y comparativa con características genómicas. clínicas y de respuesta a tratamiento de pacientes con tumores colorrectales hipermutados sin IMS.

Investigadora Principal: Dra María Elena Élez Fernández

Fuente de financiación: Fundación Merck Salud

Dotación: 30.000 euros

Periodo ejecución: 01/06/2018-01/06/2019

